

Der Einfluss endothelialer extrazellulärer Vesikel auf die Differenzierung von THP-1-Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Daniel Johannes Wolfgang Frühwald

aus Würzburg

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Felix Jansen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Soyhan Bagci

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.02.2024

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Für Opa Rudl,
Oma Dorle und Opa Wolfgang

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1	Erkrankungen des kardiovaskulären Systems	9
1.2	Pathophysiologie der Atherosklerose	10
1.3	Makrophagen im Kontext der Atherosklerose	12
1.3.1	M ₁ - und M ₂ -Makrophagen-Phänotypisierung	12
1.3.2	Direkte Einflüsse eines Diabetes mellitus	14
1.4	Die Rolle extrazellulärer Vesikel in der Atherosklerose	15
1.4.1	Die Biologie extrazellulärer Vesikel	15
1.4.2	Ceramide und Sphingosine	16
1.4.3	Extrazelluläre Vesikel in Atherosklerose und Diabetes	17
1.5	Fragestellung dieser Arbeit	18
2.	Material und Methoden.....	19
2.1	Material	19
2.2	Methoden	25
2.2.1	Reagenzien	25
2.2.2	Zellkultur von HCAECs.....	26
2.2.3	THP-1-Zellen.....	28
2.2.4	Genexpressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase PCR	31
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	34
2.2.6	Statistische Analyse	39
3.	Ergebnisse	41
3.1	IEVs aus oxLDL-behandelten Endothelzellen lösen in THP-1 Zellen keine phänotypische Differenzierung aus.....	41
3.2	IEVs aus oxLDL-behandelten Endothelzellen erzeugen in PMA-stimulierten THP-1 Zellen keine Änderung der Differenzierung.....	42

3.3	IEVs aus Glucose-behandelten Endothelzellen haben differenzierte Auswirkungen auf PMA-stimulierte THP-1 Zellen	44
3.4	C16-Ceramid erhöht die IL-10-Expression während DMSO die TNF-Sekretion fördert52	
4.	Diskussion.....	54
4.1	Ox-LDL-, LDL- und Glucose IEVs erzeugen eine Mischung aus M ₁ - und M ₂ -Differenzierungsmerkmalen in THP-1-Zellen	55
4.2	Alternative Makrophagen-Differenzierung und das Spektrum-Modell	64
4.3	Limitierungen	66
4.4	Verwendung von THP-1-Zellen	67
4.5	Zukünftige Forschung.....	69
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Abbildungsverzeichnis.....	74
7.	Tabellenverzeichnis	75
8.	Literaturverzeichnis	76
9.	Danksagung.....	97

Abkürzungsverzeichnis

CCL	Chemokin-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Unterscheidungsgruppe (Cluster of Differentiation)
cDNA	komplementäre DNA
CXCL	C-X-C-Motif-Ligand
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotid Triphosphat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EV	Extrazelluläre Vesikel
EZM	Extrazellulärmatrix
FMO	Fluoreszenz minus eins (Fluorescence minus one)
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter)
G	Zentrifugenbeschleunigung
HCAEC	Humane koronararterielle Endothelzellen
HO-1	Häm-Oxygenase-1
ICAM-1	Interzelluläres- Zelladhäsionsmolekül 1 (Intercellular adhesion molecule-1)
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
KLF2	Krüppel-like-Faktor 2
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (Low-Density-Lipoprotein)
IEV	große (large) extrazelluläre Vesikel
LPS	Lipopolysaccharide
miR	micro-Ribonukleinsäure
MCP-1	monozytenchemotaktisches Protein-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NO	Stickstoffmonoxid
nSMase2	neutrale Sphingomyelinase Typ 2

oxLDL	oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte (oxidized Low-Density-Lipoprotein)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sideward-Scatter)
sEV	kleine (small) Extrazelluläre Vesikel
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
THP-1	Tohoku-Kinderklinik-1 (Tohoku Hospital Pediatrics-1)
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (vascular cell adhesion molecule-1)
Well	Vertiefung, z.B. einer Zellkulturtestplatte

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems

Weltweit führen kardiovaskuläre Erkrankungen die Todesursachenstatistiken an: Im Jahr 2019 verstarben geschätzte 17,9 Millionen Menschen an Erkrankungen aus diesem Formenkreis. Dies entspricht 32 % der globalen Todesfälle. In 85 % dieser Todesfälle waren ein Herzinfarkt oder ein Schlaganfall ursächlich (World Health Organisation, 2021). In der Europäischen Union belaufen sich die geschätzten Folgekosten kardiovaskulärer Erkrankungen auf 210 Mrd. € jährlich (European Heart Network, 2021).

Die Ursache der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen ist die Atherosklerose. Sie ist Gegenstand intensiver Forschung. Der Grundlagenforschung kommt aus mehreren Gründen besondere Bedeutung zu:

Erstens hat sie die Relevanz der gut bekannten Risikofaktoren für die Pathogenese der Atherosklerose nachgewiesen

(World Health Organisation, 2021; Yusuf et al., 2004). Die behavioralen Risikofaktoren sind „ungesunde Ernährung, physische Inaktivität, Tabakrauchen und Alkoholabusus, [...] welche in erhöhtem Blutdruck, Hyperglykämie, erhöhten Blutfettwerten, Übergewicht und Adipositas münden können.“ (World Health Organisation, 2021).

Recht eindeutig zeigt sich, dass sich die Primärprävention von Atherosklerose prognostisch sehr günstig auf die Verhinderung negativer kardiovaskulärer Ereignisse auswirkt (Fernández-Friera et al., 2015; Lloyd-Jones et al., 2006).

Zweitens kann sie möglicherweise neuartige Methoden zur Früherkennung von kardiovaskulären Erkrankungen aufdecken (Blanco-Domínguez et al., 2021; Jansen et al., 2014). Atherosklerose weist eine der längsten Latenzzeiten menschlicher Erkrankungen auf (Libby, 2013). Daher ist neben der Primärprävention die Sekundärprävention, im Sinne der Früherkennung der Erkrankung, ein zentraler Baustein der Therapie (Libby et al., 2019; Karmali et al., 2014; Si et al., 2014; Thomopoulos et al., 2014).

Drittens bietet die Erforschung der Ursachen der Atherosklerose einen Zugang zur Entwicklung neuer und Verbesserung bestehender Behandlungsmethoden (Fitzgerald et al., 2017; Karatasakis et al., 2017; Karlson et al., 2016). Dieses Ziel ist nur erreichbar, wenn die mechanistischen Grundlagen der Atherosklerose im Detail verstanden sind.

1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Eine Vielzahl an Faktoren spielen bei der Entstehung der Atherosklerose eine Rolle: Auf zellulärer Ebene sind das Endothel, glatte Muskelzellen und Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen zentral beteiligt (Libby et al., 2019). Azelluläre Faktoren, die ebenso einen gewichtigen Anteil haben, reichen von der Extrazellulärmatrix (EZM), der Intima über Zytokine, Glucose, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bis hin zu Lipoproteinen (vor allem LDL) und Lipiden.

Mittlerweile gibt es eine anerkannte Theorie, die den Ursprung der Atherosklerose beschreibt: Die „response-to-injury“-Hypothese wurde von Ross und Glomset entwickelt und postuliert die endotheliale Schädigung als erstes Ereignis in der Atherogenese. Laut ihrer Theorie können „Faktoren wie Hyperlipidämie, hormonelle Dysfunktion und erhöhte Schubspannung bei Hypertonie [...] das Endothel verletzen und die Natur der endothelialen Barriere gegen die Passage von Blutbestandteilen in die Arterienwand verändern“ (Ross und Glomset, 1975). Auch spätere Autoren stellen die endotheliale Dysfunktion als Ursache der Atherogenese in den Vordergrund (Gimbrone und García-Cardena, 2016; Gisterå und Hansson, 2017).

Die endotheliale Dysfunktion ist multifaktoriell bedingt: Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang Inflammation und Insulinresistenz, die bis zu manifestem Diabetes mellitus Typ II reicht (Kim et al., 2006; Paneni et al., 2013; Rocha und Libby, 2009).

Der wesentliche Effekt von Inflammation und Insulinresistenz auf das Endothel ist eine Deregulation des Stickstoff-Monoxid-(NO)-Haushaltes mit nachfolgender Produktion von ROS. Hink et al. konnten zeigen, dass die endotheliale Dysfunktion bei hohen Glucose-Spiegeln auf einer dysregulierten NO-Synthase und einer ebenso veränderten NADPH-Oxidase beruht (Hink et al., 2001). Der Wegfall des relaxierenden NO-Effekts sorgt für eine Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskulatur. Außerdem führt dies zu einer Thrombozytenaktivierung und konsekutiv Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie „platelet-derived-growth-factor“ (PDGF), „endothelial-growth-factor“ (EGF) und "transforming-growth-factor" (TGF- β). Diese wiederum lösen eine Vasokonstriktion durch Aktivierung der glatten Muskulatur, Proliferation der glatten Muskelzellen (Brandes und Busse, 2010) und Proliferation der EZM *via* TGF- β aus (Brandes und Busse, 2010; Libby, 2002).

Paneni et al. (2013) zeigen, dass „ROS [in Endothelzellen und bei hohen Glucose-Spiegeln] mehrere proinflammatorische zelluläre Mechanismen aktivieren, darunter [...] Proteinkinase C (PKC)-Signalkaskaden. PKC-Signale rufen unter anderem eine vermehrte Bildung von ROS hervor. Ein Beleg dafür ist die Abschwächung der ROS-vermittelten Effekte nach Gabe eines PKC-Inhibitors (Kouroedov et al., 2004). Zudem wird die Sekretion der Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin (IL)-1 β und IL-6 ausgelöst. TNF, IL-1 β und IL-6 sind potente Mediatoren der Entzündung (La Sala et al., 2019). Diese Zytokine und ROS aktivieren die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen wie „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1), die die Rekrutierung von Makrophagen an den Ort der Inflammation weiter fördern (La Sala et al., 2019; Libby, 2002; Paneni et al., 2013).

Essenzieller Bestandteil der Progression von Atherosklerose ist LDL (Ference et al., 2017). Eine protektive Funktion von HDL wird hingegen nicht mehr angenommen (Libby et al., 2019). Endothel ist permeabel für LDL und Untersuchungen zeigen, dass bestimmte Faktoren für eine Retention der Lipoproteine in der subendothelialen EZM sorgen (Camejo et al., 1993; Flood et al., 2002; Melchior et al., 2013; Schwenke und Carew, 1989). Verstärkend wirkt eine Konformationsänderung der Lipoproteine, ausgelöst durch Sphingomyelinasen (Borén und Williams, 2016; Sneek et al., 2012). Oxidiertes LDL hat deutlich stärkere negative Auswirkungen als nicht oxidiertes (Miller et al., 2011; Navab et al., 2004; Rhoads und Major, 2018).

In der EZM werden die LDL-Konglomerate von glatten Muskelzellen und einwandernden Makrophagen aufgenommen (Allahverdian et al., 2012; Llorente-Cortés et al., 2000; Moore und Tabas, 2011). Es kommt zur Akkumulation der Zellen und der Umwandlung zu Schaumzellen mit konsekutiver Nekrose (Kunjathoor et al., 2002; Llorente-Cortés et al., 2000). Die Nekrose führt zu einer Entzündungsreaktion, die wie gezeigt ein Treiber der Atherosklerose ist (Gisterå und Hansson, 2017; Libby, 2002).

Wie o.a. sind die Mechanismen für die interzelluläre Kommunikation in der Atherosklerose vielfältig. Aktive Teilnehmer sind Endothelzellen und Makrophagen, deren gegenseitiges Wechselspiel eine selbstverstärkende Entzündungskaskade in Gang setzt. Spezielle Mechanismen der Makrophagen-Aktivierung werden im Folgenden erläutert:

1.3 Makrophagen im Kontext der Atherosklerose

Wie beschrieben sind Makrophagen ein wesentlicher Bestandteil der pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der Atherosklerose, Initiation und Aufrechterhaltung der Inflammation erfüllen zentrale Aufgaben (Ley et al., 2011; Moore und Tabas, 2011). Makrophagen und ihre Vorläuferzellen, die Monozyten, sind eine sehr heterogene Gruppe, deren Herkunft bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques Gegenstand intensiver Forschung ist. Als Ursache der Akkumulation in der Plaque erwiesen sich in Studien die Einwanderung und die Transdifferenzierung aus glatten Muskelzellen (Allahverdian et al., 2012; Feil et al., 2014; Mestas und Ley, 2008; Moore und Tabas, 2011; Robbins et al., 2013).

Zur experimentellen Untersuchung von Makrophagen werden seit ca. 40 Jahren Humane Akute Monozytenleukämie Zellen der Linie THP-1 („Tohoku Hospital Pediatrics-1“-Zellen) verwendet. Sie sind gut etablierte Substitute für Monozyten aus peripherem Blut (PBMC) und werden häufig für die Untersuchung der Monozytendifferenzierung *in vitro* verwendet (Auwerx, 1991; Tsuchiya et al., 1980).

Um die verschiedenen Phänotypen von Makrophagen zu beschreiben, wurde eine Nomenklatur eingeführt, die im Wesentlichen zwei unterschiedliche Evolutionsrichtungen unterscheidet: M₁-Makrophagen und M₂-Makrophagen.

1.3.1 M₁- und M₂-Makrophagen-Phänotypisierung

Die klassische Nomenklatur der verschiedenen Makrophagen-Phänotypen beruht auf der Einteilung in aktivierte Makrophagen (M₀-Makrophagen), proinflammatorische M₁-Makrophagen sowie protektive, antiinflammatorische M₂-Makrophagen. Diese Kategorisierung folgt grob der Einteilung von T-Helfer-Zellen, die je nach Stimulus zwei verschiedene Aktivierungspfade einschlagen können (Mills et al., 2000). M₁-Makrophagen differenzieren z.B. unter Einfluss von Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysacchariden (LPS) aus der Zellwand von Bakterien. Sie sezernieren typische Entzündungsaktivatoren wie TNF, IL-1 β und IL-6. Außerdem produzieren M₁-Makrophagen ROS und NO *via* induzierbarer NO-Synthase. Auf ihrer Oberfläche werden unter anderem CD80 und CD86-Moleküle exprimiert (Mantovani et al., 2002; Martinez und Gordon, 2014). Ihre Funktion beschreiben Mantovani et al. (2002) als „potente Effektorzellen, die Mikroorganismen und Tumorzellen töten und beträchtliche Mengen proinflammatorischer Zytokine produzieren“. M₂-Makrophagen oder alternativ aktivierte Makrophagen entstehen unter Einfluss von IL-

4 und IL-13 (Goerdts und Orfanos, 1999; Stein et al., 1992). Sie sezernieren unter anderem IL-10, TGF- β und IGF-1 (Röszer, 2015). IL-10 ist ein wichtiger Regulator der Immunaktivität und begrenzt die Inflammation (Couper et al., 2008). Auf der Oberfläche von M₂-Makrophagen werden CD163 und CD206 exprimiert. CD206 (auch bekannt als C-Typ Mannose-Rezeptor 1) spielt eine wichtige Rolle bei der Auflösung inflammatorischer Prozesse (Lee et al., 2002). Zusammengefasst "mediieren [M₂-Makrophagen] inflammatorische Antworten und [die] adaptive TH₁-Immunität, entfernen Abfallprodukte [durch Phagozytose] und fördern Angiogenese, Gewebeumbau und -reparatur" (Mantovani et al., 2002).

In vivo unterliegen Makrophagen sehr heterogenen Einflüssen. Die Dichotomie dieses Systems ist daher nur als Näherung zu betrachten, vielmehr ergibt sich laut neuer Untersuchungen ein Kontinuum an verschiedensten Phänotypen und Funktionen, je nach Stimulus und Gewebe (Martinez und Gordon, 2014; Xue et al., 2014). Für das experimentelle Setting *in vitro* ist die Einteilung ein „hilfreiches Rahmenwerk“ (Mantovani et al., 2002).

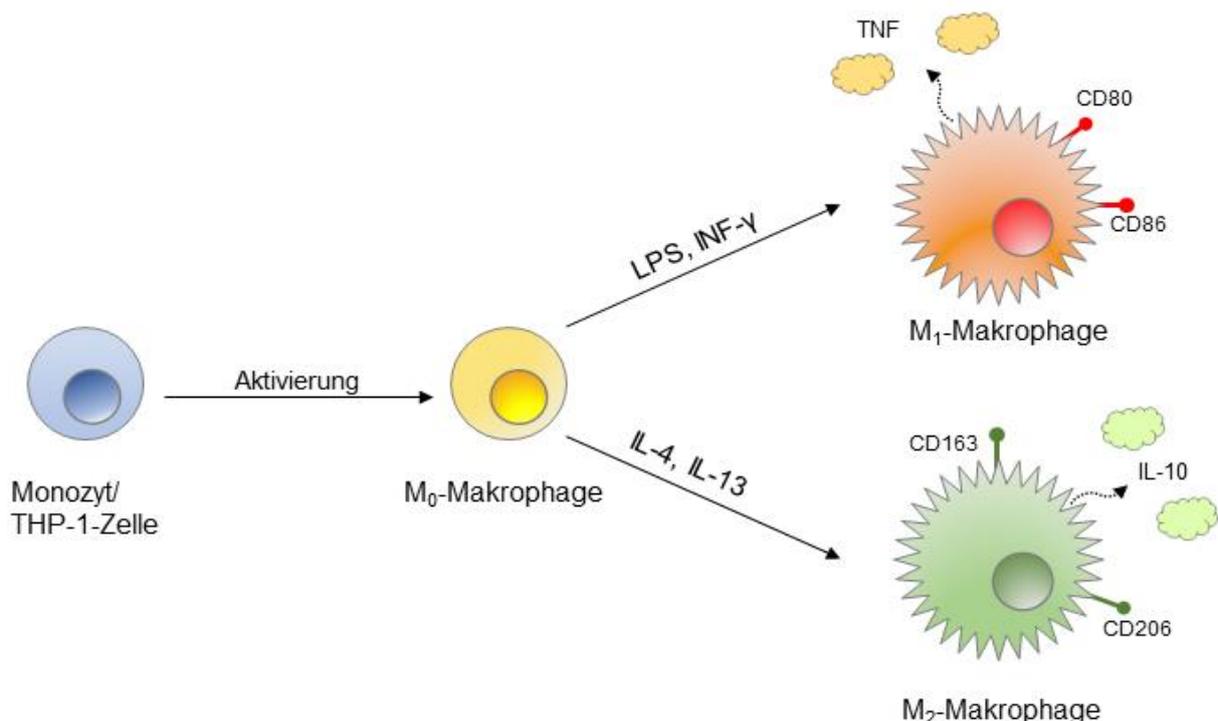


Abb. 1: Das Modell der klassischen (M₁) und alternativen (M₂) Makrophagendifferenzierung. Modifiziert nach (Li et al., 2016a).

1.3.2 Direkte Einflüsse eines Diabetes mellitus

Mehrere Mechanismen der Atherosklerose werden von hohen Glucose-Spiegeln und dessen Folgen bis hin zum Diabetes mellitus Typ II verstärkt. Auch direkte Auswirkungen auf Monozyten-Makrophagen-Zellen sind darunter.

Hohe Glucose-Spiegel fördern *in vitro* die Bildung von Monozyten, die vermehrt IL-1 β und IL-6 sezernieren und somit in Richtung M₁-Makrophagen differenzieren (Dasu et al., 2007).

CD36, ein Scavenger-Rezeptor, wird bei Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus vermehrt auf Monozyten exprimiert. Ebenso erfolgt eine erhöhte Freisetzung an „monocyte chemoattractant-protein-1“ (MCP-1), das weitere Monozyten rekrutiert (Cipolletta et al., 2005). Auch Endothelzellen sezernieren unter erhöhten Glucose-Spiegeln vermehrt MCP-1 und exprimieren verstärkt VCAM-1 (Piga et al., 2007). Laut Otsuka et al. (2005) zeigen Monozyten bei hohen Glucose-Spiegeln eine erhöhte Affinität zu Endothelzellen, ein Phänomen, welches durch eine Veränderung des subendothelialen Raumes verstärkt werden könnte: Proteoglykane in der EZM inhibieren physiologischerweise die Monozyten-Adhäsion. Im diabetischen Milieu sind Proteoglykane vermindert, womit der Effekt abgeschwächt wird (La Sala et al., 2019). Die proinflammatorischen Veränderungen werden in Monozyten-Makrophagen-Zellen, wie in Endothelzellen, durch NF κ B und PKC vermittelt (Venugopal et al., 2002).

Ein weiterer Effekt auf Makrophagen scheint durch Insulinresistenz bedingt zu sein, welche mitverantwortlich ist für eine Apoptose-Neigung von Makrophagen. Vermittelt wird diese Wirkung über Stress auf das endoplasmatische Retikulum (ER). Plaques in Patienten mit Diabetes mellitus Typ II haben dadurch im Verhältnis zu Nicht-Diabetikern größere nekrotische Areale (Han et al., 2006; Tabas et al., 2010). Weiterhin führt die Glykierung von HDL-Lipoproteinen zu deren Dysfunktion und dem Wegfall protektiver Effekte (La Sala et al., 2019). Somit besteht eine Verbindung zwischen erhöhten Glukosespiegeln und der Rolle von Lipoproteinen in der Atherogenese.

Während die angesprochenen Mechanismen größtenteils auf Kommunikation *via* Zytokine und Oberflächenproteine einwirken, stellt der Austausch extrazellulärer Vesikel einen weiteren Kommunikationspfad zwischen Zellen im Kontext der Atherosklerose dar.

1.4 Die Rolle extrazellulärer Vesikel in der Atherosklerose

1.4.1 Die Biologie extrazellulärer Vesikel

In der jüngeren Vergangenheit rückten extrazelluläre Vesikel (EV) als pathogenetische Faktoren in den Fokus der Atheroskleroseforschung.

Wie van Niel et al. (2018) charakterisieren sind „Extrazelluläre Vesikel [...] eine heterogene Gruppe membranöser Strukturen zellulären Ursprungs bestehend aus Exosomen und Mikrovesikeln. Diese stammen aus dem endosomalen System [Exosomen] oder werden von der Plasmamembran abgeschieden [Mikrovesikel]“. Als weitere Entität werden Apoptosekörper (Apoptotic bodies) angesehen, deren Durchmesser über dem von Mikrovesikeln (auch large EVs; IEVs) und Exosomen (auch small EVs; sEVs) liegt (Théry et al., 2018), (Tab. 1). Während Mikrovesikel bereits im Kontext der Blutgerinnung betrachtet wurden, beleuchtet man zunehmend ihre Aktivität in der interzellularen Kommunikation (Boulanger et al., 2017; Njock et al., 2015; Satta et al., 1994; Sims et al., 1988).

Tab. 1: Charakteristik extrazellulärer Vesikel (Boulanger et al., 2017)

Bezeichnung	Größe (Ø in nm)	Bildung
Exosomen [sEV]	≈40-100	Fusion multivesikulärer Körperchen mit Membran
Mikrovesikel [IEV]	100-1000	Knospung der Plasmamembran
Apoptotic bodies	>1000	Freisetzung nach Apoptose und Zelltod

Colombo et al. (2014) erläutern, dass jeder Zelltyp die Biosynthese seiner EVs je nach physiologischem Zustand reguliere. In der Folge würden sie mit spezifischen Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren beladen und freigesetzt. Dementsprechend ändert sich auch der Effekt der EVs gemäß dem Zustand der produzierenden Zelle. Die Freisetzung der EVs ist Ca^{2+} -abhängig und beinhaltet die Aktivierung von PKC-Signalwegen (van Niel et al., 2018).

Eine wichtige Rolle in der Zusammensetzung von EVs spielen Membranlipide aus der Familie der Sphingolipide (Bianco et al., 2009; Högback et al., 2003; Menck et al., 2017). Sphingolipide sind am Aufbau der Zellmembran und an intrazellulären Sortiermechanismen beteiligt; außerdem nehmen sie als Signalmoleküle an Inflammation,

Zellmigration und -proliferation in allen Gewebearten teil (Choi et al., 2021; Ogretmen und Hannun, 2004). Als Vertreter der Sphingolipide werden später Sphingosine und Ceramide genauer betrachtet (s.u.).

Einmal freigesetzt werden EVs mithilfe diverser Mechanismen an die Zielzellen gebunden, hierbei spielen z. B. auch Signalmoleküle der Immunabwehr eine Rolle. Integrine auf EVs können mit ICAM-1 interagieren, die z. B. auf Monozyten vorkommen (Morelli et al., 2004). Andererseits gibt es auch Signale, die wie CD47 eine Phagozytose von Vesikeln durch Monozyten verhindern (Kamerkar et al., 2017). Auch die EZM sowie Proteine aus der Gruppe der Tetraspannine scheinen Einfluss auf die Bindung der EVs zu haben (van Niel et al., 2018).

EVs werden durch direkte Fusion mit der Zellmembran oder durch Verschmelzung mit der endosomalen Membran aufgenommen. Die Zelle bedient sich dabei bekannter Mechanismen wie Phagozytose, Endozytose und „clathrin coated pits“. (Mulcahy et al., 2014). Auch „Lipid-rafts“ spielen eine wichtige Rolle wie Experimente mit deren Inhibition zeigen konnten (Colombo et al., 2014). Lipid-rafts bestehen unter anderem aus Sphingolipiden (Hannun und Obeid, 2018).

Die Auswirkungen der EVs und ihres Inhaltes auf Entstehungsmechanismen der Atherosklerose und bei Diabetes mellitus Typ II werden im Folgenden erläutert.

