

Verlust der Ceramidsynthase 5 Funktion verringert die Entwicklung von Aortenklappenstenosen bei Mäusen mit fett- und cholesterinreicher Diät

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Laurine Lucia Vivian Sophie Reese

aus Burgwedel

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Andreas Zietzer
2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Röll

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	14
1.4	Diskussion	21
1.5	Zusammenfassung	24
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26
2.	Veröffentlichung	33
3.	Erklärung zum Eigenanteil	34
4.	Danksagung	35
5.	Lebenslauf	36

Abkürzungsverzeichnis

AKS	Aortenklappenstenose
ANOVA	Varianzanalyse (<i>ANalysis Of Variance</i>)
BSA	bovines Serum Albumin
C16 Ceramid	d18:1,16:0 Ceramid
CerS	Ceramidsynthase
CerS5	Ceramidsynthase 5
CerS5 ^{-/-}	CerS5 Knockout
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
FBS	Fetales Bovines Serum
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
KD	Knockdown
KO	Knockout
LM	Lipidmischung
LPS	Lipopolysaccharid
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
ox-LDL	oxidised low-density lipoprotein
PCM	Pro-kalzifizierendes Medium

rt PCR	real-time PCR
SEM	standard error of mean
siRNA Cont	Kontroll small interfering RNA
siRNA	Small interfering RNA
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VECs	Humane aortale valvuläre Endothelzellen
VICs	human aortic valvular interstitial cells
WD	Westliche Diät, fettreiche und cholesterinreiche Ernährung
WT	Wildtyp
4-PL-Analyse	4-Parameter-Logistik-Analyse

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Aortenklappenstenose (AKS) ist die häufigste Herzklappenerkrankung beim Menschen und gewinnt aufgrund ihrer stark altersabhängigen Inzidenz zunehmend an Bedeutung (Martinsson et al., 2015; Yadjir et al., 2020). Bei über 75-Jährigen liegt die Inzidenz pro Jahr bei 2,8 %. Die AKS ist mit einer deutlich verkürzten Lebenserwartung verbunden: Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit einer moderaten AKS 15,5 % im Vergleich zu 37,3 % bei Patienten ohne oder mit milder AKS (Jacquemyn et al., 2024). Bei einer schweren unbehandelten AKS steigt die 4-Jahres-Mortalität auf knapp 45 % (Généreux et al., 2023). Die Entstehung der AKS ist nicht vollständig verstanden und bisher konnte keine medikamentöse Therapie das Fortschreiten der AKS verlangsamen. Die Therapieoptionen beschränken sich daher auf den Ersatz der defekten Aortenklappe. Unter anderem testeten mehrere Studien die Wirksamkeit von Statinen auf die Entwicklung der AKS. Randomisiert-kontrollierte Studien konnten jedoch keinen protektiven Effekt nachweisen (Chan et al., 2010; Evangelista et al., 2024).

Risikofaktoren für die Entstehung einer AKS sind neben hohem Alter und einer bikuspiden Aortenklappe unter anderem Übergewicht und Insulinresistenz (Larsson et al., 2019; Yan et al., 2017). Endotheliale Inflammation und Kalzifikation wurden als Hauptmechanismen bei der Entstehung einer AKS identifiziert (Coté et al., 2013; Lindman et al., 2016; Mohler et al., 2001). Die Aortenklappe besteht aus einer äußeren Schicht von Endothelzellen (VECs, humane aortale valvuläre endotheliale Zellen) und inneren Schichten aus Kollagen, Glykosaminoglykanen, Elastin und überwiegend interstitiellen Zellen (VICs, humane aortale valvuläre interstitielle Zellen) (Lerman et al., 2015). Stenotische Aortenklappen zeigen eine Verdickung der Klappensegel mit einer Infiltration inflammatorischer Zellen und Lipidablagerungen auf (Coté et al., 2013; Sverdlov et al., 2011). Diese Lipidablagerungen von unter anderem oxidiertem LDL (ox-LDL) triggern entzündliche Prozesse, die eine osteogene Differenzierung der VICs über den Transkriptionsfaktor Runx-2 befördern. (Dharmarajan et al., 2021; Goody et al., 2020; Lindman et al., 2016). Aktivierte Leukozyten sezernieren Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

und Interleukin-1 β (IL-1 β), welche ebenfalls die osteogene Differenzierung der VICs befördern, wobei Verkalkungen oft in Bereichen von Inflammation zu finden sind (Galeone et al., 2013).