1.4.2 Ceramide und Sphingosine

Eine Unterart der beteiligten Sphingolipide sind Ceramide und Sphingosine (Mullen et al., 2012; Trajkovic et al., 2008). Ceramid wird mit der Apoptose von Zellen assoziiert und aktiviert die PKC, zudem ist es wichtig für die Zell-Differenzierung (Ogretmen und Hannun, 2004). Entscheidende Enzyme des Stoffwechsels sind die Sphingomyelinase (wandelt Sphingomyelin in Ceramid um), Ceramid-Kinase 1 (produziert Ceramid 1-phosphat aus Ceramid) und die Sphingosin-Kinase 1 (produziert Sphingosin 1-Phosphat aus Sphingosin).

Sphingosin und Ceramid können schließlich in einem Schritt durch die Ceramidase bzw. die Ceramid-Synthase ineinander umgewandelt werden. Ceramid ist also ein notwendiges Zwischenprodukt zur Synthese von Sphingosin (Ogretmen und Hannun, 2004). Auch im Endothel spielen Ceramide und Sphingosine funktionell bedeutsame Rollen. Ceramide blockieren die Vasodilatation (und sollen so kardiovaskulären Erkrankungen Vorschub leisten), während Sphingosin-1-Phosphat Vasodilatation

vermittelt und atheroprotektiv wirkt (Choi et al., 2021). Siskind et al. (2002) konnten zeigen, dass das Molekül C-16 Ceramid die Permeabilität von Mitochondrien erhöht. Dieser Effekt kommt durch Kanal-Bildung, bestehend aus mehreren dieser Lipide zustande (Siskind und Colombini, 2000). Da auf diese Weise außerdem ROS aus den Mitochondrien freigesetzt werden, könnte dies sich auf die Differenzierung der Zielzellen (z.B. Makrophagen) auswirken (Siskind et al., 2002). Zietzer et al. (2021) belegten ebenfalls, dass Apoptose von Endothelzellen durch C-16 Ceramid verursacht wird.

1.4.3 Extrazelluläre Vesikel in Atherosklerose und Diabetes

Atherosklerose-Plaques enthalten in allen Stadien EVs, welche vermutlich größtenteils aus Plaque-bildenden Zellen (Leukozyten, Endothelzellen, Erythrozyten und glatte Muskelzellen) stammen. Diese produzieren EVs bzw. setzen sie bei der Apoptose frei. Der Einfluss von EVs auf atherosklerotische Plaques wurde vielfach untersucht. Klassische Risikofaktoren der Atherosklerose verursachen laut zahlreicher Untersuchungen erhöhte Plasmakonzentrationen von EVs. Viele *in vitro* Studien belegen, dass EVs die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 aus Endothelzellen und Leukozyten erhöhen; diese Zytokine fördern die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und deren Migration in Richtung Plaque (Boulanger et al., 2017). Außerdem erhöhen EVs die Expression von ICAM-1 und steigern Adhäsion und Diapedese (Rautou et al., 2011).

Durch Scherkräfte induzierte EVs erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und auf THP-1-Zellen (Nomura et al., 2001).

EVs aus humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVECs) zeigen nach Stimulation mit TNF oder IL-1 β eine deutlich erhöhte Expression der endothelialen Inflammationsmarker ICAM-1, P-selectin, E-selectin und VCAM-1 und fördern somit Atherosklerose (Akbar et al., 2017).

Auch die endotheliale NO-Produktion wird durch EVs gehemmt (Agouni et al., 2008; Brodsky et al., 2004). Untersuchungen von Densmore et al. (2006) weisen auf eine veränderte Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) als Ursache hin. Des Weiteren wurde eine EV-bedingte erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unter Einfluss der NADPH-Oxidase mehrfach nachgewiesen (Brodsky et al., 2004; Jansen et al., 2013a). Diese Effekte führen, wie oben gezeigt, zu einer reduzierten Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur. Endotheliale EVs sind zudem in der

Lage die Permeabilität des Endothels zu erhöhen (Edrissi et al., 2016; Marcos-Ramiro et al., 2014).

Eine weitere Wirkung von EVs verschiedener Herkunft ist die Verstärkung von Cholesterol- und Lipid-Ablagerungen in Makrophagen (Keyel et al., 2012). Beispielsweise stimulieren EVs aus CD4⁺ T-Zellen *in vitro* eben diesen Prozess und erhöhen die TNF-Synthese in Makrophagen (Zakharova et al., 2007). EVs können außerdem die Apoptose von Makrophagen und anderen Zielzellen induzieren, dies geschieht durch zwei Mechanismen: Der erste beinhaltet den Transfer von Caspasen zur Zielzelle, die dort proapoptotisch wirken (Sarkar et al., 2009). Der zweite wird durch membranständige Phospholipide der EVs ausgelöst. Vermutlich werden die Phospholipide durch Phospholipase A2 gespalten, wodurch vermehrt Arachidonsäure entsteht und konsekutiv vermehrt pro-apoptotische Ceramide (Distler et al., 2005; Huber et al., 2007; Zietzer et al., 2021). Die Apoptose verstärkt nachfolgend das Plaque-Wachstum und die Freisetzung weiterer EVs (Boulanger et al., 2017).

Alles in allem zeigen diese Untersuchungen eine vielfältige Rolle von EVs in der Atherosklerose. Während proinflammatorische und proatherogene Effekte im Vordergrund stehen, gibt es möglicherweise auch protektive Effekte von EVs auf das Endothel beziehungsweise auf Monozyten und Makrophagen.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Die hohe Krankheitslast sowie die dadurch entstehende finanzielle Beanspruchung der weltweiten Gesundheitssysteme deutet auf den Stellenwert der Atherosklerose-Forschung hin. Wie beschrieben sind dabei das Verständnis der Pathophysiologie, insbesondere die Rolle des Monozyten-Makrophagen-Systems, und der Einfluss endothelialer EVs von großer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Zusammenhänge auf diesem Gebiet leisten: Ergründet wird, welche phänotypischen Änderungen in Makrophagen durch endotheliale EVs hervorgerufen werden.

Folgende Hypothesen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft:

- 1) Extrazelluläre Vesikel aus Endothelzellen, die erhöhten ox-LDL-, LDL- und Glucose-Konzentrationen ausgesetzt sind, verursachen eine Zunahme der M₁-Differenzierung in THP-1-Zellen.
- 2) C16-Ceramid bewirkt eine M₁-Differenzierung in THP-1-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 2: Geräte

Gerät:	Hersteller:
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 Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Heizblock: Thermomixer comfort 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler: Vapo.protectMastercycler Pros	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer: IkaVortexer Genius ³	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer: lab dancer	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
BD FACS Canto II	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Einkanalpipetten: 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 20µL, 10 µL, 2,5µL Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tab. 2: Geräte

Gerät:	Hersteller:
Integra Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Eismaschine	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Autoklav	Systemec GmbH, Linden, Deutschland

Tab. 3: Software

Software:	Firma:
MS Office 2020	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism Version 7.03	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA USA
BD FACS Diva Software Version ??	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
FlowJo Version 10.0.8.r1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial:	Katalognummer:	Hersteller:
Zellkulturflasche, 25cm ² (Vent-Schraubkappe) T25, 75 cm ² (Filter Schraubkappe) T75	90025 90076	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale, 100 mm	93100	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur Testplatte, 6 well	92006	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial:	Katalognummer:	Hersteller:
Eppendorf-Tubes: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	0030121023 0030123328 0030120094 0030119401cc	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR SoftTubes, 0.2 ml, farblich gemischt	711088	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Falcon Tubes: 15 ml, 50 ml	188271 227 261	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CryoPure Tube, 1,6ml Violet	72.380.007	Sarstedt, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen 0,1-20 µl, 0-200 µl, 100-1250 µl	07-372-2015 07-376-2015 07-379-2015	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe Deutschland
Serologische Pipetten: Corning Costar Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml	CLS4487-200EA, CLS4488-200EA, CLS4489-200EA	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR 96 Well Platte farblos	712260	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems, Foster City, CA , USA
Falcon® 5 ml Round-Bottom Tubes 12x75 mm (Durchflusszytometrie)	352054	Corning, NY, USA
TBC-Spritzen	2009173	Mediware, Berlin, Deutschland

Tab. 5: Zellkulturmaterial

Zellkulturmaterial:	Katalognummer:	Hersteller:
THP-1 growing (THP-1 cells)	330356	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, Deutschland
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	61870044	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetal Bovine Serum, qualified, One Shot™ format, EU Approved South America origin	A3160802	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin, 100X, Tissue Culture Grade - Calbiochem	516106	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CM-1, Freeze medium for Mammalian cells	800125	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, Deutschland
HCAEC (human, coronary, artery, endothelial cells)	C-12221	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium MV	C-22020	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Freezing Medium Cryo-SFM	C-29912	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hungermedium: Endothelial Cell Basis Medium MV	C-22010	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DetachKit HEPES BSS Trypsin EDTA-Solution, TNS	C-41220	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	BR717810-1EA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tab. 6: Reagenzien

Reagenzien	Katalognummer:	Hersteller:
20% Glucose Infusionslösung	03158931	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) (ab120297)	ab120297	Abcam, Cambridge, UK
C16 Ceramide (d18:1/16:0) N- palmitoyl-D-erythro- sphingosine	860516P-5MG	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid für die Zellkultur)	A3672,0100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DPBS 1x, no calcium, no magnesium	14190169	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyde solution 4%, buffered, pH 6.9	3822 00 00	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
UltraPure™ DNase/RNase- Free Distilled Water	10977049	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase AWAY® decontamination reagent for RNase	83931-250ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIzol™ Reagent	15596018	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-Propanol, ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.,	6752.4	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	9065.4	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 6: Reagenzien

Reagenzien	Katalognummer:	Hersteller:
Chloroform HPLC-Gütegrad, Alfa Aesar™	11310278	Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Omniscript® Reverse Transcription Omniscript Reverse Transcriptase Buffer RT, 10x dNTP Mix, 5 mM RNasefreeWater	205113	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNasin Plus RNase Inhibitor	N2615	Promega, Madison, USA
Primer Random P(DN) 6 50 A260U	11034731001	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
GAPDH Hs02758991_g1	4351370	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
18S Hs_99999901 s1	4351370	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TNF Hs 00174128_m1	4331182	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-10 Hs00961622 m1	4331182	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	4369542	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Human BD Fc Block™	564220	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
FITC Mouse Anti-Human CD80 Clone BB1	555683	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

Tab 6: Reagenzien

Reagenzien	Katalognummer:	Hersteller:
BV421 Mouse Anti-Human CD86 Clone 2331	562433	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Brilliant Violet 510™ anti-human CD163	333627	BioLegend, San Diego, USA
CD206 (MMR) Monoclonal Antibody (19.2), PE, eBioscience™	12-2069-42	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipoprotein, low density, human plasma, 99%, BT-903, 5 mg	J65039-#0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipoprotein, low density, oxidized, human plasma, 99%, BT-910, 2 mg	J65591-8+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Reagenzien

PMA

1 mg PMA-Trockensubstanz wurde in 250 µl DMSO gelöst, um eine Konzentration von 4 µg/µl zu erreichen. Aus dieser Stammlösung wurde wiederum 1 µl in 3,999 ml PBS aufgelöst, um eine Konzentration von 1 µg/ml zu erhalten. Aus dieser Stammlösung konnten für die Experimente die jeweils benötigten Mengen PMA-Lösung entnommen werden. Die Konzentration im Zellmedium betrug stets 15,4 ng/ml, entsprechend 25 nM.

Glucose

20 % Glucose-Lösung wurde dem HCAEC-Medium direkt zugesetzt, bis eine Konzentration von 5,5 mM erreicht wurde.

LDL und oxLDL

Das oxLDL lag in einer Lösung mit der Konzentration 2 mg/ml vor, LDL mit einer Konzentration von 5 mg/ml. Beide wurden dem HCAEC-Medium unverdünnt zugesetzt, um eine Konzentration von 50 µg/ml zu erreichen.

C16-Ceramid (d18:1 / 16:0)

Die C16-Ceramid-Trockensubstanz wurde mit DMSO zu einer 5 mM Stammlösung verdünnt. Diese Stammlösung konnte nach entsprechender Verdünnung dem Medium zugegeben werden, um eine Konzentration von 1 µM sowie 10 µM zu erreichen.

2.2.2 Zellkultur von HCAECs

Zelllinie und Konservierung

Für die Experimente mit Endothelzellen wurden humane Endothelzellen aus Coronararterien (HCAECs) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine adhärenz Zellspezies. Sie wurden gemäß Herstellerangabe nach der dritten Passage erworben und bis zur sechsten Passage in „Endothelial Cell Growth Medium MV“ unter Zusatz von „Endothelial Growth Media Supplement Mix“ bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Cryo-SFM bei -150 °C Celsius eingefroren und zu den jeweiligen Experimenten wieder aufgetaut. Bei der Arbeit mit kultivierten Zellen wurde eine Laminar-Flow-Sterilbank verwendet, um steriles Arbeiten zu gewährleisten.

Kultur und Passage

Die Zellen wurden in T 75-Zellkultur-Flaschen in 12 ml Endothelzell-Medium kultiviert, bis ein Zellrasen aus 80-90 % konfluenten Zellen entstand. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde unter Verwendung eines Detach-Kit (PromoCell) eine Passage der Zellen durchgeführt. Das alte Medium wurde entfernt und die Zellen mit 3 ml HEPES BSS (HEPES Buffered Balanced Salt Solution) gewaschen. Es folgte die Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung zu den Zellen. Anschließend erwärmte man die Flaschen zwei bis drei Minuten im Brutschrank bei 37 °C, bis sich die Zellen vollständig gelöst hatten. Um eine Zellschädigung zu vermeiden, setzten wir 3 ml Trypsin-Neutralising-Solution zu. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 8 min bei 800 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Sediment (im Folgenden als „Pellet“ bezeichnet) in

Endothelzell-Medium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen auf drei neue T 75-Flaschen aufgeteilt, wobei der Boden gleichmäßig mit Zellen zu bedecken war. Nach der achten Passage teilte man die Zellen auf jeweils drei 10-cm-Schalen auf und je nach Experiment behandelte man unterschiedlich weiter.

Stimulation der HCAECs mit Glucose

Um eine Hyperglykämie zu simulieren, wurden die Zellen in Glucose-haltigem Medium kultiviert. Dem Endothelzell-Medium fügte man so viel 20 %-Glucose-Lösung zu, dass eine Konzentration von 5,5 mM im Zellmedium erreicht wurde. Nach der achten Passage wurden die Endothelzellen mit dem Glucose-haltigen Medium versetzt und für 72 h inkubiert. Als Kontrolle diente Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS).

Stimulation von HCAECs mit oxLDL und LDL

Ein weiterer Teil der Experimente beinhaltete die Kultur von HCAECs in Medium mit zugesetztem humanem oxidierten low-density Lipoprotein (oxLDL). Die Konzentration nach Zusatz von humanem oxLDL betrug 50 µg pro ml Medium. Begonnen wurde nach Passage 8. Ebenfalls verwendet wurde unbehandeltes LDL in derselben Konzentration (50 µg/ml Medium) sowie PBS als Kontrolle. Die Inkubationszeit betrug 24 h.

Isolation extrazellulärer Vesikel

Der nächste Schritt beinhaltete die Erzeugung und Isolation von großen EVs (IEVs) aus den behandelten Zellen. Als Standard der EV-Isolation hat sich die differentielle Zentrifugation durchgesetzt, die in vielen verschiedenen Protokollen etabliert ist (Colombo et al., 2014).

Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS gewaschen und für 24 h mit 5 ml Serum-freiem Medium (Endothelial Cell Growth Medium MV ohne Zusatz von Endothelial Growth Media SupplementMix) inkubiert. Nach 24-stündiger Kultur überführte man das Kulturmedium in Eppendorf-Hütchen. Die Isolation erfolgte nun nach einem etablierten Protokoll der differentiellen Zentrifugation (Jansen et al., 2013a): Zunächst wurde das entnommene Medium für 15 Minuten mit 1500 g, der hieraus resultierende Überstand im Anschluss 40 Minuten mit 20.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen und abermals 40 Minuten mit 20.000 g zentrifugiert. Nachdem das Pellet in RPMI-Medium gelöst war, gab man es zu den THP-1-Zellen.

2.2.3 THP-1-Zellen

Zelllinie und Kultivierung

Humane Akute Monozytenleukämie Zellen der Linie THP-1 (Tohoku Hospital Pediatrics-1) wurden von Cell Lines Services™ erworben. Es handelt sich hierbei um eine non-adhärenente Zelllinie, die als Substitut für humane Makrophagen im experimentellen Ansatz weit verbreitet ist. Die Kultur erfolgte in RPMI 1640, GlutaMAX™-Medium, welches mit Fetalem Bovinen Serum (FBS) in einer Konzentration von 10 % sowie Penicillin/Streptomycin in einer Konzentration von 1 % versetzt wurde. Nach Passage 43 fror man die Zellen bei -150°C in CM-1-Medium ein. Für die Experimente taute man sie schonend bei Raumtemperatur auf, um sie dann sofort in RPMI-Medium zu lösen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 Minuten, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem RPMI-Medium resuspendiert. Die Kultur wurde zunächst in T 25-Zellkulturflaschen durchgeführt, ab einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in T 75 Zellkulturflaschen fortgesetzt.

Kultur und Passage

Nach zwei bis drei Tagen einer Kultur bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel. Zunächst erfolgte eine Zellzählung mithilfe einer Neubauer improved Zählkammer: Hierzu wurde ein Aliquot entnommen und in die Zählkammer eingebracht. Vier Quadrate der Fläche 1 mm² wurden ausgezählt und anschließend der Mittelwert gebildet. Bei einer Kammerhöhe von 0,1 mm ergab die Multiplikation des Mittelwerts mit 10 eine Zellzahl pro mm³. Nun wurde die Zellsuspension vollständig abgenommen, in ein Zentrifugen-Gefäß überführt und 10 Minuten mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 15 ml RPMI 1640-Medium resuspendiert. Sobald die Zellen eine Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen/ml erreichten, wurden sie im Verhältnis 1:3 passagiert. Es folgte eine erneute Zentrifugierung der Zellen, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde wieder hinzugefügt und die Zellsuspension auf drei T 75-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Verwendet wurden Zellen von Passage 47 bis zu Passage 59 sowie unbehandelte THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen, überschüssige Zellen und Zellen, die älter als Passage 59 waren wurden verworfen.

Stimulation von THP-1-Zellen mit PMA

Um THP-1-Zellen für die Experimente in einen M₀-Makrophagen Zustand zu versetzen, wurde eine Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) durchgeführt. PMA ist ein etabliertes Mittel zur Differenzierung von THP-1 Zellen in Makrophagen-ähnliche Zellen (Tsuchiya et al., 1982). Dieser Effekt wird vermutlich durch die Aktivierung von PKC-Isoformen mediiert (Mosior und Newton, 1995; Nishizuka, 1988). Für diese Arbeit wurden die THP-1-Zellen zunächst auf eine Platte mit sechs Vertiefungen (6-well-Platte) ausgesät. Je Vertiefung erfolgte dies in einer Menge von $1,5 \times 10^5$ THP-1-Zellen in 1,5 ml RPMI 1640-Medium. Die Zellen wurden weiterhin durch Zusatz von 25 nM PMA zum RPMI 1640-Medium für 48 Stunden aktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und weitere 24 Stunden in gewöhnlichem RPMI 1640-Medium kultiviert. Darauf folgte die Co-Kultur mit IEVs oder Ceramid sowie bei Durchflusszytometrie-Experimenten zusätzlich die Differenzierung in einen M₁- und einen M₂-Phänotyp.

Stimulation von THP-1-Zellen mit EVs

Um die THP-1-Zellen mit IEVs zu stimulieren, wurden die IEVs zunächst aus dem Überstand der HCAEC-Kulturschale isoliert (siehe Abb. 2). Nach Abschluss der Isolation löste man die IEVs in RPMI 1640-Medium. Der Ertrag einer 10 cm-Kulturschale wurde dann für die Co-Kultur mit $1,5 \times 10^5$ THP-1-Zellen verwendet. Neben den Kontroll-IEVs diente RPMI 1640-Medium als Negativ-Kontrolle. Sofern sich an die Inkubationszeit eine RT-PCR anschloss, betrug diese 4 Stunden und 24 Stunden. Für die Durchflusszytometrie-Analyse wurde hingegen eine Inkubationszeit von 24 Stunden und 72 Stunden gewählt. Die Analyse per Durchflusszytometrie erfolgte nur mit PMA-differenzierten THP-1 Zellen nach Stimulation mit IEVs aus mit Glucose behandelten HCAECs.

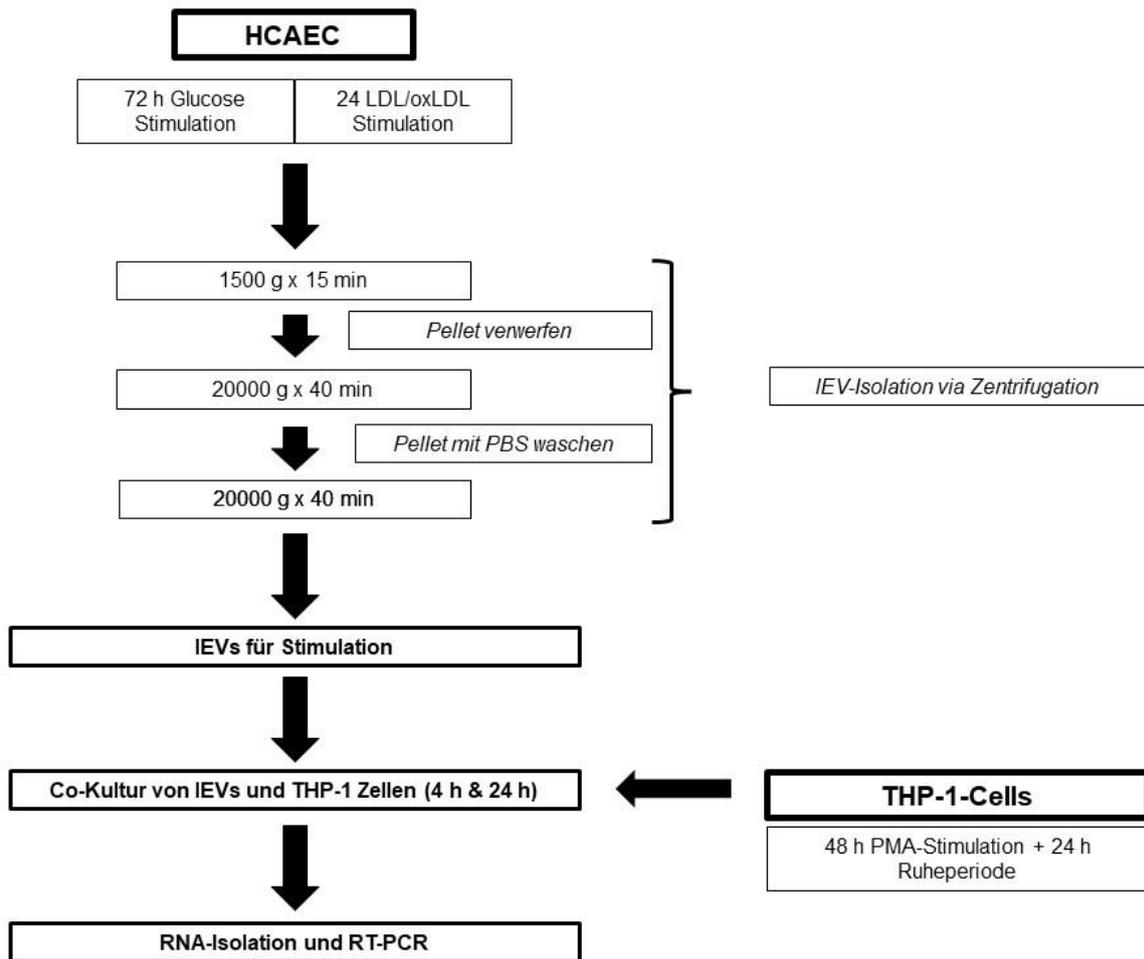


Abb. 2: Protokoll der IEV-Stimulations-Experimente mit anschließender RT-PCR.

Stimulation von THP-1-Zellen mit C16-Ceramid

Die Stimulation PMA-differenzierter THP-1-Zellen erfolgte mit C16-Ceramid in einer Konzentration von 1 μM sowie in einer Konzentration von 10 μM . Als Vehikel-Kontrolle diente Dimethylsulfoxid (DMSO), als Negativ-Kontrolle RPMI 1640-Medium. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

Differenzierung von THP-1-Zellen für Positiv-Kontrollen

Für Experimente mit Durchflusszytometrie wurden Positiv-Kontrollen für die M₁- und M₂-Differenzierung benötigt. Diese waren auch für die Erstellung der Kompensation und der FMO (siehe 2.2.5) notwendig, unbehandelte THP-1-Zellen verwendete man für die Kompensation. Zunächst wurden die THP-1-Zellen für beide Differenzierungsrichtungen mit PMA behandelt, dann mit PBS gewaschen und anschließend mit 25 nM PMA und 20

ng/ml IFN- γ inkubiert. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte zusätzlich die Verwendung von 100 ng/ml LPS (Li et al., 2016a). Bei 72 Stunden Inkubationszeit wurden lediglich 10pg/ml LPS eingesetzt (Hirose et al., 2011), um die Toxizität für die THP-1 Zellen geringer zu halten. Dieses Vorgehen beschreiben Genin et al. als vorteilhaft (Genin et al., 2015). Für die Herstellung eines M₂-Phänotyps wurden die Zellen in Medium mit 25 nM PMA sowie einem Zusatz von 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml IL-13 über 24 h bzw. 72 h inkubiert. Die verlängerte Inkubation von 72 Stunden wurde gewählt, da Genin et al. belegen, dass M₂-Makrophagen-Marker nach dieser Zeit stärker exprimiert werden (Genin et al., 2015).

2.2.4 Genexpressionsanalyse mittels Reverse Transkriptase PCR

Die Analyse der Expression von Genen mithilfe der Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ist eine Standardmethode zur Detektion, Amplifikation und Quantifizierung (dann auch quantitative PCR genannt) von DNA (Heid et al., 1996). Durch reverse Transkription und Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) ist mit Hilfe der PCR außerdem die Analyse von RNA möglich. Hierzu benötigt man die folgenden Schritte: RNA-Isolation aus Zellen, Reverse Transkription und PCR.

RNA-Isolation

Vor Beginn der RNA-Isolation wurde die Arbeitsfläche mit RNase AWAY® gereinigt, um freie RNAsen zu inhibieren. Das zellhaltige Medium wurde nun aus jeder Vertiefung der 6-well-Platte in je ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß (im Folgenden Tube genannt) gefüllt und 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 1 ml PBS erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 rpm. Währenddessen löste man die in den Vertiefungen verbliebenen Zellen in je 500 μ l TRIzol™ und lagerte diese auf Eis. Nach erfolgtem Waschen wurde der Überstand aus dem Hütchen entfernt und die TRIzol™-Lösung aus der 6-well-Platte für jede Probe in das korrespondierende Gefäß überführt. Daraufhin füllte man den gesamten Inhalt eines 2 ml-Gefäßes in ein neues 1,5 ml-Gefäß. An dieser Stelle konnte die Isolation unterbrochen und die Proben in einem Kühlschrank bei -80 °C zwischengelagert werden. Im nächsten Schritt wurde jeder Probe 100 μ l Chloroform zugegeben. Nach einer Bearbeitung mit dem Vortex-Mischgerät für 15 Sekunden wurden die Proben bei 4°C für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die resultierende obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß gegeben, während die Interphase und die untere Phase verworfen wurden (siehe Abb. 3).

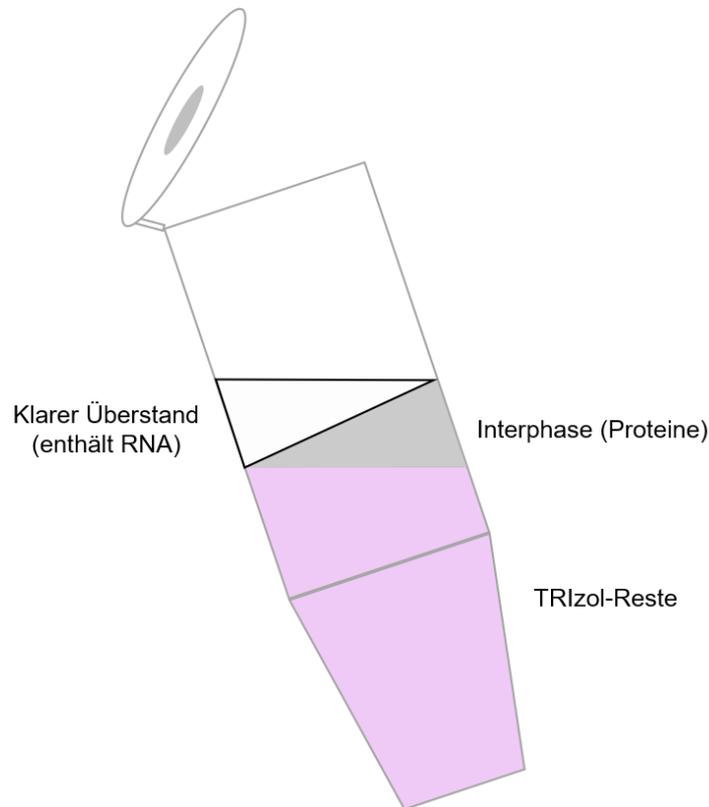


Abb. 3: Schema der RNA-Isolation.

Eppendorf-Reaktionsgefäß mit RNA-Probe nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation. Die obere klare Phase enthält RNA und wird weiterverwendet, der Rest wird verworfen.

Zur oberen Phase wurde Isopropanol im Verhältnis 1:1 hinzugegeben, die Probe drei- bis viermal invertiert und im Anschluss eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert, um das Ausfällen der RNA abzuwarten. Hiernach folgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm, der Überstand wurde verworfen. Das resultierende Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen. Zentrifugation und Ethanol-Zugabe wiederholte man ein weiteres Mal. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wurde das Pellet in 10 µl RNase- und DNase-freiem Wasser gelöst. Die Gefäße wurden auf Eis gelagert und mit dem Nanodrop-Spektralphotometer sowohl die RNA-Konzentration als auch deren Reinheit gemessen.

Transkription in cDNA

Aus der RNA wurde im Folgenden mittels reverser Transkription cDNA erstellt, welche im Anschluss für die PCR genutzt wurde. 0,5 µg der RNA wurden in 12 µl RNase- und DNase-freiem Wasser gelöst. Außerdem wurde ein Mastermix mithilfe des Omniscript® RT Kit erstellt (Tab. 7). Durch das Volumen von 8 µl Mastermix ergab dies einen Ansatz mit insgesamt 20 µl Reaktionsvolumen. Die so vorbereiteten Proben wurden in 0,2 ml SoftTubes über 60 min bei 37°C im Thermocycler zur Reaktion gebracht. Nach Abschluss wurden die Proben bei -20°C bis zur Verwendung für die PCR gelagert.

Tab. 7: Reaktionsansatz der reversen Transkription

Mastermix	µl/Reaction
dNTPs	2
10x Puffer	2
10x Random Primer	2
Reverse Transkriptase	1
RNAsin	0,2
dH2O	0,8
Gesamt	8 µl
RNA	+12µl
Reaktionsvolumen	= 20 µl

Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurde mit Primern nach dem TaqMan-Prinzip durchgeführt. TaqMan-Sonden sind mit einem Reporter (Fluoreszenz-Quelle) und einem Quencher (Unterdrücker der Fluoreszenz) ausgestattet, die an unterschiedlichen Enden der Sequenz lokalisiert sind. Solange der Primer intakt ist, wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Wird die Sonde zur Amplifikation genutzt, wird der Reporter abgespalten und somit nicht länger unterdrückt. Am Ende jedes Reaktionszyklus wird die Signalintensität gemessen, die bei stetiger Amplifikation zunächst exponentiell ansteigt. In dieser Phase ist die Messung sehr akkurat, da die Hintergrundfluoreszenz gering ist. Der Zyklus, in dem der exponentielle Anstieg zuerst

auftritt, ist der Cycle Threshold (CT). Er wird für die anschließende Auswertung verwendet, die nach der $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode erfolgt. Für diese vergleichende Methode wird stets eine endogene Kontrolle benötigt (Heid et al., 1996; Livak und Schmittgen, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die quantitative RT-PCR-Primer zum Nachweis von TNF- und IL-10-codierender DNA eingesetzt. Als endogene Kontrolle wurden außerdem 18S (für Experimente mit vorhergehender Ceramid-Stimulation) sowie GAPDH (für Experimente mit IEV-Stimulation) herangezogen. Zu Beginn wurde die cDNA jeder Probe im Verhältnis 1:8 mit H₂O verdünnt, entsprechend einem Reaktionsvolumen von 9 µl pro Ansatz. Außerdem wurde jeder Primer mit der Master-Mix-Reagenz kombiniert: 1 µl 20x-Sonde und 10 µl TaqMan™ Gene Expression Master Mix pro Reaktion ergaben 11 µl pro Ansatz. Das Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl wurde in eine Vertiefung einer 96-well-Platte gegeben. Für jede Probe wurden drei unabhängige Reaktionen vorbereitet, die 96-well Platte wurde dann mit einer Folie versiegelt. Die Durchführung der quantitativen RT-PCR Reaktion erfolgte mithilfe einer 7500 HT Real-time PCR Maschine. Zunächst wurde die Platte 2 Minuten bei 50 °C und dann 10 Minuten bei 95 °C erwärmt. Es schlossen sich 50 Zyklen des folgenden Algorithmus an: Erwärmung bei 95 °C für 15 Sekunden, danach 60 Sekunden bei 60°C. Die Berechnung der Ergebnisse in Tabellenform erfolgte mithilfe der international anerkannten $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001), die mithilfe von Microsoft Excel® durchgeführt wurde. Die Formeln wurden hierzu selbstständig in die Tabelle eingefügt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

McKinnon (2018) charakterisiert „Durchflusszytometrie [als] eine Technologie, die eine schnelle, multiparametrische Analyse von Einzelzellen in Lösung liefert. Durchflusszytometer nutzen Laser als Lichtquelle um gestreute und fluoreszierende Lichtsignale zu erzeugen, welche durch Detektoren, wie Photodioden oder Photoelektronenvervielfacher, gelesen werden. Diese Signale werden in elektrische Signale umgewandelt, welche von einem Computer analysiert und in ein standardisiertes Datenformat (.fcs) übertragen werden“.

In den vorliegenden Experimenten wurden Fluorochrom-gebundene Antikörper genutzt. Sie binden an Strukturen der Zellen, werden von den Lichtstrahlen getroffen und emittieren Licht eines charakteristischen Spektrums. Anhand des spezifischen Antikörper-

Signals sowie einer charakteristischen Lichtstreuung nach vorne und zur Seite (Forward-scatter, FSC und Sideward-scatter, SSC) lassen sich die Einzelzellen klassifizieren und differenzieren. Zumeist wird eine Kompensation der überlappenden Lichtspektren vorgenommen, um falsch positive Ergebnisse zu minimieren (Adan et al., 2017). Die Auswertung erfolgt mit spezialisierter Software (z.B. FlowJo™).

In Vorbereitung auf die Experimente wurde die optimale Konzentration für jeden Antikörper anhand von Verdünnungsreihen (1/200, 1/100, 1/50 und 1/25) und anschließender Bestimmung eines Trennungs-Index (separation index) festgelegt. Mit ‚signal‘ ist hier die gefärbte Zellpopulation bezeichnet, mit ‚background‘ die ungefärbte Kontrollpopulation (Telford et al., 2009):

$$\text{Separation Index: } \frac{(\text{median signal} - \text{median background})}{[(84.\text{percentile background} - \text{median background})/0,995]}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen CD80, CD86, CD163 sowie gegen CD206 verwendet. Die Zellen löste man gemäß Herstellerprotokoll nach Ablauf der Kulturzeit mit Trypsin-EDTA und wusch sie mit PBS. Zur Fixierung wurden sie dann über 20 Minuten bei 4°C in 1%-Formaldehyd-Lösung gelagert. Anschließend wurden die Zellen sorgfältig in 100 µl PBS gelöst und mit 2,5 µg humanem F_c-Block für 10 Minuten inkubiert. Hintergrund ist, eine unspezifische Bindung des F_c-Fragments der färbenden Antikörper durch die THP-1-Zellen zu verhindern. Nachdem jede Probe für 10 Sekunden auf einem Vortex gemischt wurde, erfolgte die Antikörper-Färbung entsprechend folgender Tabelle:

Tab. 8: Verwendete Konzentration der Antikörper in der Durchflusszytometrie

Antigen	Fluoreszenz	Lösungsverhältnis
CD80	FITC	1/25
CD86	BV 421	1/100
CD163	BV 510	1/100
CD206	PE	1/25

Nach Zugabe von 300 µl PBS erfolgte die Auswertung der Proben an einem BD FACS Canto™ II mithilfe der BD FACS Diva™-Software; dabei wurden 10.000 Events je Probe registriert.

Für die Kompensation wurden zu gleichen Teilen undifferenzierte THP-1-Zellen, M₁-differenzierte und M₂-differenzierte THP-1-Zellen verwendet. Für jeden Antikörper erfolgte die Erstellung einer Probe mit einer Einzelfärbung (single staining) und eine gänzlich ohne Färbung (unstained). Anschließend wurde der Anteil des unspezifischen Fluoreszenz-Signals aus der ungefärbten Probe vom Gesamtsignal der gefärbten Probe subtrahiert, um so die Antikörper-spezifische Fluoreszenz festzulegen (Abb. 4). Außerdem wurde ein Fluorescence-minus-one-Ansatz (FMO) durchgeführt, um ein falsch-positives Signal der Detektoren der jeweiligen Fluoreszenzen auszuschließen: Hierzu wurde eine Probe mit allen verwendeten Antikörpern gefärbt (full staining) und Proben erstellt, in denen jeweils einer der insgesamt vier Antikörper fehlte, die Fluorescence-Minus-One (FMO)-Probe. Es erfolgte ein Vergleich der FMO-Proben mit der Full-Staining-Probe (Abb. 5). Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgten mithilfe von FlowJo™-Software der Version 10.0.8.r1, die Berechnung der Verhältnisse der positiven Events je Zellpopulation erfolgte mit Microsoft Excel®.

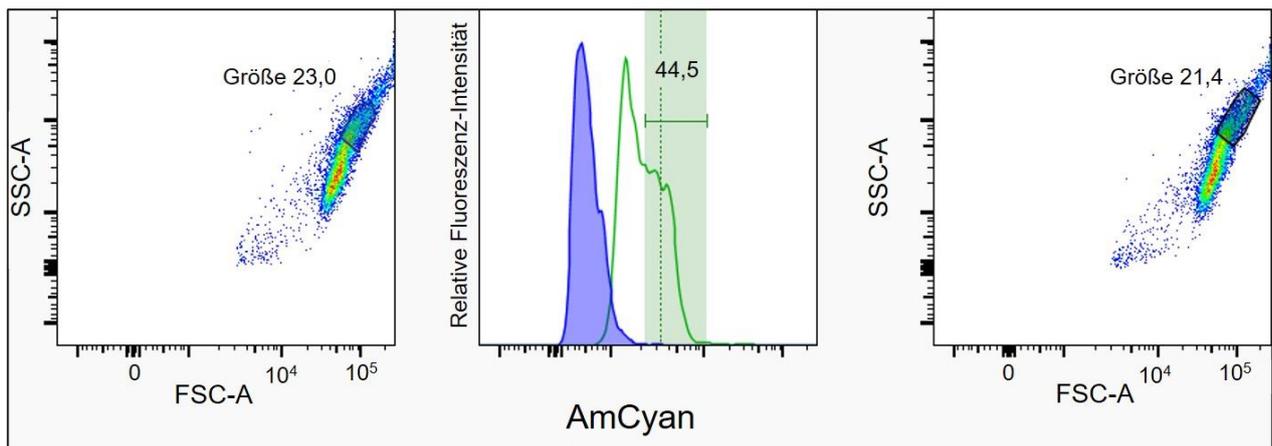


Abb. 4: Kompensation am Beispiel des Fluorochroms AmCyan:

Linke und rechte Graphik: Darstellung der Population, welche für die Kompensation herangezogen wurde. Die mittlere Graphik zeigt die Subtraktion des Signals der ungefärbten Population (blaue Fläche) von dem Signal der gefärbten Population (grüner Graph). Der resultierende Bereich (grüne Fläche) ist die Signalstärke, bei der im Versuch ein Signal als positiv definiert wurde.

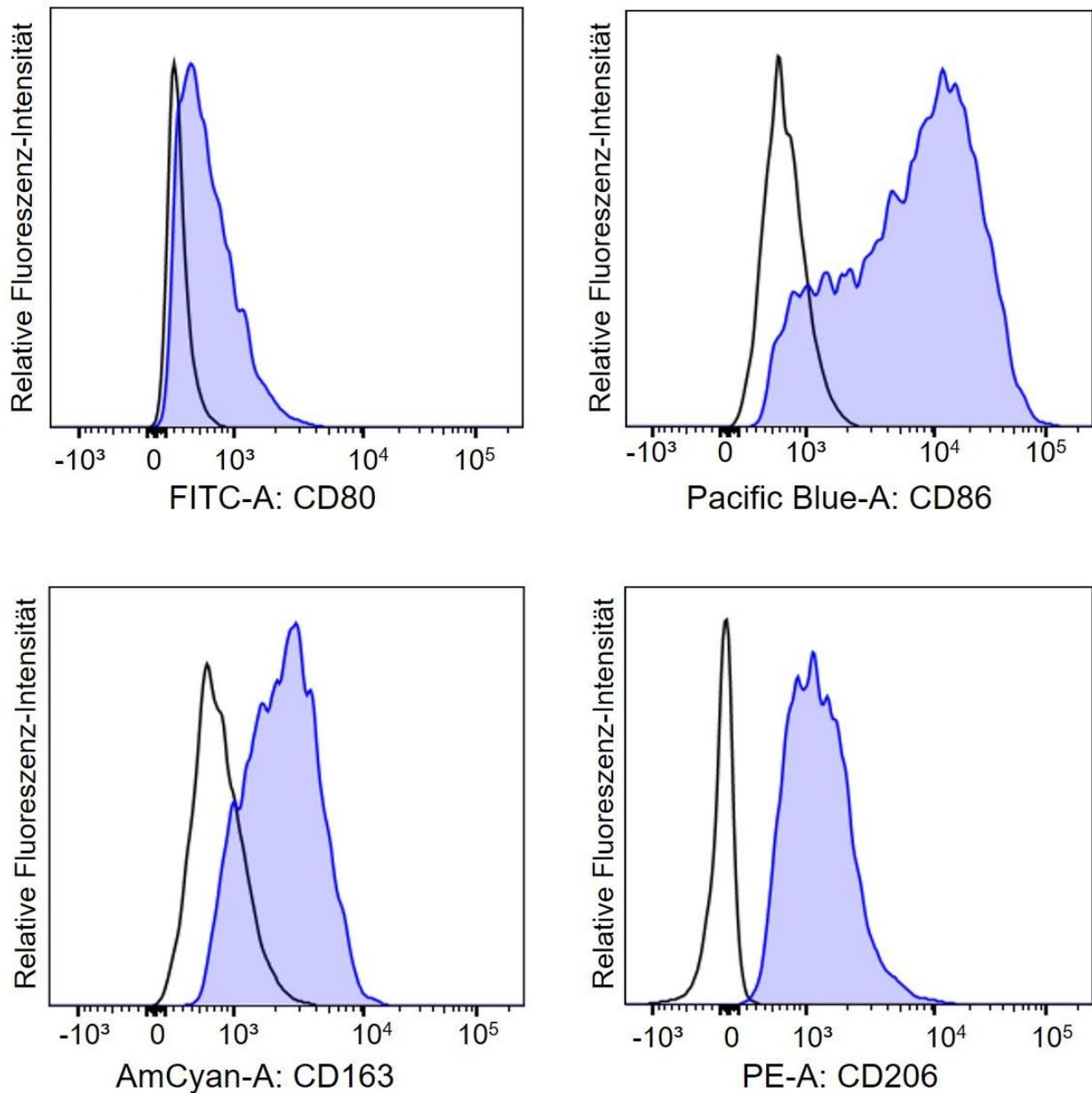


Abb. 5: Vergleich von FMO-Proben (schwarzer Graph) und Full-Staining-Probe (blaue Fläche).

Es wurde für alle Kanäle gezeigt, dass es, verglichen mit der FMO-Probe, in Anwesenheit des Fluorochroms zu einer deutlichen Signalverstärkung kommt. Darstellung mittels FlowJo™-Software.

Zu Beginn der Auswertung der Experimente erfolgte das Setzen von Gates. Hierbei wurden in der Darstellung von FSC (abhängig vom Volumen der Zelle) gegen SSC (abhängig von der Granularität der Zelle) nur Zellen eingeschlossen, die im für

Makrophagen definierten Bereich liegen; undifferenzierte THP-1-Zellen wurden somit ausgeschlossen. Anschließend erfolgt der Ausschluss von Zelldubletten mithilfe von SSC-H (H für Height) und SSC-A (A für Area) (Bushnell, 2018).

Die Signale für jedes Fluorochrom wurden einzeln als Histogramm dargestellt und anhand der Kompensation festgelegt, ab welcher Intensität das Signal als positiv gewertet wird (Abb. 6). 10^4

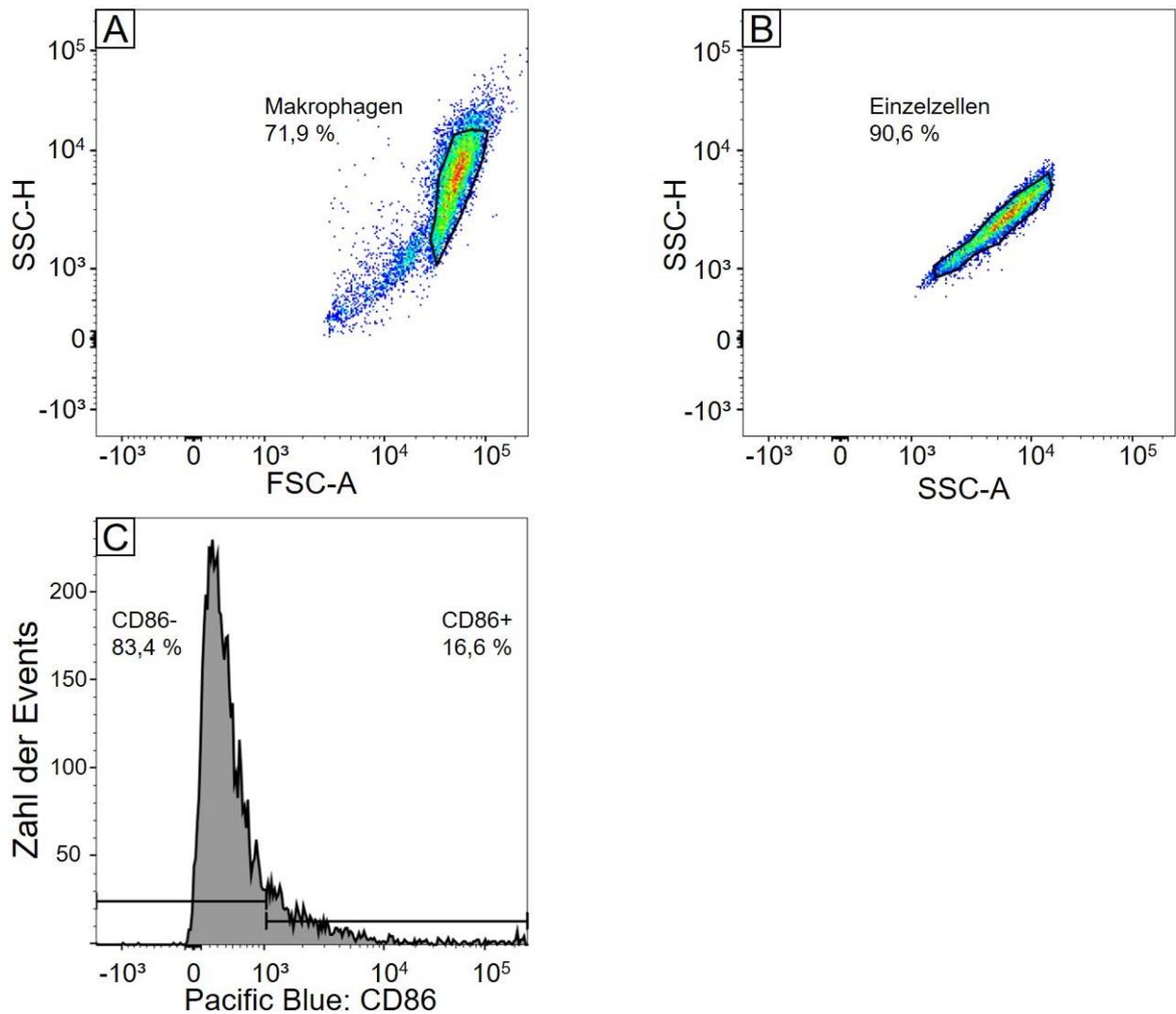


Abb. 6: Vorgehen beim Setzen der Gates für FACS-Experimente am Beispiel des Fluorochroms Pacific Blue.

A) Definition der Makrophagen-Population mithilfe der Darstellung von SSC-A zu FSC-A.

B) Ausschluss von Zelldubletten mithilfe der Darstellung von SSC-H zu SSC-A.

C) Unterscheidung der Merkmal-positiven und -negativen Populationen im Histogramm, Darstellung der registrierten Ereignisse im Verhältnis zur Signalintensität.

Graphik erstellt mithilfe von FlowJo™-Software.

2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Statistik erfolgten mithilfe von GraphPad Prism®. Für die Erstellung von Infographiken wurde Microsoft PowerPoint® verwendet. Es erfolgte jeweils die Untersuchung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die vergleichende Auswertung erfolgte mithilfe einer einseitigen

Varianzanalyse (One way ANOVA) und dem Tukey-Test (Tukey's multiple comparisons test) als *Post-hoc*-Verfahren. Dargestellt wurden stets der Mittelwert und der Standardfehler (SEM). Der P-Wert wurde der Übersicht halber in einigen Graphischen Darstellungen abgekürzt (Tab. 9).

Tab. 9: Abkürzungen der p-Werte

Nicht signifikant	n.s.
$P < 0,05$	*
$P < 0,01$	**
$P < 0,001$	***
$P < 0,0001$	****

3. Ergebnisse

3.1 IEVs aus oxLDL-behandelten Endothelzellen lösen in THP-1 Zellen keine phänotypische Differenzierung aus

Eine Hypercholesterinämie trägt signifikant zur Bildung atherosklerotischer Plaques in der Gefäßwand bei. Hierbei kommt es zur Endotheldysfunktion und dem Einwandern von Makrophagen bzw. der Transdifferenzierung ortsständiger glatter Muskelzellen zu Makrophagen. Aus ihnen entstehen durch den Einfluss von oxidiertem LDL Schaumzellen.