Ceramide sind bioaktive Sphingolipide, die zellulären Stress regulieren (Gaggini et al., 2022). Die Synthese von Ceramiden erfolgt über drei Hauptwege: die De-novo-Synthese, den Salvage Pathway und die Hydrolyse von Sphingomyelin. In der De-novo-Synthese katalysiert die Serin-Palmitoyltransferase die Kondensation von L-Serin und Palmitinsäure zu 3-Keto-Dihydro-Sphingosin, welches schließlich zu Sphingosin umgewandelt wird. Aus Sphingosin werden durch verschiedene Ceramidsynthasen (CerS) Ceramide mit unterschiedlich langen Acylgruppen gebildet (Kitatani et al., 2008). Die Länge der Acylgruppe bestimmt dabei ihre Funktion, wobei unterschiedliche Enzyme Ceramide mit unterschiedlichen Acylgruppenlängen produzieren (Airola und Hannun, 2013). Die Ceramidsynthase 5 (CerS5) produziert das besonders häufig vorkommende d18:1,16:0 Ceramid (C16 Ceramid), welches mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko in Verbindung gebracht wird. CerS5 ist notwendig, um die C16 Ceramid-Serumlevel bei Mäusen aufrechtzuerhalten (Gosejacob et al., 2016). Zellulärer Stress führt zu einer gesteigerten De-novo-Synthese von Ceramiden (Goldkorn et al., 1998; Meyer und de Groot, 2003). Der zweite Synthesepfad führt über die Hydrolyse von Sphingomyelin. Dabei wird Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen gespalten, was zur Bildung von Ceramid und Phosphocholin führt. Die neutrale 2 Sphingomyelinase (nSMase 2) wird hierbei durch externe Signale wie TNF- α oder oxidativen Stress aktiviert (Clarke et al., 2011; Levy et al., 2006). Der Salvage Pathway stellt einen weiteren Mechanismus zur Ceramidproduktion dar. In diesem Weg werden Sphingolipide abgebaut, wodurch Sphingosin freigesetzt wird. Dieses Sphingosin kann dann von CerS zu Ceramiden verarbeitet werden (Kitatani et al., 2008). Neben dem Knockout (KO) von CerS oder SMasen werden auch Myriocin, ein Inhibitor der Serin-Palmitoyltransferase und GW4869, ein Inhibitor der nSMasen, eingesetzt um die Ceramidsynthese experimentell zu hemmen (Miyake et al., 1995; Wu et al., 2021).

Ceramide wurden oft im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen untersucht. Dabei wurden Ceramide mit der Entstehung von Atherosklerose, Diabetes, Übergewicht und Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht (Choi et al., 2021; Ji et al., 2017; Laaksonen et

al., 2016; Mandal et al., 2021). Ein erhöhter Serumceramidspiegel ist mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert. Ceramid Risikoscores können zur Evaluation des kardiovaskulären Risikos eingesetzt werden (Hilvo et al., 2020a; Vasile et al., 2021). Im Mausmodell konnte die Hemmung der nSMase2 die Bildung atherosklerotischer Plaques verringern (Lallemand et al., 2018). Im Kontext von Diabetes führen Ceramide zu einer verminderten Insulinsynthese und einer Insulinresistenz, indem sie unter anderem die GLUT4 Translokation modulieren (Galadari et al., 2013). Bei Mäusen reguliert CerS5 die Synthese von C16 Ceramid, und der Verlust von CerS5 konnte vor diätinduziertem Übergewicht schützen (Gosejacob et al., 2016). Dieser Effekt wurde auch bei Inhibition der Ceramidsynthese durch Myriocin beobachtet (Yang et al., 2009). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz wurden erhöhte Ceramidspiegel sowie eine erhöhte Aktivität der Serin-Palmitoyltransferase im Myokard nachgewiesen (Ji et al., 2017). In Tierversuchen zeigten Mäuse, bei denen die De-novo-Ceramidsynthese inhibiert wurde, eine verbesserte Ejektionsfraktion (Hoffman et al., 2021).

Ceramide sind Regulatoren von Entzündungsreaktionen. TNF- α führt über die Stimulation der Ceramidsynthese, beispielsweise durch die Aktivierung der nSMase2, zu einer erhöhten Ceramidproduktion. Diese führt über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur weiteren Immunaktivierung und Apoptose (Al-Rashed et al., 2020; Gaggini et al., 2022; Hernández-Corbacho et al., 2015). Gesättigte Fettsäuren führen, vermittelt über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), zu einer Stimulation der De-novo-Synthese von Ceramiden (Holland et al., 2011; Lancaster et al., 2018). Diese lipidinduzierte Ceramidproduktion führt dann zu einer verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α (Schilling et al., 2013). Der Einfluss von Ceramiden auf Entzündungsreaktionen konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden. In Mäusen führt ein KO oder eine Inhibition der nSMase2 zu einer verringerten Inflammation in atherosklerotischen Plaques (Lallemand et al., 2018). Eine Analyse menschlicher Blutproben zeigte eine starke Korrelation zwischen den Serumceramiden und dem proinflammatorischen Interleukin-6 (IL-6) (de Mello et al., 2009). Darüber hinaus wurden Ceramide mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Ceramidsynthase 6 (CerS6) die T-Zell-Aktivierung beeinflusst und als potenzieller Ansatz für die Behandlung der Graft-vs.-Host-Krankheit dient (Sofi et al., 2017).