Im folgenden Experiment wurde der Einfluss von extrazellulären Vesikeln aus oxLDL- und LDL-behandelten Endothelzellen auf die Differenzierung von THP-1 Zellen untersucht. HCAECs wurden mit oxLDL- respektive LDL-versetztem Medium kultiviert. Die anschließend isolierten IEVs wurden mit unbehandelten THP-1 Zellen co-kultiviert. Kontroll-IEVs wurden aus HCAECs mit PBS-haltigem Medium isoliert; als Negativ-Kontrolle diente zellfreies RPMI 1640-Medium. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR-Experimenten. Für eine M₁-Differenzierung wurde TNF verwendet als Marker für eine M₂-Differenzierung IL-10.

Die Ergebnisse zeigen, dass es zu keiner signifikanten Änderung der TNF-Expression unter Einfluss von oxLDL-, LDL- oder Kontroll-IEVs kommt. Der p-Wert von Kontrolle zu Kontroll-IEVs betrug 0,56. Das IL-10 konnte in der PCR nicht mit ausreichender Signalstärke nachgewiesen werden (Abb. 7).

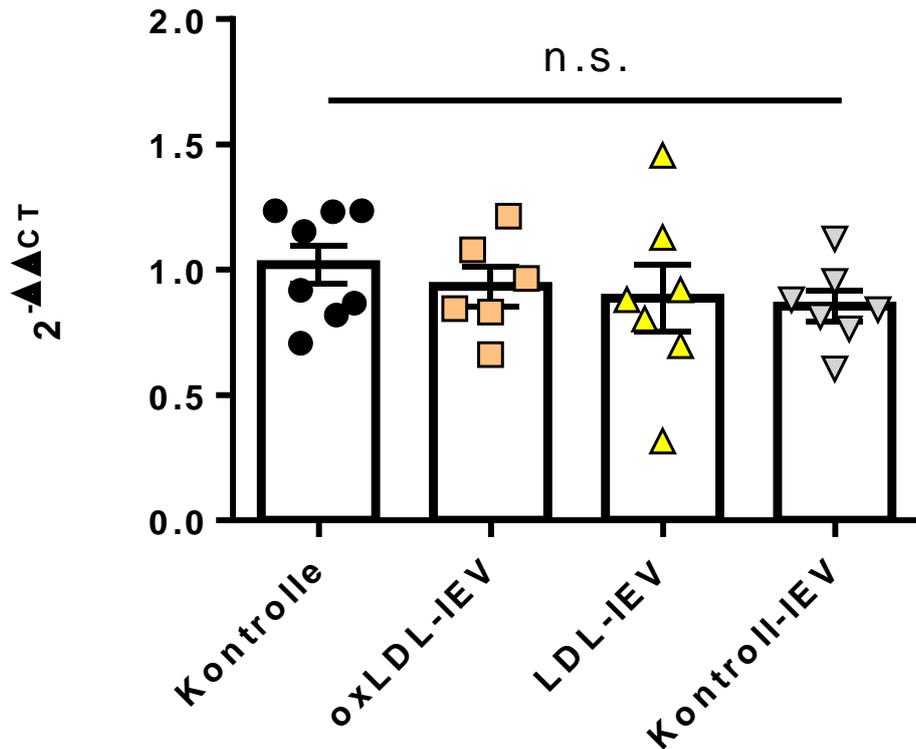


Abb. 7: TNF-Expressionsverhalten oxLDL und LDL-IEV-stimulierter THP-1-Zellen

Unbehandelte THP-1-Zellen verändern ihr TNF-Expressionsmuster unter Einfluss von LDL- und oxLDL-IEVs nicht.

Co-Kultur über 24 h. Analyse *via* RT-qPCR. Internes Kontrollgen GAPDH (Mittelwert \pm SEM, n=5-6).

3.2 IEVs aus oxLDL-behandelten Endothelzellen erzeugen in PMA-stimulierten THP-1 Zellen keine Änderung der Differenzierung

Unbehandelte THP-1 Zellen weisen Ähnlichkeiten mit Monozyten auf. Eine Behandlung mit PMA verursacht in THP-1 Zellen eine Differenzierung zu einem Phänotyp, der mehr Gemeinsamkeiten mit M₀-Makrophagen aufweist. Mit diesem Wissen überprüften wir in folgendem Experiment, ob PMA-behandelte THP-1 Zellen auf Co-Kultur mit IEVs mit einer Genexpressionsänderung reagieren. Des Weiteren untersuchten wir, ob eine Inkubationszeit von vier Stunden eine Änderung der Genexpression im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 24 Stunden bewirkt. HCAECs wurden mit ox-LDL und LDL behandelt.

Kontroll-IEVs wurden aus HCAECs mit PBS-haltigem Medium isoliert, als Negativ-Kontrolle diente zellfreies RPMI 1640-Medium.

Die TNF-Expression der oxLDL-Gruppe zeigte keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe, weder nach vier noch 24 Stunden Inkubationszeit. Die IL-10-Expression wies einen Trend zu geringeren Konzentrationen nach vier Stunden auf, war jedoch statistisch nicht signifikant different. Nach 24 Stunden war die IL-10 Expression annähernd auf dem Niveau der Kontrollgruppe (siehe Abb. 8). Kontroll-IEVs und LDL-IEVs erzeugten ebenfalls keinen signifikanten Effekt und veränderten die Genexpression kaum.

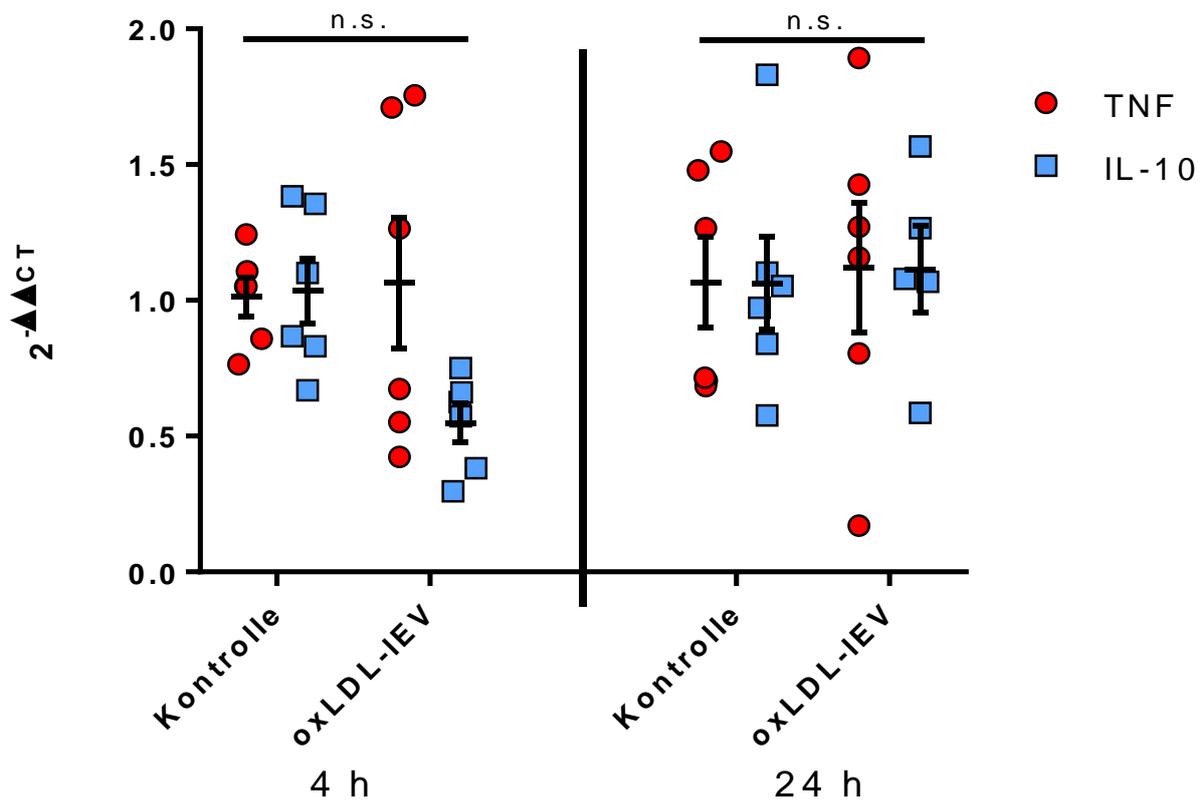


Abb. 8: Genexpression (TNF und IL-10) von PMA-differenzierten THP-1-Zellen nach 4 h und 24 h Co-Kultur mit oxLDL-IEVs.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung, jedoch eine tendentiell niedrigere IL-10 Expression nach 4 h. Analyse *via* RT-qPCR. Internes Kontrollgen GAPDH. (Mittelwert \pm SEM, n=5-6).

3.3 IEVs aus Glucose-behandelten Endothelzellen haben differenzierte Auswirkungen auf PMA-stimulierte THP-1 Zellen

LEVs reduzieren die TNF-Expression, Glucose verändert die zeitliche Dynamik

OxLDL-IEVs zeigten einen Trend, jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression von PMA-differenzierten THP-1-Zellen. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde das folgende Experiment geplant und durchgeführt. Zur Stimulation der HCAECs wurde dem Medium Glucose zugefügt. Die Vehikel-Kontrolle (HCAECs mit PBS) und Negativ-Kontrolle (zellfreies RPMI 1640-Medium) wurden wie in den vorherigen Experimenten ausgewählt. Die Co-Kultur wurde vier und 24 Stunden durchgeführt.

Nach vier Stunden zeigte sich eine deutlich signifikante Verminderung der TNF-Expression ($p < 0,0001$) in der Glucose-IEV-Gruppe gegenüber der Kontrolle. Die IL-10 Produktion hingegen veränderte sich nicht signifikant. Nach 24 Stunden hatte sich die TNF-Expression ebenfalls normalisiert (siehe Abb. 9).

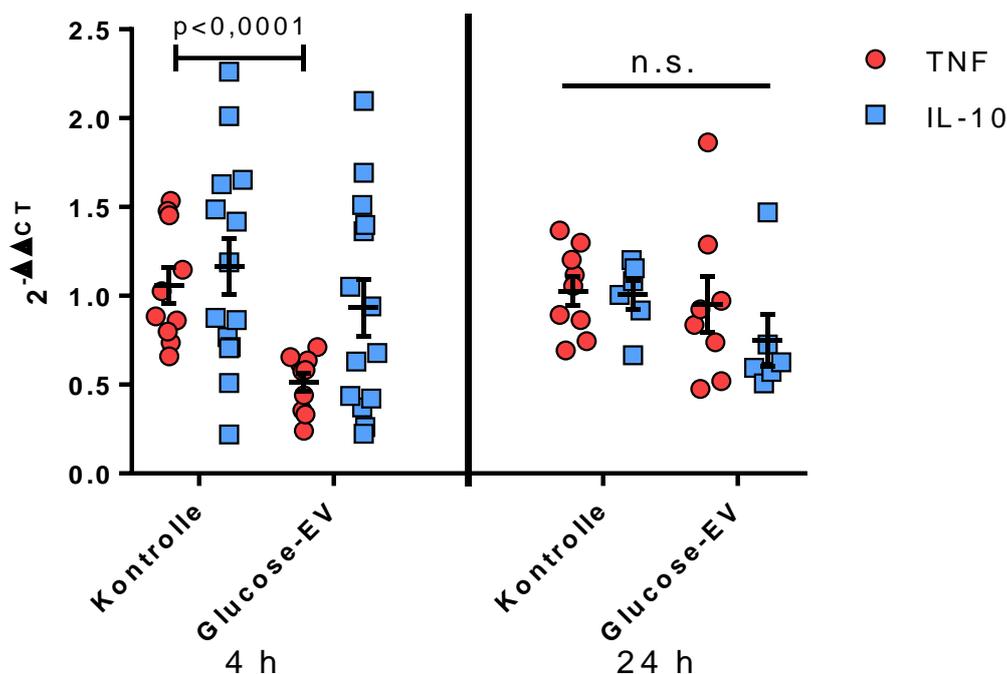


Abb. 9: Effekte von Glucose-IEVs im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

IEVs aus Glucose-behandelten HCAECs inhibierten die TNF-Expression in PMA-behandelten THP-1 Zellen. Analyse *via* RT-qPCR. Internes Kontrollgen GAPDH (4 h: $n=10$. 24 h $n=8$, Mittelwert \pm SEM, n.s.=nicht signifikant).

Bemerkenswert waren die Effekte auf Kontroll-IEVs. Sie unterschieden sich nicht signifikant von denen der Glucose-IEVs, zeigten jedoch eine andere zeitliche Dynamik. Während die Glucose-Gruppe keine verminderte TNF-Expression gegenüber der Kontroll-IEV-Gruppe aufwies (nicht signifikant; Abb. 10), zeigten die Kontroll-IEVs für TNF eine verminderte Expression gegenüber der Kontrolle nach vier Stunden Inkubation ($p < 0,001$, Abb. 11). Nach 24 Stunden normalisierte sich dieser Effekt langsam im Vergleich zur Glucose-IEV Gruppe: Die Kontroll-IEV Gruppe war knapp nicht signifikant gegenüber der Glucose-IEV Gruppe reduziert ($p = 0,09$, Abb. 10) und zeigte zudem eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontroll-Gruppe (Abb. 11), während sich die Glucose-Gruppe beinahe vollständig normalisiert hatte.

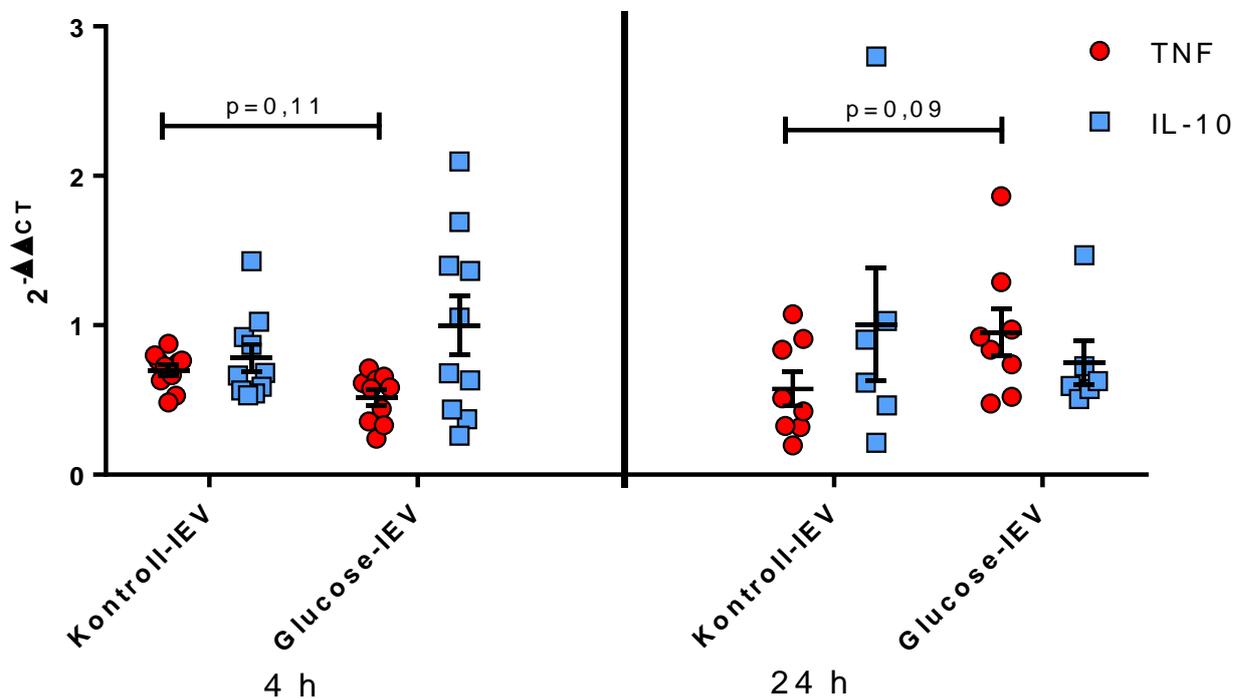


Abb. 10: Effekte von Glucose-IEVs im Vergleich zu Kontroll-IEVs

Glucose-IEVs exprimierten TNF nicht signifikant anders, verglichen mit Kontroll-IEVs. Negativ-Kontrolle nicht dargestellt. Analyse *via* RT-qPCR. Internes Kontrollgen GAPDH. (4 h $n=10$, 24 h $n=7$, Mittelwert \pm SEM).

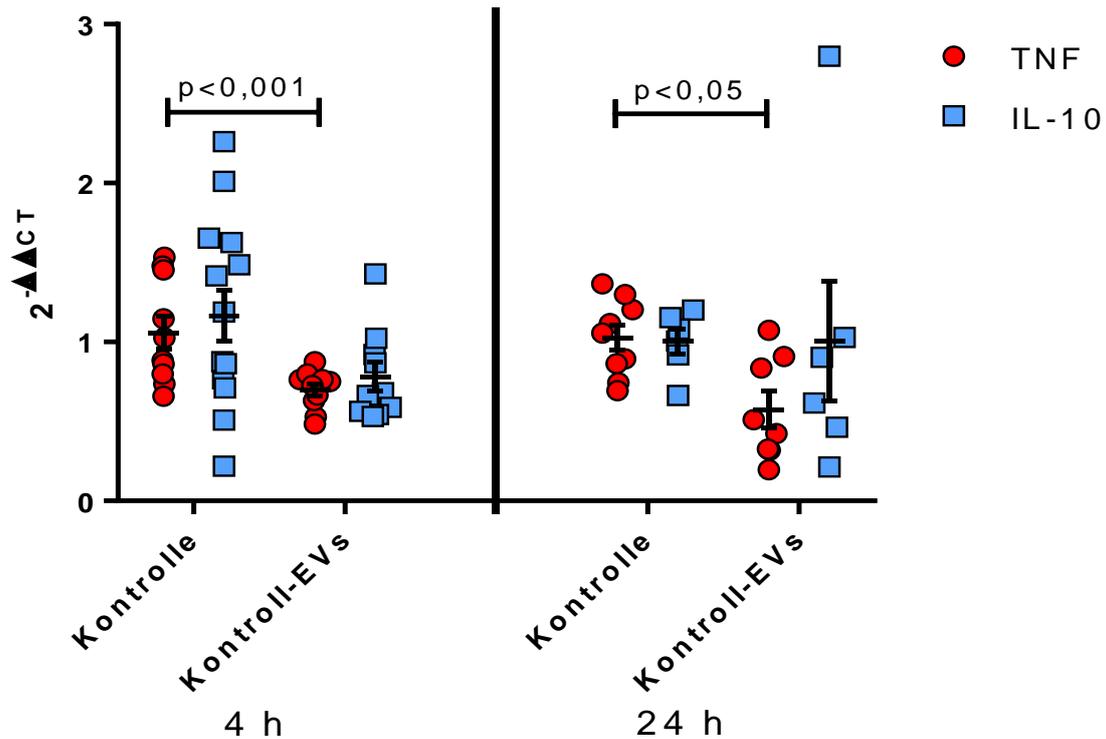


Abb. 11: Effekte von Kontroll-IEVs im Vergleich zur Negativkontrolle

Kontroll-IEVs exprimierten signifikant weniger TNF als die Negativkontrolle. Der Effekt war konsistent über 4 h und 24 h. Analyse *via* RT-qPCR. Internes Kontrollgen GAPDH. (4 h n=10, 24 h n=7, Mittelwert \pm SEM).

LEVs erhöhen die Expression von CD80, Glucose verändert die zeitliche Dynamik. CD163 und CD206 zeigen keine spezifischen Veränderungen

Um den *via* RT-PCR festgestellten Effekt zu bestätigen, wurden Durchflusszytometrieexperimente unternommen. Neben der Negativ-Kontrolle, den Kontroll-IEVs und den Glucose-IEVs gab es Positiv-Kontrollen für den M₁-Phänotyp und den M₂-Phänotyp. Diese wurden nach PMA-Stimulation mit LPS und IFN- γ (M₁) bzw. IL-4 und IL-13 (M₂) erzeugt. Die Inkubationszeit wurde auf 24 Stunden und 72 Stunden festgelegt.

Effekte auf die Positiv-Kontrollen

Betrachtet man die Positiv-Kontrollen, so zeigt sich, dass die M₁-Marker CD80 und CD86 in der M₁-Positiv-Kontrolle nach 24 Stunden deutlich erhöht waren. Dies war sowohl gegenüber der Negativ-Kontrolle als auch gegenüber der M₂-Gruppe deutlich signifikant (jeweils $p < 0,0001$; Abb. 12). Die M₂- Positiv-Kontrolle war bezüglich der CD86-Expression

ebenfalls gegenüber der Negativ-Kontrolle erhöht ($p=0,0005$), quantitativ jedoch deutlich geringer als die M₁- Positiv-Kontrolle.

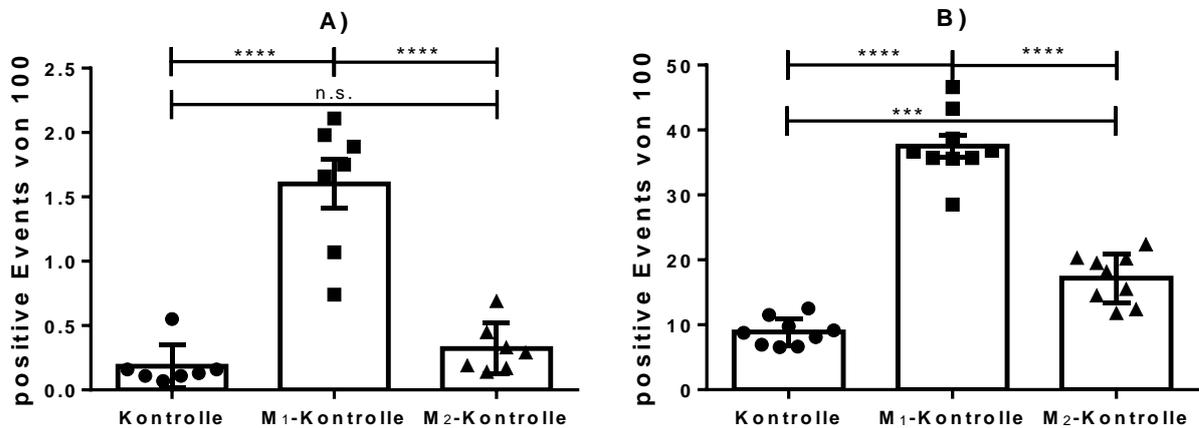


Abb. 12: Expression der M₁-Marker CD80 (A) und CD86 (B) nach 24 h.

Die Polarisierung der PMA-aktivierten THP-1-Zellen in der Positiv-Kontrolle für M₁-Makrophagen erzeugte einen signifikanten Anstieg der Expression der M₁-Marker CD80 und CD86. Die M₂-Polarisierung erzeugte keine signifikante Änderung für CD80, jedoch einen Anstieg von CD86 gegenüber der Kontrolle. Analyse *via* Durchflusszytometrie. (CD80 n=7, CD86 n=9, Mittelwert±SEM, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, n.s.= nicht signifikant).

Die Polarisierung zu einem M₂-Phänotyp rief keinen signifikanten Anstieg der jeweiligen Marker (CD163 und CD206) hervor. Nach 24 Stunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber M₁-Positivkontrolle und Negativ-Kontrolle (Abb. 13).

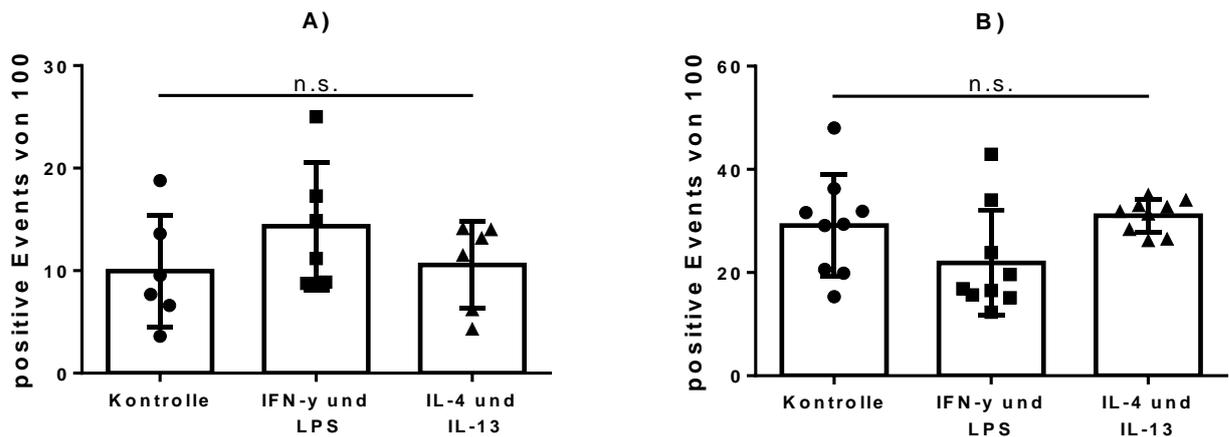


Abb. 13: M₂-Marker-Expression nach 24 h.

Die Polarisierung der M₂-Positivkontrollgruppe zeigte keine signifikante Veränderung der Expression der M₂-Marker CD163 (A) und CD206 (B) nach 24 h. Analyse *via* Durchflusszytometrie. (Mittelwert±SEM, CD163 n=6, CD206 n=9, n.s. = nicht signifikant).

In der Auswertung nach 72 Stunden zeigte sich bei CD80 keine signifikante Änderung der Expression gegenüber der Kontrollgruppe. CD86 wurde vermehrt in M₂-polarisierten Zellen exprimiert. Sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber den M₁-polarisierten Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung (Abb. 14).

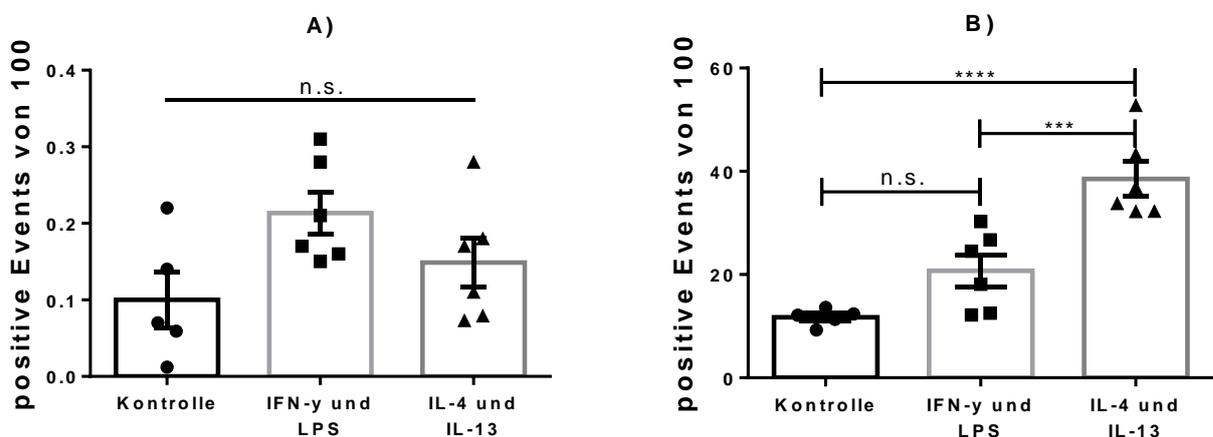


Abb. 14: Expression der M₁-Marker CD80 (A) und CD86 (B) nach 72 h.

Bei längerer Inkubation zeigte sich kein signifikanter Anstieg der CD80 Expression. CD86 wird von M₂-polarisierten Zellen deutlich vermehrt gebildet. Analyse *via* Durchflusszytometrie. (n=5-6, Mittelwert ±SEM, n.s. = nicht signifikant, ***p<0,001, ****p<0,0001).

CD163 zeigte keine signifikante Änderung der Expression nach Polarisation in M₁- oder M₂-Phänotyp. CD206 war bei M₁- und M₂-polarisierten Zellen signifikant höher als bei der Kontrolle, jedoch zeigte sich keine Signifikanz im Unterschied zwischen den jeweiligen Polarisationsarten (Abb. 15).

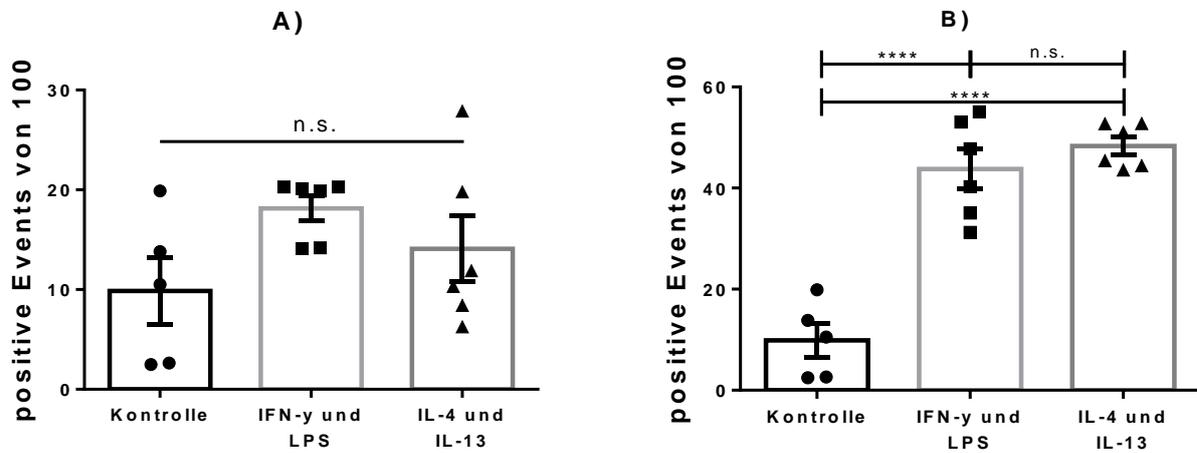


Abb. 15: Expression der M₂-Marker CD 163 (A) und CD206 (B) nach 72 h.

CD163 zeigte keinen spezifischen Anstieg der Expression. CD206 wird bei M₁ und M₂ deutlich vermehrt exprimiert. Analyse *via* Durchflusszytometrie. (n=5-6, Mittelwert \pm SEM, n.s.=nicht signifikant, ****p<0,0001)

Effekte auf die Versuchsgruppen

Nach 72 Stunden war CD80 durch Glucose-IEVs und Kontroll-IEVs gegenüber der Negativ-Kontrolle signifikant vermehrt exprimiert. Die M₁-Kontrolle war gegenüber den Versuchsgruppen reduziert. Die Kontroll-IEVs waren in ihrem Expressionsverhalten gegenüber den Glucose-behandelten IEVs nicht nachweisbar verändert. Die Glucose-IEV-Population zeigte bereits nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung von CD80 gegenüber der Negativ-Kontrolle. In der M₁-Kontrolle war CD80 gegenüber allen anderen Versuchsgruppen zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht exprimiert. Die M₂-Kontrolle (hier nicht gezeigt) war zu keiner Zeit signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

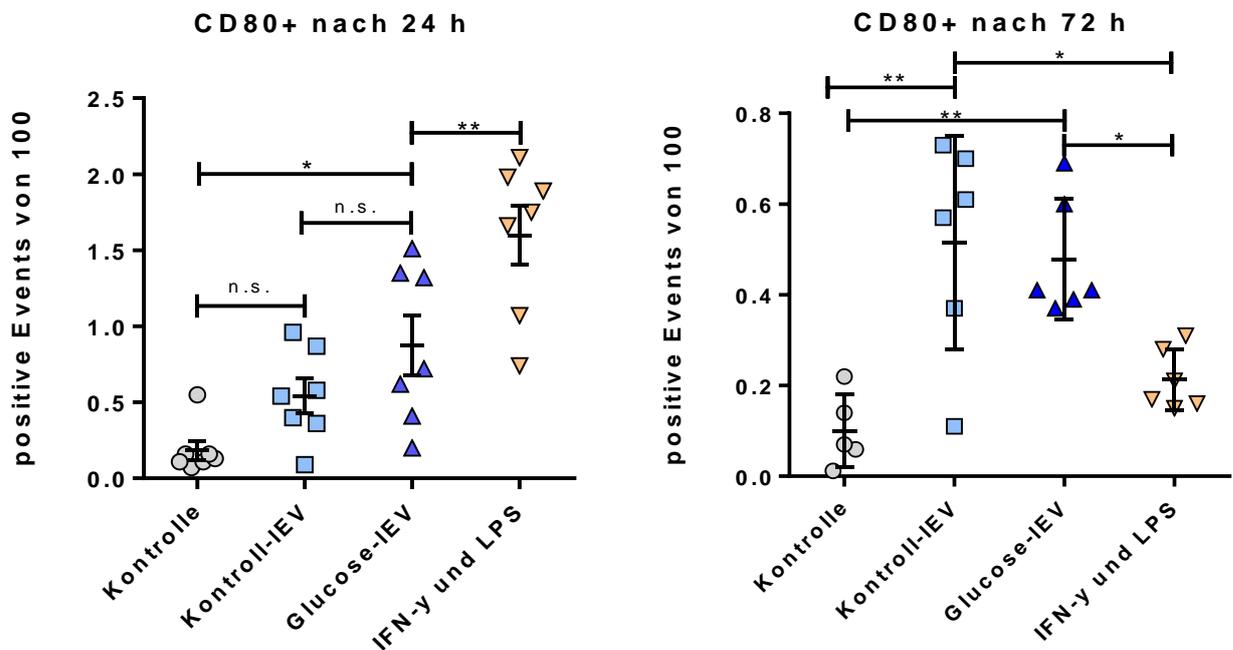


Abb. 16: Expression des M₁-Markers CD80 unter Einfluss von IEVs im Zeitverlauf.

CD80 ist nach 72 h durch IEV-Einfluss signifikant gegenüber der Negativ-Kontrolle erhöht. Glucose beschleunigt diesen Effekt, sodass er bereits nach 24 h auftritt. Die M₁-Kontrolle (IFN-γ und LPS) ist nach 24 h erhöht exprimiert. Analyse *via* Durchflusszytometrie. (n=7, Mittelwert ±SEM, n.s.=nicht signifikant *p<0,05, **p<0,01)

Betrachtet man die Expression von CD86 in den Versuchsgruppen mit Glucose-IEVs und Kontroll-IEVs, so zeigte sich keine signifikante Veränderung gegenüber der Negativ-Kontrolle.

CD163 zeigte in keiner der Versuchsgruppen oder Kontrollen einen signifikanten Unterschied. Nach 24 Stunden Inkubationszeit war CD206 in keiner Population signifikant verändert. Nach 72 Stunden zeigte sich die oben beschriebene Erhöhung in der M₁- sowie in der M₂-Population (Abb. 17).

Somit war CD80 durch Einfluss von IEVs mit und ohne Glucose nach 72 h erhöht. Durch Glucose wurde der Unterschied schneller, und zwar nach 24 Stunden, auffällig. Die übrigen untersuchten Differenzierungsmerkmale waren nicht verändert, oder nicht geeignet eine Differenzierung zu detektieren, da sie in mehreren Populationen zugleich und somit unspezifisch erhöht waren.

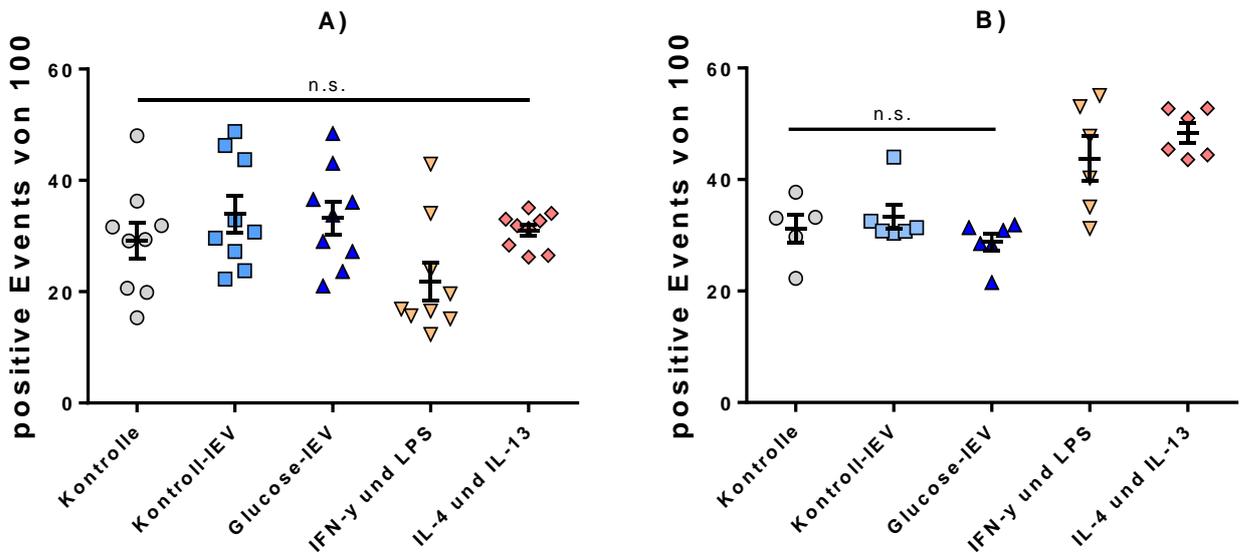


Abb. 17: Expression des M₂-Markers CD206 unter Einfluss von IEVs im Zeitverlauf. CD206 war nach 24 h (A) weder in Versuchsgruppen noch Kontrollen signifikant verändert. Nach 72 h (B) war CD206 in M₁- und M₂-Kontrolle signifikant erhöht. Die Versuchsgruppen sind demgegenüber erniedrigt, unterscheiden sich jedoch nicht von der Negativ-Kontrolle. Analyse *via* Durchflusszytometrie. (n=5-6, Mittelwert ±SEM, n.s.=nicht signifikant)

3.4 C16-Ceramid erhöht die IL-10-Expression während DMSO die TNF-Sekretion fördert

Ein Bestandteil von IEVs und teils auch Mediator ihrer Effekte ist das Sphingolipid Ceramid. Um die direkten Auswirkungen dieses Moleküls auf die Polarisation von PMA-behandelten THP-1-Zellen zu ergründen, wurden PMA-differenzierte THP-1-Zellen mit niedrig- und hochkonzentriertem Ceramid inkubiert. Anschließend wurde das Experiment mittels RT-PCR ausgewertet.

Die TNF-Expression war signifikant erhöht in der 10 μ M- und der Vehikel-Kontrolle (DMSO). Somit war die Erhöhung auf das DMSO zurückzuführen, wobei ein zusätzlicher Effekt des Ceramids nicht auszuschließen ist. Grundlage dieser Annahme war eine vermeintlich geringere Erhöhung der TNF-Expression bei Zugabe von 1 μ M Ceramid im Vergleich zu 10 μ M Ceramid. Dieses Ergebnis war jedoch statistisch nicht signifikant. Die IL-10 Expression zeigte sich in Negativ-Kontrolle, Vehikel-Kontrolle (DMSO) und in der Gruppe mit 1 μ M Ceramid sehr ähnlich. In der Gruppe mit 10 μ M konzentriertem Ceramid zeigte sich eine deutliche Erhöhung des IL-10, sowohl gegenüber der Vehikel-Kontrolle als auch gegenüber der Negativ-Kontrolle. Somit konnte ein Effekt des DMSO auf die Genexpression von IL-10 ausgeschlossen und dem Ceramid zugeschrieben werden. Die Versuchsgruppe mit hoher Konzentration Ceramid (10 μ M) war auch gegenüber jener mit geringer Konzentration (1 μ M) signifikant verändert (Abb. 18).

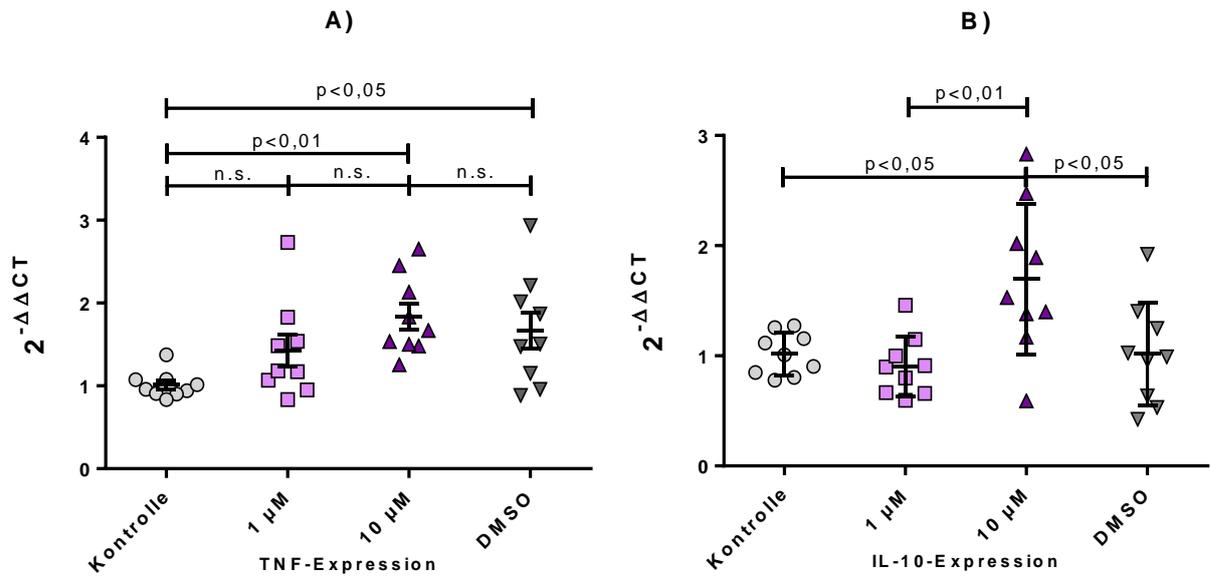


Abb. 18: Einfluss von niedrig und hochkonzentriertem Ceramid auf die TNF und IL-10-Expression in THP-1-Zellen.

Die TNF-Expression (A) wurde durch C16-Ceramid und die Vehikel-Kontrolle signifikant erhöht. Die IL-10- Expression (B) wurde durch hohe Konzentrationen C16-Ceramid signifikant gesteigert. Die Inkubationszeit betrug jeweils 24 h. Analyse *via* RT-qPCR. Internes Kontrollgen 18 S. (n=9, Mittelwert \pm SEM, n.s.=nicht signifikant).

4. Diskussion

Die Pathophysiologie der Atherosklerose beruht auf endothelialer Dysfunktion mit Inflammation, die durch Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus Typ II verstärkt wird. Zudem sind Makrophagen beteiligt, die durch übermäßige Lipoproteininkorporation zu Schaumzellen werden. Durch die Nekrose dieser Schaumzellen kommt es zum Fortschreiten der Entzündung mit Einwandern weiterer Makrophagen. Makrophagen können in proinflammatorische M₁-Makrophagen und antiinflammatorische M₂-Makrophagen eingeteilt werden. Ein Kommunikationsvehikel zwischen Endothelzellen und Makrophagen im Rahmen der Atherosklerose sind IEVs. Diese bestehen aus ihrem biologisch aktiven Inhalt (wie z.B.: micro-RNA) und einer Lipidhülle. Letztere besteht u.a. aus Ceramiden, die ebenfalls proatherogen wirken.

Unsere Hypothese war, dass extrazelluläre Vesikel aus Endothelzellen, die erhöhten ox-LDL-, LDL- und Glucose-Konzentrationen ausgesetzt sind, eine Zunahme der M₁-Differenzierung in THP-1 Zellen verursachen.

Wir konnten zeigen, dass LDL- und oxLDL-IEVs keine signifikanten Auswirkungen hatten. Glucose-IEVs und die Kontroll-IEVs reduzierten die TNF-Expression. Glucose-IEVs zeigten hier einen schnelleren Effekteintritt, Kontroll-IEVs einen länger anhaltenden. IL-10 war von keiner der Versuchsansätze verändert worden.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich eine Erhöhung der CD80-Expression, während die sonstigen M₁- und M₂-Marker unverändert blieben. CD80 und CD86 zeigten sich in der Positivkontrolle geeignet, eine M₁-Differenzierung zu detektieren. Auffällig war, dass CD163 und CD206 in den Positivkontrollen nicht dazu geeignet waren, M₂-Differenzierungen zu erkennen.

Die zweite Hypothese war, dass C16-Ceramid eine M₁-Differenzierung in THP-1-Zellen bewirkt. Dies konnte durch unsere Experimente nicht bestätigt werden. Vielmehr führte C-16-Ceramid konzentrationsabhängig zu einer vermehrten IL-10-Expression und demnach einer M₂-Differenzierung.

4.1 Ox-LDL-, LDL- und Glucose IEVs erzeugen eine Mischung aus M₁- und M₂-Differenzierungsmerkmalen in THP-1-Zellen

oxLDL IEVs verursachen keine M₁-Differenzierung

Die Lipoproteine LDL und oxLDL verursachen keine signifikanten Veränderungen weder in unbehandelten noch in PMA-stimulierten THP-1 Zellen.

Die fehlende Differenzierung in unbehandelten THP-1-Zellen wurde von uns zunächst auf die fehlende Aktivierung mit PMA zurückgeführt. Überraschenderweise tritt auch nach PMA-Behandlung keine veränderte Expression von TNF oder IL-10 auf, lediglich eine Tendenz zur Reduktion von IL-10 ist nach 24 h sichtbar.

EVs transportieren im Kontext der Atherogenese vielfach proinflammatorische Effektoren. Bereits Huber et al. belegen, dass EVs mit oxidierten Phospholipiden, wie sie in oxLDL auftreten, Makrophagen-bindende Eigenschaften in Endothelzellen hervorrufen und somit proinflammatorisch wirken (Huber et al., 2002). Rautou et al. (2011) zeigen, dass diese Effekte durch eine vermehrte ICAM-1 Expression vermittelt werden. Wir gingen davon aus, dass es eine Makrophagen-vermittelte Verstärkung der Inflammation durch IEVs gibt. Ein Ergebnis unserer Versuche ist, dass IEVs aus Endothelzellen, die erhöhten Lipoproteinkonzentrationen ausgesetzt sind keinen proinflammatorischen Effekt im Sinne einer M₁-Differenzierung von monozytären Zielzellen haben. Dies steht im Widerspruch zu He et al. Sie belegen, dass ox-LDL-stimulierte EVs vermehrt miR-155 anreichern, die so in THP-1-Zellen transferiert wird und dort eine vermehrte M₁-Differenzierung verursacht. Aufgrund der erhöhten Zentrifugenbeschleunigung (120.000 g) im Vergleich zu unseren Experimenten (40.000 g) setzt sich die EV-Population vorrangig aus sEVs zusammen (He et al., 2018).

Besser vergleichbar ist die Untersuchung von Huang et al. (2018). Sie beschreiben, dass sEVs aus oxLDL-behandelten Endothelzellen M₂-Marker induzieren (CD206, IL-10 und Arginase-1) und den M₁-Marker IL-12 supprimieren.

Somit würden oxLDL-EVs die M₂-Polarisation fördern. Zur Isolation verwenden die Autoren ein Protokoll, das mit einer Beschleunigung von 10.000 g auch IEVs zulässt (Huang et al., 2018). Dieser Vergleich gibt analog zu van Niel et al. (2018) weitere Hinweise auf Unterschiede in der Beladung und der zellulären Aufnahme der EVs abhängig von der Größe. Daher ist es denkbar, dass in unseren Experimenten mit oxLDL-IEVs ein Ausgleich zwischen den beiden Fraktionen von EVs herrscht und sich die

gegensätzlichen Effekte aufheben. Es ist weiterhin vorstellbar, dass verschiedene Signalkaskaden die intrazelluläre Homöostase im Ergebnis aufrechterhalten. Sie werden dabei durch den heterogenen Inhalt (Transkriptionsfaktoren, microRNA, Phospholipide, etc.) der EVs zeitgleich aktiviert.

Die direkte, proinflammatorische Wirkung des oxLDL äußert sich insbesondere als Endotheldysfunktion (El-Hajjar et al., 2022; Ji et al., 2015). Fu et al. (2017) zeigen, dass auch oxLDL-beeinflusste endotheliale EVs (in diesem Fall IEVs und sEVs) ihre proinflammatorische Wirkung am Endothel ausüben. Dies interpretieren wir so, dass der Effekt von oxLDL-IEVs auf monozytäre Zellen nur einen Teil ihrer proinflammatorischen Wirkung ausmacht und dieser Teil schwächer ausfällt als angenommen.

Dass oxLDL direkte proatherogene Wirkung auf THP-1-Zellen hat, ist ebenso nachgewiesen (Liao et al., 2021; Liu et al., 2022). Interessanterweise hemmt oxLDL auch direkt die IL-10-Expression in Makrophagen; dies ist in unseren Experimenten angedeutet zu sehen. (Bazzi et al., 2022)

Eine weitere Deutung ist, dass es sich bei Effekten durch IEVs um zeitlich dynamische Prozesse handelt. Nach vier Stunden zeigt IL-10 bereits Tendenz zu einer geringeren Expression. Wir gehen davon aus, dass nach acht oder zwölf Stunden eine signifikante Verringerung messbar ist, die sich nach 24 Stunden wieder normalisiert. Dies stellt einen vielversprechenden Versuchsansatz für zukünftige Untersuchungen dar. Diese zeitlich dynamische Veränderung leiten wir auch aus unseren Experimenten mit Glucose-IEVs ab, die TNF nach vier, aber nicht nach 24 Stunden, supprimieren. In den Experimenten mit Durchflusszytometrie zeigt sich, dass die CD80-Expression von Kontroll-IEVs nach 72 h, nicht aber nach 24 h stimuliert wird. Zudem ist anzunehmen, dass andere M₁-Marker (wie CD80) durch oxLDL-IEVs signifikant verändert wären.

Wir zeigen somit, dass der Ablauf der Inflammation ein zeitlich dynamischer Prozess ist. Außerdem gibt unsere Untersuchung einen weiteren Hinweis darauf, dass die Größe der EVs einen Zusammenhang mit der Wirkung auf Zielzellen hat.

Glucose-IEVs verringern die TNF-Expression, erhöhen aber die CD80-Expression. Ein Kompensationsmechanismus?

Teil der ersten Hypothese ist, dass extrazelluläre Vesikel aus Endothelzellen, die erhöhten Glucose-Konzentrationen ausgesetzt sind, eine Zunahme der M₁-Differenzierung in Makrophagen verursachen.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass IEVs aus Glucose-behandelten HCAECs die TNF-Expression in PMA-stimulierten THP-1 Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle reduzieren, während die IL-10-Expression nicht verändert wird.

Ein Ergebnis, welches unsere Hypothese bestätigt, war hingegen die vermehrte Expression von CD80 in diesen Zellen. Interessanterweise blieb CD86, ebenso wie CD163 und CD206 unverändert. Bemerkenswert ist außerdem, die gleichsinnige Wirkung der Kontroll-IEVs sowohl in ihrer Wirkung auf TNF als auch auf CD80.

Bisherige Untersuchungen zu direkten Effekten von Hyperglykämie auf THP-1-Zellen zeigen eine proinflammatorische Wirkung auf die Differenzierung von THP-1-Zellen. Insbesondere IL-1 β , IL-6 und TNF sind erhöht (Al-Rashed et al., 2020; Guha et al., 2000; Lee et al., 2021a). Zudem ist eine Veränderung der Glucose-Spiegel im Zellmedium innerhalb des Versuchszeitraumes (Anstieg oder Abfall) mit einer noch höheren inflammatorischen Aktivität assoziiert (Al-Rashed et al., 2020; Lee et al., 2021b). In zukünftigen Versuchen kann dies genutzt werden, um die Abgrenzung zwischen rein EV-vermittelten und Glucose-vermittelten Effekten zu verbessern.

Untersuchungen mit Endothelzellen, die Hyperglykämie ausgesetzt sind zeigen ebenfalls proinflammatorische Effekte. Die Adhäsion von THP-1-Zellen an das Endothel ist unter hyperglykämischen Bedingungen erhöht (Zhang et al., 2021). Zudem induzieren sie *via* IEVs die Alterung von glatten Muskelzellen, dies gilt als proatherogen (Wang et al., 2020). Diese Untersuchungen stimmen mit der von uns gezeigten CD80-Erhöhung überein. Vergleichbare Experimente mit Co-Kultur von endothelialen IEVs aus hyperglykämischen Bedingungen mit THP-1-Zellen gibt es nicht. Somit weisen unsere Resultate auf einen bisher unbekanntem Mechanismus hin.

Die beiden Ergebnisse (TNF-Reduktion und CD-80 Expression) stehen zunächst im Widerspruch zueinander, da eine CD80-Erhöhung eine M₁-Differenzierung bedeutet, eine TNF-Reduktion jedoch eine M₂-Differenzierung suggeriert. Deutet man das Expressionsverhalten der Makrophagen als Bestreben, eine Homöostase der Inflammation zu erhalten, liest sich das Ergebnis wie folgt: Die TNF-Reduktion entsteht als Folge einer erhöhten Inflammationsaktivität (deren Ausdruck die erhöhte CD80-Expression ist), um selbige zu begrenzen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Freeman et al. (2018). Während in deren Untersuchung EVs von Diabetes-Patienten Gene und Zytokine mit proinflammatorischem Charakter förderten, reduzierten sich

gleichzeitig jene Gene, die Apoptose und oxidativen Stress verursachen. Auch Al-Rashed et al. (2020) zeigen, dass TNF in PMA-aktivierten THP-1-Zellen unter direktem Glucose-Einfluss nicht ansteigt. Aufgrund des Konsenses, dass Inflammation die treibende Kraft hinter Atherosklerose ist, kann man die Reduktion von TNF durch Glucose-IEVs als protektiven Mechanismus verstehen. Dieser Gedanke erhält Unterstützung durch die Untersuchung von Bouchareychas et al. (2021), die zeigen konnten, dass sEVs und IEVs aus monozytären Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen inflammatorische Gene in aufnehmenden monozytären Zellen herunterregulieren. Zu bedenken ist jedoch, dass es vor allem die unregulierte Inflammation durch Zellenekrose ist, welche den Teufelskreis der progredienten Atherosklerose unterhält (Kunjathoor et al., 2002; Llorente-Cortés et al., 2000). In Übereinstimmung mit zahlreichen Untersuchungen deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass ein gewisses Maß an Inflammation notwendig ist: Gomez et al. (2018) konnten einen Plaque-stabilisierenden Effekt des proinflammatorischen IL-1 β nachweisen und Zerneck et al. (2008) zeigen, dass das proinflammatorisch konnotierte CXCL12 eine protektive Wirkung hinsichtlich der Entwicklung einer Atherosklerose entfaltet. Weitere Unterstützung erhält diese These durch Untersuchungen von Keyel et al. (2012), die antiinflammatorisch wirkende EVs (welche TNF und T-Zell-Aktivität hemmen) als Treiber der Entstehung von Schaumzellen identifizieren.

Wir gehen davon aus, dass der TNF-reduzierende Effekt, in dem von uns beschriebenen Ausmaß, negative Auswirkungen auf die Stabilität der Atherosklerose hat und ihrer Progression Vorschub leistet.

Zudem können wir weder eine eindeutige M₁- noch eine eindeutige M₂-Differenzierung nachweisen. Vielmehr handelt es sich aus unserer Sicht um eine alternative Differenzierung, welche Komponenten von M₁- und M₂-Makrophagen hat, ähnlich dem Phänotyp seneszenten Makrophagen (Matacchione et al., 2022). Dieser wird *in vitro*, passend zu dieser Theorie und unseren Versuchen, durch Hyperglykämie erzeugt (Prattichizzo et al., 2018). Die Änderung der Osmolarität durch die Hyperglykämie spielt hingegen keine Rolle. Zwar fehlen genaue Angaben zur Osmolarität des Zellmediums vonseiten des Herstellers, jedoch verändert sich die Osmolarität bei einer angenommenen Osmolarität zwischen 260 mosmol/l und 290 mosmol/l um maximal 4 mosmol/l. Dies ist eine zu vernachlässigende Änderung (Luh et al., 1996).

Kontroll-IEVs haben ähnliche Effekte wie Glucose-EVs mit veränderter zeitlicher Dynamik

Unser Augenmerk richtet sich nun auf die Veränderungen durch Kontroll-IEVs. Während sie sich nicht signifikant von der Glucose-IEV-Gruppe unterscheiden, sind einige Veränderungen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle bemerkenswert. Die Kontroll-IEVs reduzieren ebenfalls signifikant die Expression von TNF. Während der Effekt der Glucose-IEVs nach 24 Stunden vollständig zurückgebildet ist, bleibt er bei Kontroll-IEVs über diese Zeit nahezu konstant. Die Expression von CD80 ist nach 24 Stunden nicht erhöht, nach 72 Stunden jedoch signifikant angestiegen. Unsere Beobachtung könnte die physiologische Antwort von Makrophagen auf endotheliale EVs sein, eine langsame und stetige Aufnahme mit langanhaltender Wirkung. Da die Veränderungen durch Glucose-IEVs einer deutlich schnelleren Kinetik unterliegen, schließen wir daraus, dass eine beschleunigte Aufnahme der Glucose-IEVs vorliegt. Freeman et al. (2018) belegen, dass EVs aus dem Blut von Diabetes mellitus-Patienten vermehrt durch zirkulierende monozytäre Zellen aufgenommen wurden. Diese erhöhte Aufnahme könnte durch VCAM-1 vermittelt sein (Akbar et al., 2017). VCAM-1 wird bei Diabetes mellitus vermehrt im Endothel exprimiert (Paneni et al., 2013). Glucose-IEVs erzielen möglicherweise durch ihre verstärkte Aufnahme stärkere Effekte in jedoch kürzerer Zeit; dies könnte im Vergleich mit oxLDL-IEVs den geringeren Effekt der letzteren erklären.

Vorstellbar ist, dass die von uns gemessenen Effekte der Kontroll-IEVs vergleichbar mit Untersuchungen von He et al. (2018) sind. Die Autoren identifizieren sEVs aus KLF-2 produzierenden Endothelzellen als Verantwortliche für eine Suppression von M₁-Makrophagen und eine Zunahme der M₂-Makrophagen im vaskulären System. Jansen et al. (2017) zeigen einen atheroprotektiven Effekt durch IEVs aus unbehandelten Endothelzellen, die eine Proliferation glatter Muskelzellen hemmen. Außerdem erhöhen sie die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Endothelzellen, ein Effekt der durch Hyperglykämie aufgehoben wird (Jansen et al., 2013b).

Auch EVs aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) haben eine antiinflammatorische Wirkung. Ning et al. (2021) konnten nachweisen, dass sEVs eine Reduktion von TNF und IL-6 bewirken. Ma et al. (2021) zeigen, dass ca. 100 nm große EVs aus MSCs eine vermehrte CD206- und Arginase-1-Expression in Makrophagen hervorrufen, zwei etablierte Marker für M₂-Differenzierung. Wir schließen daraus, dass in unserem

Experiment Hinweise für eine M₁- und eine M₂-Differenzierung durch IEVs vorliegen, ohne eindeutige Belege für die Entstehung eines einzelnen Phänotyps zu erhalten.

Bedenkenswert ist außerdem, dass sowohl Glucose- als auch Kontroll-IEVs in unserem Experiment durch die Kultur in einem Hunger-Medium erzeugt werden. Dies könnte die ähnliche CD80-Expression erklären. Wang et al. (2019) zeigen, dass IEVs aus Endothelzellen nach Behandlung mit Hunger-Medium vermehrt M₁-Marker wie IL-1 β und IL-6 in THP-1-Zellen induzieren.

C16-Ceramid steigert in hohen Konzentrationen die IL-10-Expression

C-16 Ceramid ist in Glucose-IEVs angereichert, weshalb wir eine Beteiligung an den Effekten von Glucose-IEVs auf THP-1-Zellen vermuten (Zietzer et al., 2021). TNF war in allen Versuchsgruppen, inklusive DMSO ohne C16-Ceramid gegenüber der Negativ-Kontrolle erhöht, sodass es sich um einen DMSO-vermittelten Effekt handelt.

Interessanterweise erhöht C-16 Ceramid in höherer Konzentration die IL-10-Expression, während IEVs wie oben gezeigt TNF reduzieren, aber keinen Einfluss auf IL-10 haben.

Analog zu den Effekten der IEVs könnte Ceramid ebenfalls einen Signalweg in den Makrophagen aktivieren, der den proinflammatorischen Effekt begrenzt. Die Eigenschaft auf eigentlich proinflammatorische Stimuli (z.B. LPS) vermehrt exprimiert zu werden, ist für IL-10 bereits beschrieben (Grütz, 2005). Einen vergleichbaren Effekt berichten Józefowski et al., in deren Untersuchung Ceramid und Ceramid-1-Phosphat die LPS-abhängige TNF-Sekretion in Makrophagen reduzierten (Józefowski et al., 2010). Dies bedeutet nicht, dass Ceramid M₂-Makrophagen induziert, möglicherweise gibt es jedoch graduelle Unterschiede in der Differenzierung von Makrophagen, die unter unterschiedlichen Bedingungen und mit unterschiedlichen Ceramid-Isoformen kultiviert werden (Gault et al., 2010). Beachtet man die Studie von Edsfeldt et al. (2016) sieht man, dass Ceramid in humanen glatten Muskelzellen aus Koronararterien (die zu Makrophagen transdifferenzieren können) nicht TNF, jedoch die M₁-Marker IL-6 und MCP-1 erhöht. Schilling et al. (2013) können andererseits sehr wohl eine Ceramid-abhängige TNF-Expression in Makrophagen nachweisen.

In Einklang mit diesen Ergebnissen zeigen Lallemand et al. (2018), dass eine Inhibition der Ceramid-Produktion (durch Hemmung des synthetisierenden Enzyms neutrale Sphingomyelinase Typ 2) M₁-Differenzierung verringert. Die Ceramid-Kinase – ein Enzym

das Ceramid-Konzentrationen reduziert – ist hingegen ein guter M₂-Marker (Martinez et al., 2006).

Insgesamt gibt es Evidenz, dass Ceramid eine M₁-Differenzierung verursacht, während IL-10 die Begrenzung von Inflammation und nicht ihre Auflösung fördert. Eine Ceramid-Erhöhung geht nicht in jedem Fall mit einer TNF-Erhöhung einher und eine IL-10 Produktion, wie von uns nachgewiesen, wird nicht immer gemessen.

CD80 eignet sich zur Phänotypisierung, CD86 und CD206 reagieren auf verschiedene Stimuli, CD163 eignet sich zur Erkennung von Makrophagen

In unseren Versuchen zeigt sich in den M₁-Kontrollen (IFN- γ und LPS) ein Anstieg von CD80 nach 24 Stunden, ein Effekt, der nach 72 Stunden regredient ist.

CD80 ist ein gut etablierter M₁-Makrophagen-Marker, der auch in THP-1-Zellen erfolgreich zur Differenzierung eingesetzt wird (Tedesco et al., 2018). Er ist insbesondere nach 24 Stunden stark ausgeprägt, seine Expression lässt über die Zeit nach (Shiratori et al., 2017). Dies können wir durch unsere Experimente bestätigen. Zu bedenken ist, dass wir für die 72-Stunden-Experimente eine reduzierte Konzentration von LPS im Vergleich zu 24 Stunden verwendeten. Diese Konzentration ist von Genin et al. (2015) als ausreichend für einen signifikanten Anstieg mehrerer M₁-Marker belegt, während sie gleichzeitig die Vitalität der THP-1-Zellen erhält. Dennoch kann dies die Abschwächung der CD80 Expression in der M₁-Kontrolle nach 72 Stunden erklären.

CD86 ist nach 24 Stunden in der M₁-Kontrolle verstärkt exprimiert. Gleichzeitig ist auch die Expression in der M₂-Kontrolle (IL-4 und IL-13) gegenüber der Negativ-Kontrolle gesteigert. Nach 72 Stunden ist die M₂-Kontrolle gegenüber M₁- und Negativ-Kontrolle erhöht.

Dieses Ergebnis ist weitgehend in Einklang mit der Arbeit von Mantovani et al. (2004), die CD86 einerseits den klassischen M₁-Makrophagen zuordnet, dessen Vorkommen jedoch auch einer Gruppe von M₂-Makrophagen, den M_{2b}-Makrophagen beimisst. Zu bedenken ist hierbei, dass dies durch Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren oder IL-1-Rezeptor-Antagonisten erzielt wurde. Auch Hirose et al. (2011) weisen CD86 in M₂-polarisierten Makrophagen nach. Weiterhin zeigen Untersuchungen, dass M₂-Makrophagen-Merkmale auch nach 72 Stunden erstmals oder vermehrt nachweisbar sind (Genin et al., 2015; Li et

al., 2016a). Daher ist es für uns plausibel, dass der CD86-Anstieg nach 72 Stunden ebenfalls durch M₂-Polarisation erklärt wird.

CD163 ist in unseren Versuchen nicht signifikant gegenüber den Versuchsgruppen oder der Negativ-Kontrolle verändert. Dies widerspricht zunächst der Annahme, dass es sich hierbei um einen klassischen M₂-Marker handelt, wie in der Literatur beschrieben (Mantovani et al., 2002; Sawa-Wejksza et al., 2018; Vogel et al., 2014). Man findet jedoch bei zahlreichen Autoren Zweifel an dieser Sichtweise. Sowohl periphere Blutmakrophagen, als auch THP-1-Zellen zeigten in mehreren Studien keine vermehrte CD163-Expression nach M₂-Polarisation (Bertani et al., 2017; Tedesco et al., 2018). Weitere Untersuchungen attestieren CD163 Beteiligung an inflammatorischen Prozessen (Etzerodt und Moestrup, 2013). Zudem sind sie im inflammatorischen Milieu an der Expression von M₂-Markern beteiligt, was eine Differenzierung *in vitro* zusätzlich erschwert (Alvarado-Vazquez et al., 2017). Barros et al. (2013). verwenden das Strukturprotein nicht zur Differenzierung, sondern analog zu CD68 zur Identifikation monozytärer Zellen. Somit gibt unsere Untersuchung weitere Hinweise darauf, dass dieser Marker nicht zur Differenzierung der Polarisation geeignet ist, jedoch zur Identifikation monozytärer Zellen eingesetzt werden kann.

CD206 zeigt in unseren Versuchen keine signifikante Veränderung nach 24 Stunden. Nach 72 Stunden ist es in den M₁- und M₂-Kontrollen erhöht, jedoch besteht zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied.

CD206 ist häufig genutzt und zeigt auch eine gute Differenzierungsqualität zwischen M₂- und M₁-Makrophagen (Hirose et al., 2011; Martinez et al., 2006; Sawa-Wejksza et al., 2018; Wiktorowicz et al., 2019). Es ist jedoch zu bedenken, dass neben IL-4 und IL-13 auch andere Effektoren CD206 stimulieren (Raggi et al., 2017; van Dyken und Locksley, 2013). Typisch erscheint wie bereits oben beschrieben, dass M₂-Polarisation einen späteren Effekt erzielt als M₁-Polarisation (Genin et al., 2015; Li et al., 2016a). Somit war zu erwarten, dass nach 24 Stunden keine signifikante Veränderung vorliegt. Die fehlende Differenzierung zwischen M₁- und M₂-Phänotyp lässt sich unterschiedlich erklären. Einerseits gibt es Hinweise, dass dies ein Phänomen der THP-1-Zellen ist, während andere monozytäre Zellen CD206 signifikant vermehrt nach M₂-Polarisation exprimieren (Tedesco et al., 2018). Andererseits ist die Freisetzung von CD206 ein von der Proteinkinase C abhängiger Prozess. Da sowohl LPS, als auch PMA diese Kinase

aktivieren, kann es zu einer erhöhten Expression auch in der M₁-Kontrolle kommen (Nielsen et al., 2019). Wir begegnen dieser Problematik in unserer Arbeit mit einer reduzierten Konzentration von LPS und einem optimierten Einsatz von PMA (Genin et al., 2015; Lund et al., 2016). Dennoch ist es sinnvoll, den Einsatz von PMA bei Untersuchungen des M₂-Phänotypes weiter zu reduzieren oder Alternativen wie bioelektrische Verfahren zu etablieren (Li et al., 2016a; Park et al., 2007).

Differente Ergebnisse geben Hinweise auf unterschiedliche Signalwege und alternative Differenzierungen

Festzustellen ist zusammenfassend, dass sowohl die fehlende Differenzierung durch oxLDL-/LDL-IEVs, die TNF-Reduktion durch Glucose- und Kontroll-IEVs als auch die IL-10-Erhöhung ohne TNF-Veränderung durch Ceramid (Abb. 19) überraschende Ergebnisse waren. Versuchsbedingungen, die alle eine M₁-Differenzierung zum Ziel hatten, lösen Reaktionen aus, die differenzierte und überlappende Phänotypen hervorrufen. Auffällig ist der Nachweis vermeintlich schützender antiinflammatorischer Effekte, welche potenziell negative Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf einer Atherosklerose haben.

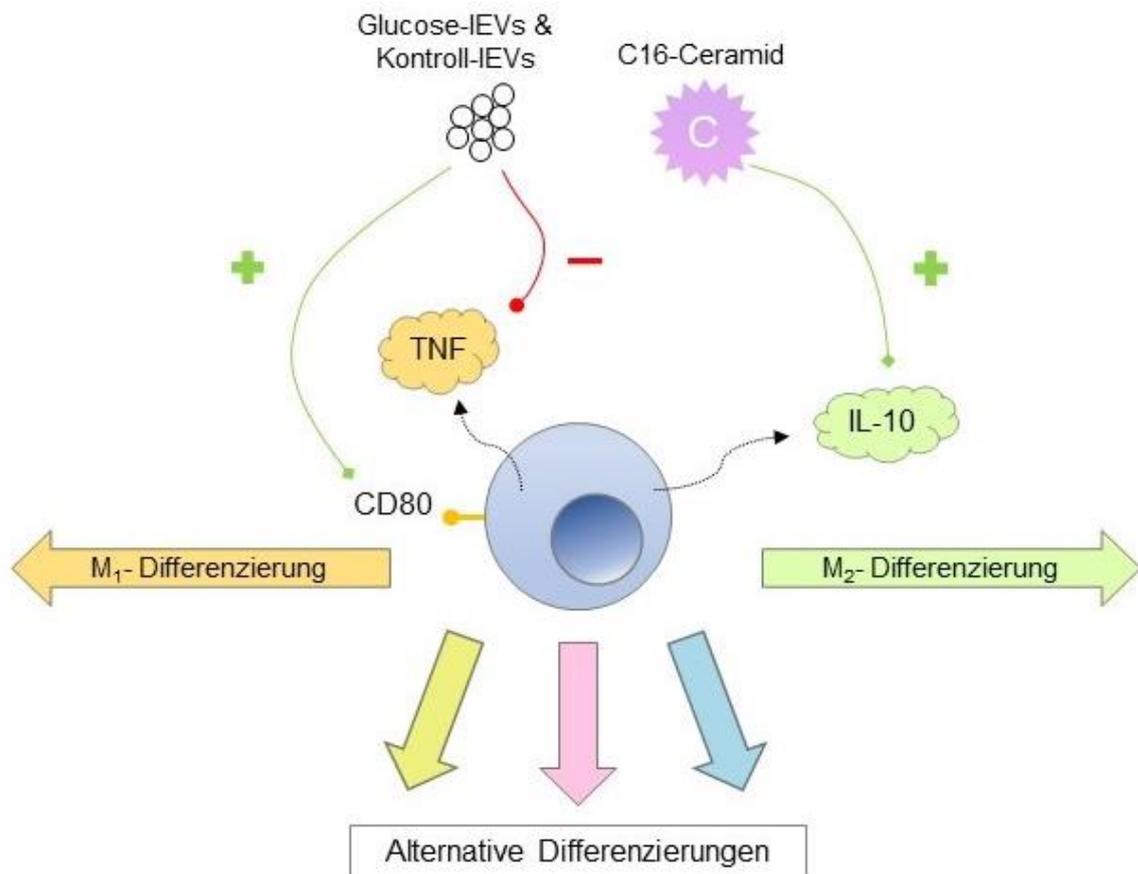


Abb. 19: Pathophysiologisches Modell der vorliegenden Arbeit. Sowohl Glucose-IEVs als auch Kontroll-IEVs erhöhen die Expression von CD80, reduzieren jedoch die TNF-Expression. C16-Ceramid verstärkt die Expression von IL-10.

Verschiedene atherogene Risikofaktoren lösen unterschiedliche Differenzierungsprozesse in Makrophagen aus und können die Aufnahme von EVs beeinflussen. Wir gehen davon aus, dass es sich bei den gezeigten Effekten in Versuchs- und Kontrollgruppen um Charakteristika alternativer Differenzierungen handelt. Sie gehen über das dichotome M₁-/M₂-Makrophagenmodell hinaus. Dieses Modell ist laut unseren Experimenten *in vitro* nicht mehr ausreichend. Im Folgenden werden Erklärungen vorgelegt.

4.2 Alternative Makrophagen-Differenzierung und das Spektrum-Modell

Wie gezeigt ist die Phänotypisierung von Makrophagen ein zentraler Aspekt des Atherogeneseverständnisses. Das postulierte M₁-/M₂-Paradigma ist eine hilfreiche

Vereinfachung, bei der Betrachtung der *in vitro*- aber insbesondere der *in vivo*-Verhältnisse von Makrophagen greift es zu kurz.

Kadl et al. (2010) zeigen, dass es neben M₁- und M₂-Phänotypen mindestens einen weiteren Phänotyp mit abgrenzbar spezifischen Eigenschaften gibt. Sie bezeichnen diesen Phänotyp als M_{ox}-Makrophagen, der durch Inkubation mit oxidierten Phospholipiden hervorgerufen wird. Dieser Phänotyp hat z.B. einen deutlich erhöhten Glutathion-Stoffwechsel, wodurch er sich bereits funktionell von M₁- und M₂-Makrophagen unterscheidet. Mit dem Enzym Häm-Oxygenase-1 (HO-1) gibt es zudem einen Differenzierungsmarker, der den M_{ox}- signifikant von M₁- und M₂-Phänotyp unterscheidet (Kadl et al., 2010). Eine Reihe von Untersuchungen zeigen, dass es einer groben Vereinfachung gleichkommt, die Makrophagen-Differenzierung in nur zwei Richtungen einzuordnen. Makrophagen unterliegen diversen Einflüssen ihrer Umgebung - anderen Immunzellen, verschiedenen Pathogenen und löslichen Faktoren wie Zytokinen. Zudem handelt es sich um eine heterogene Zellfamilie, die neben Monozyten z.B. dendritische Zellen oder mehrkernige Riesenzellen umfasst und verschiedene, phänotypisch differente Reifungsstadien durchläuft (Gordon et al., 2014; Martinez et al., 2006; Martinez und Gordon, 2014; Rong et al., 2003). Daher plädieren Martinez und Gordon (2014) für eine „dynamische Sichtweise [...], um die gesamte funktionelle Breite aktivierter Makrophagen zu erfassen“.

Großen Einfluss auf diese Ansicht hat die Untersuchung von Xue et al. (2014): Die Autoren erweiterten das bisherige duale Modell zu einem „Spektrum-Modell mit mindestens neun unterscheidbaren Makrophagen-Aktivierungsprogrammen“. Einzelne Stimuli, welche nicht mit M₁- oder M₂-Phänotypen assoziiert sind, aktivieren andere genetische Programme und erzeugen somit abweichende Merkmalskombinationen. Zusätzlich gibt es Überschneidungen mit den klassischen Phänotypen, beispielsweise kann der von Xue et al. (2014) postulierte M_{TPP}-Phänotyp (TPP= TNF, PGE₂, TLR2 ligand P3C) das Resultat einer chronischen Entzündung sein. Dieser Phänotyp weist, wie der klassische M₁-Phänotyp, ebenfalls eine erhöhte CD86-Expression auf, unterscheidet sich von ihnen aber durch Expression von STAT4 oder IL-1 α , die nicht in M₁-Makrophagen vorkommen. Bei anderen Stimulationsbedingungen finden sich ebenfalls Belege dieser phänotypischen Plastizität (Xue et al., 2014).

Kadl et al. (2010) zeigen, dass die distinktierten M₁- und M₂-Makrophagen unter Einfluss von Phospholipiden zu M_{ox}-Makrophagen differenzieren und somit ebenfalls phänotypische Änderungen erfahren.

Die resultierenden Zellen, der in dieser Arbeit vorliegenden Experimente, können M_{TPP}-Makrophagen, M_{ox}-Makrophagen oder ein anderer Subtyp dieser Zellklasse sein. Es ist eine Erklärung für die divergierende phänotypische Ausstattung der Zellen unter EV-Einfluss (sowohl Glucose-IEVs als auch Kontroll-IEVs), die einerseits den typischen M₁-Marker CD80 aufweisen, andererseits deutlich weniger M₁-charakterisierendes TNF sezernieren.

4.3 Limitierungen

Für die vorliegende Arbeit entschieden wir uns für eine Isolation von EVs mithilfe der Ultrazentrifugation, welches die gängigste Methode ist (Gudbergsson et al., 2016). Vorteile sind die breite Verfügbarkeit der Materialien sowie eine fehlende Kontamination mit zugesetzten Stoffen und die Möglichkeit einer Verarbeitung größerer Probenmengen. (Konoshenko et al., 2018). Obwohl die Ultrazentrifugation bereits lange etabliert ist, existiert kein einheitliches Protokoll (Jansen et al., 2015; Musante et al., 2013; Théry et al., 2006).

Eine vollständige Trennung von EVs und anderen biologisch aktiven Bestandteilen mit ähnlichen Sedimentationseigenschaften ist durch Zentrifugation allein nicht zu erreichen. Deshalb werden auch modifizierte oder alternative Methoden genutzt, die das Verhältnis zugunsten der EVs verbessern sollen. Zum einen kann durch einen zusätzlichen Waschschrift eine höhere Reinheit der EVs erreicht werden (Gudbergsson et al., 2016). Zum anderen kann die Ultrazentrifugation mithilfe des Dichte-Gradienten um eine Differenzierungsstufe erweitert werden. Raj et al. (2012) verwenden hierfür zwei Lösungen mit unterschiedlicher Saccharose-Konzentration, die zur Sedimentation von EVs (hier sEVs) verschiedener Größe führen. In der Lösung enthaltene Proteine sedimentieren ebenfalls selektiv in den verschiedenen Lösungen.

Andere Methoden, die ebenfalls Alternativen für die Untersuchung EV-vermittelter Effekte bieten, sind die Präzipitation mit organischen Polymeren oder die Ultrafiltration durch Filter mit spezifischer Porengröße. In Erprobung sind Methoden, die die elektrische Ladung der

EVs und ihre Oberflächenproteine (mithilfe selektiver Antikörper) zum Ziel haben (Konoshenko et al., 2018).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Reinheit der Proben und die Menge der erhaltenen EVs immer in einem Balance-Verhältnis stehen. Die Ultrazentrifugation bietet bei den verwendeten Methoden den Vorteil der guten Vergleichbarkeit zwischen den Studien aufgrund ihres verbreiteten Einsatzes (Gudbergsson et al., 2016). Zudem lässt die verwendete Zentrifugenbeschleunigung Rückschlüsse auf die resultierende Makrophagenpopulation zu (Boulanger et al., 2017).

Bei der Untersuchung per Durchflusszytometrie wäre eine Lebend-Tot-Färbung (z.B. von Annexin-V) möglich, um falsch positive Befunde durch die unspezifische Färbung apoptotischer Zellen zu verhindern (Rieger et al., 2011). Dies ist relevant, da EVs eine proapoptische Wirkung auf Makrophagen besitzen (Distler et al., 2005; Huber et al., 2007). Wir verzichteten auf diesen Schritt, um die Zellen möglichst schnell und intakt weiterzuverarbeiten und die erhaltene Zellzahl nicht durch einen zusätzlichen Waschschrift zu reduzieren.

4.4 Verwendung von THP-1-Zellen

Da Makrophagen eine heterogene Zellpopulation darstellen, ist eine Vergleichbarkeit *per se* schwierig. Aus diesem Grund ist eine homogene Zellpopulation, die durch ihren klonalen Ursprung wenig Variabilität bietet, von Vorteil (Qin, 2012; Rogers et al., 2003). Wir entschieden uns daher für die Verwendung von THP-1-Zellen. In diesem Kontext sollte immer die Vergleichbarkeit mit anderen monozytären Zellen evaluiert werden, die bei THP-1-Zellen eingeschränkt ist (Tedesco et al., 2018). Dennoch bieten THP-1-Zellen Vorteile, unter anderem die homogene Reaktivität auch nach vielen Passagen, ohne zusätzliche Stimulantien zu benötigen. Es gibt keine bekannten Viren, die diese Zellen in Zellkultur befallen (Chanput et al., 2014). Zudem haben THP-1 Zellen verglichen mit PBMCs eine hohe Reinheit, da sie nicht aus peripherem Blut isoliert werden müssen (Cousins et al., 2003; Rogers et al., 2003). Daher ist die Verwendung dieser Zellreihe gut geeignet, um Aussagen über die Differenzierung von Makrophagen zu treffen.

Kritisch zu betrachten ist die Nutzung von PMA zur Aktivierung der Makrophagen. PMA vermittelt die Aktivierung durch PKC-Isoformen (Deutzmann, 2012). Selbige sind einerseits an der inflammatorischen Reaktion auf Hyperglykämie und an der Adhäsion von Monozyten an das Endothel beteiligt, andererseits aktivieren sie antiinflammatorische

Prozesse (Chen und Maltagliati, 2018; Kunt et al., 1999). Insgesamt besteht die Gefahr, dass PMA-vermittelte Effekte, die experimentell erzeugten überlagern und die Ergebnisse verzerren, weshalb die Konzentration so gering wie möglich gehalten werden sollte. Beachtenswert ist die variable Herkunft der *in vivo* beteiligten Makrophagen an atherosklerotischen Prozessen (Gordon et al., 2014). Feil et al. (2014) zeigen, dass im Mausmodell ein signifikanter Anteil der an atherosklerotischen Plaques beteiligten Makrophagen aus glatten Muskelzellen transdifferenzieren (Feil et al., 2014). Ältere Untersuchungen beschreiben, dass dies mit typischen Prozessen der Atherogenese, wie z.B. Phagozytose von Cholesterolestern, assoziiert ist (Rong et al., 2003).

Eine neue Untersuchung von Boyer et al. (2020) konstatiert, dass es zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu interzellulärer Kommunikation mittels EVs kommt und diese phänotypische Änderungen bewirken können. Es erscheint vielversprechend, die o.a. Experimente mit glatten Muskelzellen als Zielzellen zu wiederholen.

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre, die Auswertungsmethode und die untersuchten Marker zu ändern. Die in diesem Experiment verwendeten PCR-Zielgene (TNF bzw. IL-10) gelten als gut etabliert (Ley et al., 2011; Mantovani et al., 2002; Murray und Wynn, 2011; Röszer, 2015). Dies gilt auch für die FACS-Marker CD80 und CD86, die beide Promotoren inflammatorischer Prozesse sind (Mantovani et al., 2004; Sansom et al., 2003).

M₂-Marker sollten anhand der untersuchten pathophysiologischen Mechanismen und des untersuchten Gewebes ausgewählt werden, da es verschiedene Unterteilungen der Phänotypen gibt: Zu nennen sind unter anderem die Tumor-assoziierten Makrophagen, gewebständige M₂-Makrophagen sowie Unterarten der alternativen Aktivierung (Genin et al., 2015; Mantovani et al., 2004; Röszer, 2015; Solinas et al., 2009; Xue et al., 2014). Weiterführende Experimente, die potenzielle Differenzierungsmerkmale untersuchen, sind sinnvoll. Nachdem wir uns auf die am besten etablierten Marker beschränkten, wäre der nächste Schritt die Verwendung von Markern, deren Differenzierungsqualität am höchsten ist. Martinez et al. zeigen in einer breit angelegten Transkriptom-Untersuchung an PBMCs verschiedene Marker, die in Frage kommen. Neben TNF wären einerseits CXCL10, CXCL11 und CCL19 gut differenzierende M₁-Marker, welche mittels PCR untersucht werden können, auf der anderen Seite CCL13, CCL18 und CCL23 als M₂-Marker.

Für M₁-Makrophagen ist neben CD80 der CCR7-Rezeptor als FACS-Oberflächen-Marker vielversprechend; als M₂-Marker könnten CD36 oder CD209 genutzt werden (Martinez et al., 2006).

Interessanterweise kommen auch Enzyme aus dem Sphingomyelin-Haushalt zur Differenzierung infrage, namentlich die Ceramid-Kinase 1 (produziert Ceramid aus Ceramid-1-phosphat) und die Sphingosin-Kinase 1 (produziert Sphingosin-1-Phosphat aus Sphingosin) (Martinez et al., 2006; Ogretmen und Hannun, 2004).

In der Studie von Martinez et al. (2006) wird die Sphingosin Kinase 1 als M₁-Marker beschrieben, in Übereinstimmung mit ihrer Beteiligung an TNF-vermittelter Inflammation (Martinez et al., 2006; Palma et al., 2006). Auf der anderen Seite präsentiert sich die Ceramid-Kinase 1 als M₂-Marker.

Neben dem Inhalt der Zelle kann das Kulturmedium der Zellen auf sezernierte Proteine (z.B. TNF und IL-10) mithilfe der Western-Blot-Methode untersucht werden (Kurien und Scofield, 2006). Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen verschiedener Makrophagen-Modelle zeigen, dass die meisten Moleküle zu einem Messzeitpunkt entweder auf der mRNA- oder der Protein-Ebene beeinflusst werden, selten auf beiden zugleich (Tedesco et al., 2018). Daher erscheint es sinnvoll, mehrere Ebenen der Proteinbiosynthese im selben Versuchsaufbau zu analysieren.

4.5 Zukünftige Forschung

Die Rolle von Ceramid könnte durch den Einsatz des selektiven aSMase-Inhibitors Imipramin genauer untersucht werden (Lee et al., 2022). Die Zunahme von Ceramid in Glucose-IEVs ist bereits belegt (Zietzer et al., 2021).

Nach den vorliegenden Untersuchungen *in vitro* wäre eine Untersuchung *in vivo* am Mausmodell mithilfe der zuvor etablierten Differenzierungsmerkmale sinnvoll. Die EVs könnten, statt mit THP-1-Zellen in Co-Kultur gebracht zu werden, Mäusen injiziert werden. Sinnvollerweise würden hierzu *ApoE*^{-/-}-Mäuse verwendet, die als klassisches Modell der Atherosklerose gelten (Li et al., 2016b). Zur Auswertung könnte das Endothel der Mäuse histologisch untersucht werden. Es würde die Makrophagen-Population des Endothels (anhand von PCR-Untersuchungen) charakterisiert sowie die Plaque-Ausdehnung bestimmt werden, um den Einfluss der EVs herauszuarbeiten. Eine vergleichbare

Untersuchung von Jansen et al. (2013a) liefert bereits Hinweise auf eine vermehrte Makrophageninvasion in das Endothel unter hyperglykämischen Bedingungen.

In Bezug auf Experimente im Mausmodell sind die Untersuchungen von Xue et al. (2014) von großer Relevanz, da sie den Phänotyp von Maus-Makrophagen ebenso charakterisieren wie den von humanen Makrophagen. Mit ihrer Hilfe kann eine Vergleichbarkeit zwischen Mausmodell und Mensch hergestellt werden.

Auf lange Sicht wäre eine Primär-Diagnostik oder ein Therapie-Monitoring von Atherosklerose durch die Charakterisierung der vorhandenen Makrophagen-Phänotypen möglich, z.B. anhand charakteristischer EV-Profile (Nazari-Jahantigh et al., 2012; S Parahuleva et al., 2017). Jansen et al. (2014) belegen für EV-ständige miR aus Endothelzellen einen prädiktiven Wert für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Saenz-Pipaon et al. (2021) identifizierten EVs als diagnostische Marker bei diabetischer Nephropathie.

Weiterhin könnten zielgenaue Therapien, möglicherweise in Form modifizierter EVs oder EV-Komponenten anhand der charakterisierten Zielstrukturen entworfen werden (Adams et al., 2017; Akbar et al., 2017; Fitzgerald et al., 2017; Lener et al., 2015; Vader et al., 2016; Yin et al., 2015).

Erste klinische Studien zur medikamentösen Inflammationshemmung gibt es bereits. Verwendete Substanzen sind sehr breit antiinflammatorisch wirksam, z.B. über eine IL-1 β Blockade (Ridker et al., 2017). Wie oben dargestellt ist eine unterdrückte Inflammation nicht *per se* nützlich, insbesondere da andere proinflammatorische Mediatoren weiter aktiv sind und der Phänotyp der Makrophagen sich wenig ändert.

Vielmehr könnte eine therapeutische Intervention *via* EVs einen Phänotypen-modulierenden Effekt auf Makrophagen haben sowie einen pleiotrop wirksamen, regenerativen Effekt auf das vaskuläre System ausüben (Arslan et al., 2013; Comarița et al., 2022; Njock et al., 2015).

Gezielt Proteine in EVs zu verpacken, die dann positive Effekte auf das vaskuläre System haben, wie mehrere Studien bereits für das Sonic hedgehog Protein zeigen, ist möglich (Agouni et al., 2007; Benameur et al., 2010).

Passend zu den vorliegenden Untersuchungen konnten Bu et al. (2021) einen EV-gebundenen Transport von IL-10-mRNA etablieren, der selektiv in atherosklerotische Plaques erfolgte. Dies gelang, indem eine gentechnisch erzeugte miR-155 Bindungsstelle

erzeugt wurde, die zuvor als spezifisch für M₁-Makrophagen in atherosklerotischen Plaques beschrieben wurde (Bu et al., 2021; Nazari-Jahantigh et al., 2012). Nachfolgend stellte man eine Suppression von IL-1 β , TNF und IL-6 - und somit eine breite antiinflammatorische Wirkung - fest. Stamatikos et al. (2020) konnten Endothelzellen genetisch modifizieren und aus ihnen entstehende EVs als Vektor nutzen, um anti-miR-33a-5p in Makrophagen und glatte Muskelzellen einzubringen, die nachfolgend signifikant mehr Cholesterin ausschieden. Diese Therapie könnte die Entstehung von Schaumzellen verhindern.

Basierend auf der Untersuchung von Akbar et al. (2017) ist es sinnvoll, die Rekrutierung von Makrophagen aus ihren körpereigenen Reservoiren (insbesondere der Milz und des Knochenmarks) zu beeinflussen. Behandlungsstrategien hierzu existieren bereits in pharmakologischer Form *via* ACE-Hemmer oder durch Intervention mittels siRNA, die auf EVs als Ziele angewandt werden könnten (Leuschner et al., 2010; Leuschner et al., 2011).

5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die führende Todesursache. Als pathogenetisch hat sich die Atherosklerose erwiesen. Risikofaktoren sind abgelagertes LDL, endotheliale Dysfunktion und Inflammation - unter Beteiligung von Makrophagen.

Das etablierte Modell der phänotypischen Differenzierung teilt Makrophagen in den proinflammatorischen M₁-Phänotyp und den antiinflammatorischen M₂-Phänotyp. Eine Form der Kommunikation mit Makrophagen erfolgt durch extrazelluläre Vesikel (EVs). Ihre Hülle besteht u.a. aus Sphingolipiden. Deren Unterart Ceramid scheint ebenfalls atherogen zu wirken. Die Auswirkungen von EVs auf die Differenzierung von Makrophagen unter proatherogenen Bedingungen ist jedoch nicht gut verstanden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von EVs aus oxLDL-, LDL- und Glucose-exponierten Endothelzellen sowie von Ceramid auf die Differenzierung von Makrophagen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden humane koronararterielle Endothelzellen (HCAECs) mit Glucose-, oxLDL oder LDL-haltigem Medium kultiviert und aus ihnen EVs gewonnen, die mit THP-1-Zellen co-kultiviert wurden. Anschließend wurde die Expression von TNF, CD80 und CD86 als M₁-Makrophagen-Marker und IL-10, CD163 und CD206 als M₂-Makrophagen-Marker gemessen. Als Vehikel-Kontrolle dienten EVs aus HCAECs, die mit PBS-haltigem Medium kultiviert wurden. In einem weiteren Experiment wurden die THP-1-Zellen mit C16-Ceramid kultiviert.

THP-1-Zellen zeigten nach Co-Kultur mit oxLDL- und LDL-EVs keine signifikanten Änderungen bezüglich TNF- und IL-10-Expression.

EVs aus HCAECs inhibierten die Expression von TNF nach 24 Stunden signifikant im Vergleich zur Negativ-Kontrolle; durch Einfluss von Glucose geschah dies bereits nach vier Stunden. Zwischen Kontroll-EVs und Glucose-EVs bestand kein signifikanter Unterschied. Auffällig war, dass Glucose-EVs nach 24 Stunden keinen Effekt mehr zeigten, während die Kontroll-EVs weiterhin die TNF-Expression reduzierten.

In der Durchflusszytometrie fand man bei Glucose- und Kontroll-EVs eine Erhöhung von CD80 nach 24 und 72 Stunden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die Messungen von CD86, CD163 und CD206 zeigten keine signifikanten Unterschiede. Weiterhin waren CD80 und CD86 nach 24 Stunden in der M₁-Positiv-Kontrolle erhöht, d.h. sie waren zur

Erkennung von M₁-Makrophagen geeignet. Nach 72 Stunden war die CD80-Expression nicht mehr gesteigert, CD86 war in der M₂-Kontrolle erhöht.

Die Untersuchung der Ceramid-behandelten THP-1-Zellen zeigte eine erhöhte IL-10-Expression nach Behandlung mit höher konzentriertem Ceramid.

Insgesamt ergibt sich ein heterogenes Bild, das Glucose- und Kontroll-EVs sowohl mit Pro-, als auch Antiinflammation assoziiert. Ceramid wirkt in höheren Konzentrationen antiinflammatorisch. EVs haben somit auf Makrophagen vielfältige Auswirkungen, die sowohl pro- als auch antiinflammatorisch sein können. Ceramide zeigen in der Literatur häufig einen proinflammatorischen Effekt, wir konnten eine Reaktion darauf in Form von IL-10 Expression beobachten. Insgesamt geben uns die Ergebnisse Anlass, von alternativen Differenzierungen der Makrophagen auszugehen.

Die Einteilung der Makrophagen-Phänotypen in M₁- und M₂-Differenzierung ist stark vereinfachend. Sie sollten daher künftig möglichst genau charakterisiert werden.

Bei der Bewertung der Ergebnisse gibt es Einschränkungen: Neben dem teilweisen Fehlen methodischer Standardverfahren ist insbesondere zu beachten, dass THP-1-Zellen genetisch nicht mit humanen Makrophagen identisch sind, jedoch Vorteile in Handhabung und Vergleichbarkeit haben.

Schlussendlich ist festzustellen, dass EVs und Ceramide pro- und antiinflammatorische Effekte haben.

Zukünftig könnten EVs im Wissen der gewonnenen Erkenntnisse diagnostisch und therapeutisch vielfältig eingesetzt werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Modell der klassischen (M_1) und alternativen (M_2) Makrophagendifferenzierung. Modifiziert nach (Li et al., 2016a).	13
Abb. 2: Protokoll der IEV-Stimulations-Experimente mit anschließender RT-PCR.	30
Abb. 3: Schema der RNA-Isolation.	32
Abb. 4: Kompensation am Beispiel des Fluorochroms AmCyan:	36
Abb. 5: Vergleich von FMO-Proben (schwarzer Graph) und Full-Staining-Probe (blaue Fläche).	37
Abb. 6: Vorgehen beim Setzen der Gates für FACS-Experimente am Beispiel des Fluorochroms Pacific Blue.	39
Abb. 7: TNF-Expressionsverhalten oxLDL und LDL-IEV-stimulierter THP-1-Zellen.....	42
Abb. 8: Genexpression (TNF und IL-10) von PMA-differenzierten THP-1-Zellen nach 4 h und 24 h Co-Kultur mit oxLDL-IEVs.	43
Abb. 9: Effekte von Glucose-IEVs im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	44
Abb. 10: Effekte von Glucose-IEVs im Vergleich zu Kontroll-IEVs.....	45
Abb. 11: Effekte von Kontroll-IEVs im Vergleich zur Negativkontrolle	46
Abb. 12: Expression der M_1 -Marker CD80 (A) und CD86 (B) nach 24 h.	47
Abb. 13: M_2 -Marker-Expression nach 24 h.....	48
Abb. 14: Expression der M_1 -Marker CD80 (A) und CD86 (B) nach 72 h.	48
Abb. 15: Expression der M_2 -Marker CD 163 (A) und CD206 (B) nach 72 h.	49
Abb. 16: Expression des M_1 -Markers CD80 unter Einfluss von IEVs im Zeitverlauf.	50
Abb. 17: Expression des M_2 -Markers CD206 unter Einfluss von IEVs im Zeitverlauf. ...	51
Abb. 18: Einfluss von niedrig und hochkonzentriertem Ceramid auf die TNF und IL-10-Expression in THP-1-Zellen.	53
Abb. 19: Pathophysiologisches Modell der vorliegenden Arbeit.	64

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakteristik extrazellulärer Vesikel (Boulanger et al., 2017)	15
Tab. 2: Geräte	19
Tab. 3: Software	20
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 5: Zellkulturmaterial	22
Tab. 6: Reagenzien	23
Tab. 7: Reaktionsansatz der reversen Transkription	33
Tab. 8: Verwendete Konzentration der Antikörper in der Durchflusszytometrie.....	35
Tab. 9: Abkürzungen der p-Werte	40

8. Literaturverzeichnis

- Adams D, Suhr OB, Dyck PJ, Litchy WJ, Leahy RG, Chen J, Gollob J, Coelho T. Trial design and rationale for APOLLO, a Phase 3, placebo-controlled study of patisiran in patients with hereditary ATTR amyloidosis with polyneuropathy. *BMC Neurol.* 2017. 17: 1–12
- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017. 37: 163–176
- Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol.* 2008. 173: 1210–1219
- Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martínez MC, Andriantsitohaina R. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* 2007. 21: 2735–2741
- Akbar N, Digby JE, Cahill TJ, Tavare AN, Corbin AL, Saluja S, Dawkins S, Edgar L, Rawlings N, Ziberna K, McNeill E, Johnson E, Aljabali AA, Dragovic RA, Rohling M, Belgard TG, Udalova IA, Greaves DR, Channon KM, Riley PR, Anthony DC, Choudhury RP. Endothelium-derived extracellular vesicles promote splenic monocyte mobilization in myocardial infarction. *JCI Insight.* 2017. 2: 1–17
- Allahverdian S, Pannu PS, Francis GA. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc Res.* 2012. 95: 165–172
- Al-Rashed F, Sindhu S, Arefanian H, Al Madhoun A, Kochumon S, Thomas R, Al-Kandari S, Alghaith A, Jacob T, Al-Mulla F, Ahmad R. Repetitive Intermittent Hyperglycemia Drives the M1 Polarization and Inflammatory Responses in THP-1 Macrophages Through the Mechanism Involving the TLR4-IRF5 Pathway. *Cells.* 2020. 9: 1–21
- Alvarado-Vazquez PA, Bernal L, Paige CA, Grosick RL, Moracho Vilrriales C, Ferreira DW, Ulecia-Morón C, Romero-Sandoval EA. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology.* 2017. 222: 900–912
- Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Agnor ENE, Timmers L, van Rijen HV, Doevendans PA, Pasterkamp G, Lim SK, Kleijn DP de. Mesenchymal stem cell-derived

- exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2013. 10: 301–312
- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* 1991. 47: 22–31
- Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013. 8: 1-11
- Bazzi S, Frangie C, Azar E, Daher J. The effect of myeloperoxidase-oxidized LDL on THP-1 macrophage polarization and repolarization. *Innate Immun.* 2022. 28: 91–103
- Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One.* 2010. 5: 1-10
- Bertani FR, Mozetic P, Fioramonti M, Iuliani M, Ribelli G, Pantano F, Santini D, Tonini G, Trombetta M, Businaro L, Selci S, Rainer A. Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep.* 2017. 7: 1–9
- Bianco F, Perrotta C, Novellino L, Francolini M, Riganti L, Menna E, Saglietti L, Schuchman EH, Furlan R, Clementi E, Matteoli M, Verderio C. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* 2009. 28: 1043–1054
- Blanco-Domínguez R, Sánchez-Díaz R, La Fuente H de, Jiménez-Borreguero LJ, Matesanz-Marín A, Relaño M, Jiménez-Alejandro R, Linillos-Pradillo B, Tsilingiri K, Martín-Mariscal ML, Alonso-Herranz L, Moreno G, Martín-Asenjo R, García-Guimaraes MM, Bruno KA, Dauden E, González-Álvaro I, Villar-Guimerans LM, Martínez-León A, Salvador-Garicano AM, Michelhaugh SA, Ibrahim NE, Januzzi JL, Kottwitz J, Iliceto S, Plebani M, Basso C, Baritussio A, Seguso M, Marcolongo R, Ricote M, Fairweather D, Bueno H, Fernández-Friera L, Alfonso F, Caforio ALP, Pascual-Figal DA, Heidecker B, Lüscher TF, Das S, Fuster V, Ibáñez B, Sánchez-Madrid F, Martín P. A Novel Circulating MicroRNA for the Detection of Acute Myocarditis. *N Engl J Med.* 2021. 384: 2014–2027
- Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol.* 2016. 27: 473–483

- Bouchareychas L, Duong P, Phu TA, Alsop E, Meechoovet B, Reiman R, Ng M, Yamamoto R, Nakauchi H, Gasper WJ, van Keuren-Jensen K, Raffai RL. High glucose macrophage exosomes enhance atherosclerosis by driving cellular proliferation & hematopoiesis. *iScience*. 2021. 24: 1–29
- Boulanger CM, Loyer X, Rautou P-E, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017. 14: 259–272
- Boyer MJ, Kimura Y, Akiyama T, Baggett AY, Preston KJ, Scalia R, Eguchi S, Rizzo V. Endothelial cell-derived extracellular vesicles alter vascular smooth muscle cell phenotype through high-mobility group box proteins. *J Extracell Vesicles*. 2020. 9: 1–19
- Brandes R, Busse R. Kreislauf. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. Heidelberg: Springer Medizin-Verlag, 2010: 573–626
- Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 286: 1910-1915
- Bu T, Li Z, Hou Y, Sun W, Zhang R, Zhao L, Wei M, Yang G, Yuan L. Exosome-mediated delivery of inflammation-responsive Il-10 mRNA for controlled atherosclerosis treatment. *Theranostics*. 2021. 11: 9988–10000
- Bushnell T. How to Perform Doublet Discrimination In Flow Cytometry. *Cheeky Scientist*
- Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1993. 268: 14131–14137
- Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014. 23: 37–45
- Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiol Genomics*. 2018. 50: 77–97
- Choi RH, Tatum SM, Symons JD, Summers SA, Holland WL. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2021. 18: 701–711
- Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes*. 2005. 54: 2779–2786
- Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014. 30: 255–289
- Comarița IK, Vilcu A, Constantin A, Procopciuc A, Safciuc F, Alexandru N, Dragan E, Nemezc M, Filippi A, Chițoiu L, Gherghiceanu M, Georgescu A. Therapeutic Potential of

- Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Atherosclerosis-Induced Vascular Dysfunction and Its Key Molecular Players. *Front Cell Dev Biol.* 2022. 10: 1–30
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008. 180: 5771–5777
- Cousins RJ, Blanchard RK, Popp MP, Liu L, Cao J, Moore JB, Green CL. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100: 6952–6957
- Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007. 293: 1-27
- Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, Kaul S, Jones DW, Sabina RE, Pritchard KA, Guice KS, Oldham KT. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock.* 2006. 26: 464–471
- Deutzmann R. Mechanismen der Signaltransduktion. In: Rassow, J, Netzker R, Hauser K, Deutzmann R, Hrsg. *Duale Reihe Biochemie.* Stuttgart: Thieme-Verlag, 2012: 534–556
- Distler JHW, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005. 10: 731–741
- Edrissi H, Schock SC, Hakim AM, Thompson CS. Microparticles generated during chronic cerebral ischemia increase the permeability of microvascular endothelial barriers in vitro. *Brain Res.* 2016. 1634: 83–93
- Edsfeldt A, Dunér P, Ståhlman M, Mollet IG, Asciutto G, Grufman H, Nitulescu M, Persson AF, Fisher RM, Melander O, Orho-Melander M, Borén J, Nilsson J, Gonçalves I. Sphingolipids Contribute to Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016. 36: 1132–1140
- El-Hajjar L, Hindieh J, Andraos R, El-Sabban M, Daher J. Myeloperoxidase-Oxidized LDL Activates Human Aortic Endothelial Cells through the LOX-1 Scavenger Receptor. *Int J Mol Sci.* 2022. 23
- Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2013. 18: 2352–2363
- European Heart Network. 2021. CVD Statistics. Verfügbar unter <https://ehnheart.org/cvd-statistics.html> (Zugriffsdatum: 30.06.2021)

- Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Schaller M, Feil R. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circulation Research*. 2014. 115: 662–667
- Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen M-R, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017. 38: 2459–2472
- Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, Oliva B, Moco-roa A, Mendiguren J, Martínez de Vega V, García L, Molina J, Sánchez-González J, Guzmán G, Alonso-Farto JC, Guallar E, Civeira F, Sillesen H, Pocock S, Ordovás JM, Sanz G, Jiménez-Borreguero LJ, Fuster V. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation*. 2015. 131: 2104–2113
- Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, Bettencourt BR, Strahs A, Clausen V, Wijngaard P, Horton JD, Taubel J, Brooks A, Fernando C, Kauffman RS, Kallend D, Vaishnav A, Simon A. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*. 2017. 376: 41–51
- Flood C, Gustafsson M, Richardson PE, Harvey SC, Segrest JP, Borén J. Identification of the proteoglycan binding site in apolipoprotein B48. *J Biol Chem*. 2002. 277: 32228–32233
- 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
- Fu Z, Zhou E, Wang X, Tian M, Kong J, Li J, Ji L, Niu C, Shen H, Dong S, Liu C, Vermorken A, Willard B, Zu L, Zheng L. Oxidized low-density lipoprotein-induced microparticles promote endothelial monocyte adhesion via intercellular adhesion molecule 1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017. 313: 567-574

- Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 2010. 688: 1–23
- Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015. 15: 1–14
- Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research.* 2016. 118: 620–636
- Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017. 13: 368–380
- Goerdts S, Orfanos CE. Other Functions, Other Genes. *Immunity.* 1999. 10: 137–142
- Gomez D, Baylis RA, Durgin BG, Newman AAC, Alencar GF, Mahan S, St. Hilaire C, Muller W, Waisman A, Francis SE, Pinteaux E, Randolph GJ, Gram H, Owens GK. Interleukin-1 β promotes atheroprotective changes of advanced atherosclerotic lesions in mice. *Nat Med.* 2018. 24: 1418–1429
- Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev.* 2014. 262: 36–55
- Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 2005. 77: 3–15
- Gudbergsson JM, Johnsen KB, Skov MN, Duroux M. Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology.* 2016. 68: 579–592
- Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 2000. 275: 17728–17739
- Han S, Liang C-P, DeVries-Seimon T, Ranalletta M, Welch CL, Collins-Fletcher K, Accili D, Tabas I, Tall AR. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab.* 2006. 3: 257–266
- Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018. 19: 175–191
- He S, Wu C, Xiao J, Li D, Sun Z, Li M. Endothelial extracellular vesicles modulate the macrophage phenotype: Potential implications in atherosclerosis. *Scand J Immunol.* 2018

- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996. 6: 986–994
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation Research.* 2001. 88: 14-22
- Hirose K, Iwabuchi K, Shimada K, Kiyanagi T, Iwahara C, Nakayama H, Daida H. Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. *Lipids Health Dis.* 2011. 10: 1–18
- Högback S, Leppimäki P, Rudnäs B, Björklund S, Slotte JP, Törnquist K. Ceramide 1-phosphate increases intracellular free calcium concentrations in thyroid FRTL-5 cells: evidence for an effect mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular sphingosine 1-phosphate. *Biochem J.* 2003. 370: 111–119
- Huang C, Han J, Wu Y, Li S, Wang Q, Lin W, Zhu J. Exosomal MALAT1 derived from oxidized low-density lipoprotein-treated endothelial cells promotes M2 macrophage polarization. *Mol Med Rep.* 2018. 18: 509–515
- Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002. 22: 101–107
- Huber LC, Jüngel A, Distler JHW, Moritz F, Gay RE, Michel BA, Pisetsky DS, Gay S, Distler O. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis.* 2007. 12: 363–374
- Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, Franklin BS, Wenzel D, Pfeifer P, Flender A, Schmitz T, Yang X, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *J Mol Cell Cardiol.* 2017. 104: 43–52
- 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, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickenig G, Werner N. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2013a. 98: 94–106
- 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*. 2013b. 128: 2026–2038
- Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, Schmitz T, Dolf A, Endl E, Franklin BS, Sinning J-M, Vasa-Nicotera M, Nickenig G, Werner N. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc*. 2014. 3: 1-15
- Ji K, Qian L, Nan J, Xue Y, Zhang S, Wang G, Yin R, Zhu Y, Wang L, Ma J, Liao L, Tang J. Ox-LDL induces dysfunction of endothelial progenitor cells via activation of NF- κ B. *Biomed Res Int*. 2015. 2015: 1–9
- Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W, Kensler T, Ravichandran KS, Isakson BE, Wamhoff BR, Leitinger N. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation Research*. 2010. 107: 737–746
- Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017. 546: 498–503
- Karatasakis A, Danek BA, Karacsonyi J, Rangan BV, Roesle MK, Knickelbine T, Miedema MD, Khalili H, Ahmad Z, Abdullah S, Banerjee S, Brilakis ES. Effect of PCSK9 Inhibitors on Clinical Outcomes in Patients With Hypercholesterolemia: A Meta-Analysis of 35 Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*. 2017. 6: 1–55
- Karlson BW, Palmer MK, Nicholls SJ, Lundman P, Barter PJ. Doses of rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin that induce equal reductions in LDL-C and non-HDL-C: Results from the VOYAGER meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2016. 23: 744–747
- Karmali KN, Lloyd-Jones DM, van der Leeuw J, Goff DC, JR, Yusuf S, Zanchetti A, Glasziou P, Jackson R, Woodward M, Rodgers A, Neal BC, Berge E, Teo K, Davis BR, Chalmers J, Pepine C, Rahimi K, Sundström J. Blood pressure-lowering treatment based

on cardiovascular risk: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet*. 2014. 384: 591–598

Keyel PA, Tkacheva OA, Larregina AT, Salter RD. Coordinate stimulation of macrophages by microparticles and TLR ligands induces foam cell formation. *J Immunol*. 2012. 189: 4621–4629

Kim J, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006. 113: 1888–1904

Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int*. 2018. 2018: 1–27

Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 2002. 277: 49982–49988

Kunt T, Forst T, Früh B, Flohr T, Schneider S, Harzer O, Pfützner A, Engelbach M, Löbig M, Beyer J. Binding of monocytes from normolipidemic hyperglycemic patients with type 1 diabetes to endothelial cells is increased in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999. 107: 252–256

Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006. 38: 283–293

La Sala L, Prattichizzo F, Ceriello A. The link between diabetes and atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol*. 2019. 26: 15–24

Lallemant T, Rouahi M, Swiader A, Grazide M-H, Geoffre N, Alayrac P, Recazens E, Coste A, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Augé N. nSMase2 (Type 2-Neutral Sphingomyelinase) Deficiency or Inhibition by GW4869 Reduces Inflammation and Atherosclerosis in Apoe^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018. 38: 1479–1492

Lee A, Gu H, Gwon M-H, Yun J-M. Hesperetin suppresses LPS/high glucose-induced inflammatory responses via TLR/MyD88/NF- κ B signaling pathways in THP-1 cells. *Nutr Res Pract*. 2021a. 15: 591–603

Lee JY, Kang Y, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW, Han SJ. Acute Glucose Shift Induces the Activation of the NLRP3 Inflammasome in THP-1 Cells. *Int J Mol Sci*. 2021b. 22: 1–15

Lee SH, Kho AR, Lee SH, Hong DK, Kang BS, Park MK, Lee CJ, Yang HW, Woo SY, Park SW, Kim DY, Choi BY, Suh SW. Acid Sphingomyelinase Inhibitor, Imipramine,

Reduces Hippocampal Neuronal Death after Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2022. 23: 1–16

Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, ten Feizi, Langen H, Nussenzweig MC. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science.* 2002. 295: 1898–1901

Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, Chaput N, Chatterjee D, Court FA, Del Portillo HA, O'Driscoll L, Fais S, Falcon-Perez JM, Felderhoff-Mueser U, Fraile L, Gho YS, Görgens A, Gupta RC, an Hendrix, Hermann DM, Hill AF, Hochberg F, Horn PA, Kleijn D de, Kordelas L, Kramer BW, Krämer-Albers E-M, Laner-Plamberger S, Laitinen S, Leonardi T, Lorenowicz MJ, Lim SK, Lötvald J, Maguire CA, Marcilla A, Nazarenko I, Ochiya T, Patel T, Pedersen S, Pocsfalvi G, Pluchino S, Quesenberry P, Reischl IG, Rivera FJ, Sanzenbacher R, Schallmoser K, Slaper-Cortenbach I, Strunk D, Tonn T, Vader P, van Balkom BWM, Wauben M, Andaloussi SE, Théry C, Rohde E, Giebel B. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles.* 2015. 4: 1–31

Leuschner F, Dutta P, Gorbato R, Novobrantseva TI, Donahoe JS, Courties G, Lee KM, Kim JI, Markmann JF, Marinelli B, Panizzi P, Lee WW, Iwamoto Y, Milstein S, Epstein-Barash H, Cantley W, Wong J, Cortez-Retamozo V, Newton A, Love K, Libby P, Pittet MJ, Swirski FK, Koteliensky V, Langer R, Weissleder R, Anderson DG, Nahrendorf M. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol.* 2011. 29: 1005–1010

Leuschner F, Panizzi P, Chico-Calero I, Lee WW, Ueno T, Cortez-Retamozo V, Waterman P, Gorbato R, Marinelli B, Iwamoto Y, Chudnovskiy A, Figueiredo J-L, Sosnovik DE, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circulation Research.* 2010. 107: 1364–1373

Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011. 31: 1506–1516

Li C, Levin M, Kaplan DL. Bioelectric modulation of macrophage polarization. *Sci Rep.* 2016a. 6: 1–12

Li Y, G Zhang C, Wang X-H, Liu D-H. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016b. 20: 3863–3867

- Liao Y, Zhu E, Zhou W. Ox-LDL Aggravates the Oxidative Stress and Inflammatory Responses of THP-1 Macrophages by Reducing the Inhibition Effect of miR-491-5p on MMP-9. *Front Cardiovasc Med*. 2021. 8: 1–11
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002. 420: 868–874
- Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013. 368: 2004–2013
- Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019. 5: 56
- Liu C, Wu J, Jia H, Lu C, Liu J, Li Y, Guo M. Oncostatin M promotes the ox-LDL-induced activation of NLRP3 inflammasomes via the NF- κ B pathway in THP-1 macrophages and promotes the progression of atherosclerosis. *Ann Transl Med*. 2022. 10: 1–12
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001. 25: 402–408
- Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000. 20: 1572–1579
- Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PWF, Wolf PA, Levy D. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation*. 2006. 113: 791–798
- Luh EH, Shackford SR, Shatos MA, Pietropaoli JA. The effects of hyperosmolarity on the viability and function of endothelial cells. *J Surg Res*. 1996. 60: 122–128
- Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016. 430: 64–70
- Ma J, Chen L, Zhu X, Li Q, Hu L, Li H. Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-21a-5p promotes M2 macrophage polarization and reduces macrophage infiltration to attenuate atherosclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021. 53: 1227–1236
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004. 25: 677–686

- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002. 23: 549–555
- Marcos-Ramiro B, Oliva Nacarino P, Serrano-Pertierra E, Blanco-Gelaz MA, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Tuñón A, López-Larrea C, Millán J, Cernuda-Morollón E. Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. *BMC Neurosci.* 2014. 15: 1–13
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014. 6: 1–13
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006. 177: 7303–7311
- Matacchione G, Perugini J, Di Mercurio E, Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Senzacqua M, Storci G, Dani C, Lezoche G, Guerrieri M, Giordano A, Bonafè M, Olivieri F. Senescent macrophages in the human adipose tissue as a source of inflammaging. *GeroScience.* 2022. 44: 1941–1960
- McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018. 120: 1-16
- Melchior JT, Sawyer JK, Kelley KL, Shah R, Wilson MD, Hantgan RR, Rudel LL. LDL particle core enrichment in cholesteryl oleate increases proteoglycan binding and promotes atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2013. 54: 2495–2503
- 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: 1–14
- Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2008. 18: 228–232
- Miller YI, Choi S-H, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, Boullier A, Gonen A, Diehl CJ, Que X, Montano E, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circulation Research.* 2011. 108: 235–248
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000. 164: 6166–6173

- Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011. 145: 341–355
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD, Thomson AW. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004. 104: 3257–3266
- Mosior M, Newton AC. Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *J Biol Chem*. 1995. 270: 25526–25533
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014. 3: 1–14
- Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J*. 2012. 441: 789–802
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11: 723–737
- Musante L, Saraswat M, Ravidà A, Byrne B, Holthofer H. Recovery of urinary nanovesicles from ultracentrifugation supernatants. *Nephrol Dial Transplant*. 2013. 28: 1425–1433
- Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*. 2004. 45: 993–1007
- Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, Heyll K, Gremse F, Kiessling F, Grommes J, Weber C, Schober A. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest*. 2012. 122: 4190–4202
- Nielsen MC, Andersen MN, Rittig N, Rødgaard-Hansen S, Grønbaek H, Moestrup SK, Møller HJ, Etzerodt A. The macrophage-related biomarkers sCD163 and sCD206 are released by different shedding mechanisms. *J Leukoc Biol*. 2019. 106: 1129–1138
- Ning H, Chen H, Deng J, Xiao C, Xu M, Shan L, Yang C, Zhang Z. Exosomes secreted by FNDC5-BMMSCs protect myocardial infarction by anti-inflammation and macrophage polarization via NF- κ B signaling pathway and Nrf2/HO-1 axis. *Stem Cell Res Ther*. 2021. 12: 1–15

- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 1988. 334: 661–665
- 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
- Nomura S, Tandon N, Nakamura T, Cone J, Fukuhara. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001. 158: 277–287
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004. 4: 604–616
- Otsuka A, Azuma K, Iesaki T, Sato F, Hirose T, Shimizu T, Tanaka Y, Daida H, Kawamori R, Watada H. Temporary hyperglycaemia provokes monocyte adhesion to endothelial cells in rat thoracic aorta. *Diabetologia*. 2005. 48: 2667–2674
- Palma C de, 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
- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*. 2013. 34: 2436–2443
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 2007. 56: 45–50
- Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007. 193: 328–334
- Prattichizzo F, Nigris V de, Mancuso E, Spiga R, Giuliani A, Maccacchione G, Lazzarini R, Marcheselli F, Recchioni R, Testa R, La Sala L, Rippo MR, Procopio AD, Olivieri F, Ceriello A. Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox Biol*. 2018. 15: 170–181

- Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*. 2012. 221: 2–11
- Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, Eva A, Varesio L, Giovarelli M, Bosco MC. Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol*. 2017. 8: 1097
- Raj DAA, Fiume I, Capasso G, Pocsfalvi G. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int*. 2012. 81: 1263–1272
- Rautou P-E, Leroyer AS, Ramkhalawon B, Devue C, Duflaut D, Vion A-C, Nalbhone G, Castier Y, Leseche G, Lehoux S, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circulation Research*. 2011. 108: 335–343
- Rhoads JP, Major AS. How Oxidized Low-Density Lipoprotein Activates Inflammatory Responses. *Crit Rev Immunol*. 2018. 38: 333–342
- Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017. 377: 1119–1131
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011: 1–4
- Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo J-L, Gorbakov R, Sukhova GK, Gerhardt LMS, Smyth D, Zavitz CCJ, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*. 2013. 19: 1166–1172
- Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009. 6: 399–409
- Rogers PD, Thornton J, Barker KS, McDaniel DO, Sacks GS, Swiatlo E, McDaniel LS. Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA

- microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2003. 71: 2087–2094
- Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 13531–13536
- Ross R, Glomset JA. The Pathogenesis of Atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1975: 420–425
- Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015. 2015: 1–17
- S Parahuleva M, Euler G, Mardini A, Parviz B, Schieffer B, Schulz R, Aslam M. Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: a pilot study. *Sci Rep*. 2017. 7: 1–10
- Saenz-Pipaon G, Echeverria S, Orbe J, Roncal C. Urinary Extracellular Vesicles for Diabetic Kidney Disease Diagnosis. *J Clin Med*. 2021. 10: 1–20
- Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*. 2003. 24: 313–318
- Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One*. 2009. 4: 1-9
- Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1994. 153: 3245–3255
- Sawa-Wejksza K, Dudek A, Lemieszek M, Kaławaj K, Kandefer-Szerszeń M. Colon cancer-derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumour Biol*. 2018. 40: 1-12
- Schilling JD, Machkovech HM, He L, Sidhu R, Fujiwara H, Weber K, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. *J Biol Chem*. 2013. 288: 2923–2932
- Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*. 1989. 9: 908–918

- Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, Weigert A, Parnham MJ. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol*. 2017. 88: 58–68
- Si S, Moss JR, Sullivan TR, Newton SS, Stocks NP. Effectiveness of general practice-based health checks: a systematic review and meta-analysis. *Br J Gen Pract*. 2014. 64: 47-53
- Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem*. 1988. 263: 18205–18212
- Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem*. 2000. 275: 38640–38644
- Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol Chem*. 2002. 277: 26796–26803
- Sneck M, Nguyen SD, Pihlajamaa T, Yohannes G, Riekkola M-L, Milne R, Kovanen PT, Oörni K. Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH. *J Lipid Res*. 2012. 53: 1832–1839
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009. 86: 1065–1073
- Stamatikos A, Knight E, Vojtech L, Bi L, Wacker BK, Tang C, Dichek DA. Exosome-Mediated Transfer of Anti-miR-33a-5p from Transduced Endothelial Cells Enhances Macrophage and Vascular Smooth Muscle Cell Cholesterol Efflux. *Hum Gene Ther*. 2020. 31: 219–232
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992. 176: 287–292
- Tabas I, Tall A, Accili D. The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression. *Circulation Research*. 2010. 106: 58–67
- Tedesco S, Majo F de, Kim J, Trenti A, Trevisi L, Fadini GP, Bolego C, Zandstra PW, Cignarella A, Vitiello L. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-

Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol.* 2018. 9: 71

Telford WG, Babin SA, Khorev SV, Rowe SH. Green fiber lasers: an alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry A.* 2009. 75: 1031–1039

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006: 1-29

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, Lavieau 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, Linnemannstōns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lőrincz ÁM, Lōtvall 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, Mōller A, Mōller Jōrgensen 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, Sōdar 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: 1–42

- Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A. Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 3. Effects in patients at different levels of cardiovascular risk--overview and meta-analyses of randomized trials. *J Hypertens*. 2014. 32: 2305–2314
- 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
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*. 1982. 42: 1530–1536
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980. 26: 171–176
- Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016. 106: 148–156
- van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*. 2013. 31: 317–343
- 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
- Venugopal SK, Devaraj S, Yang T, Jialal I. Alpha-tocopherol decreases superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions via inhibition of protein kinase C- α . *Diabetes*. 2002. 51: 3049–3054
- Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, Dijkstra CD, Beelen RHJ. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014. 219: 695–703
- Wang S, Zhan J, Lin X, Wang Y, Wang Y, Liu Y. CircRNA-0077930 from hyperglycaemia-stimulated vascular endothelial cell exosomes regulates senescence in vascular smooth muscle cells. *Cell Biochem Funct*. 2020. 38: 1056–1068
- Wang Y, Liu J, Chen X, Sun H, Peng S, Kuang Y, Pi J, Zhuang T, Zhang L, Yu Z, Tomlinson B, Chan P, Chen Y, Zhang Y, Li Y. Dysfunctional endothelial-derived microparticles promote inflammatory macrophage formation via NF- κ B and IL-1 β signal pathways. *J Cell Mol Med*. 2019. 23: 476–486

- Wiktorowicz JE, Chowdhury IH, Stafford S, Choudhuri S, Dey N, Garg NJ. Integrated Functional Analysis of the Nuclear Proteome of Classically and Alternatively Activated Macrophages. *Mediators Inflamm.* 2019. 2019: 1–20
- World Health Organisation. 2021. WHO Fact sheet Cardiovascular diseases (CVDs). Verfügbar unter [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: 30.06.2021)
- Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, Nardo D de, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyer M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity.* 2014. 40: 274–288
- Yin M, Loyer X, Boulanger CM. Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015. 763: 90–103
- Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lananç F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004. 364: 937–952
- Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol.* 2007. 212: 174–181
- Zernecke A, Bot I, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Meiler S, Krohn R, Schober A, Sperandio M, Soehnlein O, Bornemann J, Tacke F, Biessen EA, Weber C. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circulation Research.* 2008. 102: 209–217
- Zhang Q, Wu S, Sun G, Zhang R, Li X, Zhang Y, Huang F, Yuan D. Hyperglycemia aggravates monocyte-endothelial adhesion in human umbilical vein endothelial cells from women with gestational diabetes mellitus by inducing Cx43 overexpression. *Ann Transl Med.* 2021. 9: 1–14
- 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: 1–20

9. Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit möchte ich zuvorderst meinen Doktorvater PD Dr. Felix Jansen danken, der mit positiver Energie, einem ansteckenden Lächeln und guten Ratschlägen so manche Hürde aus dem Weg geräumt hat.

Auch danken möchte ich Prof. Dr. Nikos Werner, der meine Arbeit zu Beginn betreut hat und bis zum Schluss immer unkomplizierte Unterstützung leistete.

Ein riesiger Dank geht an Dr. Andreas Zietzer, der das Thema entwickelt und die Experimente mit mir durchdacht hat. Im Labor hat er mich an die Hand genommen bis ich selbst laufen konnte und war dann immer da, wenn ich jemanden brauchte, der mir die nächsten Schritte zeigt. Danke für deine unendliche Geduld!

Vielen Dank an Anna Flender und Paula Levermann, die immer da waren und immer geholfen haben wo sie konnten.

Danke an Lisann, Lukas und Paul, stellvertretend für alle großartigen DoktorandenkollegInnen, die großartige Gesellschaft im Labor waren und Freunde geworden sind.

Ein sehr herzlicher Dank gebührt der Deutschen Herzstiftung e.V. für die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen des Kaltenbach-Stipendiums.

Danke an meine Brudis Tobias, Lukas und Samuel sowie an Jonathan und Lukas, dass ihr meine besten Freunde seid.

Danke an Mama und Papa für eure Korrekturen, eure Motivation, euren stetigen Rückhalt und dass ihr einfach großartige Vorbilder seid.

Und natürlich einen unbeschreiblich großen Dank an meine Frau Amelie. Du legst mir täglich die Welt zu Füßen. Ohne dich wäre all das nicht möglich gewesen!