Ceramide wurden zudem als Regulatoren der Kalzifizierung identifiziert. Sie modulieren die TLR4 abhängige, ox-LDL induzierte Verkalkung von humanen vaskulären glatten Muskelzellen. So konnte beispielsweise GW4869 die durch ox-LDL induzierte Apoptose und Verkalkung dieser Zellen verringern, während die Hinzugabe von C2-Ceramid die Verkalkung verstärkte (Liao et al., 2013; Song et al., 2017).

Obwohl Ceramide die Hauptentstehungsmechanismen der Aortenklappenstenose, Inflammation und Kalzifikation, regulieren und in Zusammenhang mit Atherosklerose gebracht werden, wurde ihr Einfluss auf die Entwicklung der Aortenklappenstenose bislang nicht untersucht. Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss der CerS5 in der Entwicklung der AKS, sowie den Einfluss auf valvuläre Inflammation und Kalzifikation *in vivo* und *in vitro* zu analysieren. In einem Tiermodell der AKS, dem Drahtverletzungsmodell, wurde die Entwicklung der AKS in WT- und CerS5^{-/-} Mäusen verglichen. Da Ceramide oft mit Adipositas in Verbindung gebracht wurden und eine fett- und cholesterinreiche Ernährung (Westliche Diät, WD) zu einem Anstieg der Serumceramide in Mäusen führt, wurde zusätzlich der Einfluss von WD untersucht. Wir haben erwartet, dass der Verlust oder die Verringerung der CerS5-Aktivität vor Entzündungsreaktionen und Kalzifikation schützt und somit zu einer verminderten Entwicklung der AKS führt. Darüber hinaus vermuteten wir, dass eine WD die Inflammation und Kalzifikation der Aortenklappe verstärken würde und CerS5^{-/-} Mäuse davor geschützt sind.

1.2 Material und Methoden

Zur Untersuchung der Entwicklung von Aortenklappenstenosen und des Effekts von WD wurden CerS5^{-/-} und Wildtyp (WT) C57BL/6-J Mäuse, jeweils mit normaler und WD, in einem Drahtverletzungsmodell zur Stimulierung der AKS Entwicklung untersucht.

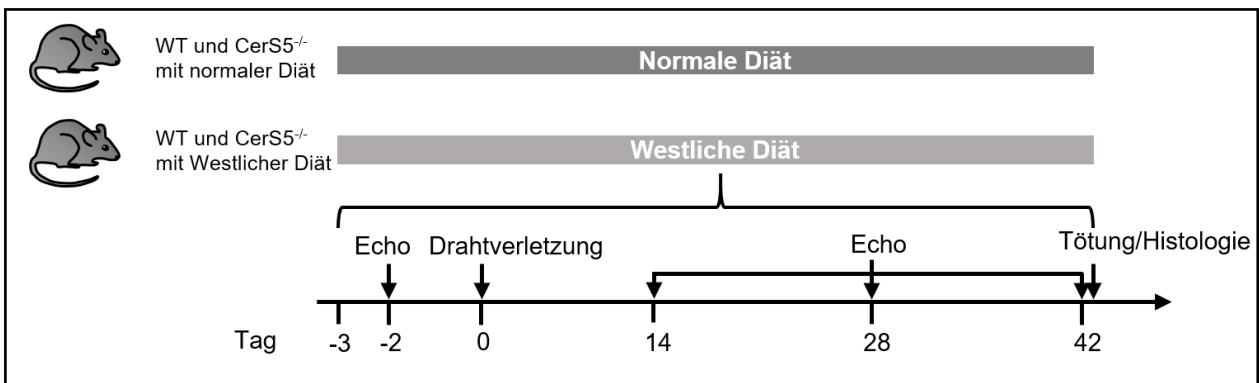


Abb.1: Versuchsaufbau der Tierversuche. Modifiziert nach Reese *et al* (Reese *et al.*, 2024), Wildtyp (WT), CerS5 Knockout (CerS5^{-/-}).

Mausmodell und Drahtverletzungsmodell

Die CerS5^{-/-} Mäuse wurden ursprünglich von Gosejacob *et al.* gezüchtet. Es handelt sich dabei um einen konstitutionellen KO bei dem das CerS5-Gen durch homologe Rekombination mit einem NLS-lacZ-Gen und einem Neomycin-Resistenzgen ersetzt wurde. Nach Entfernung des Neomycin-Resistenzgens wurden die Mäuse mit C57BL/6JCrI-Mäusen rückgekreuzt (Gosejacob *et al.*, 2016).

Die WD enthält 21 % Fett und 0,25 % Cholesterol (Sniff E15721-347). Diese Zusammensetzung ist gut etabliert und simuliert die Auswirkungen einer westlichen Ernährung im Mausmodell (Getz und Reardon, 2006; Hasegawa *et al.*, 2020). Die Diät wurde drei Tage vor Stimulation der AKS begonnen.

Die Entwicklung einer AKS wurde im Alter von 14-16 Wochen mit einem Drahtverletzungsmodell stimuliert. Dieses Modell wurde ursprünglich von Honda *et al* beschrieben und dann von Niepmann *et al* weiterentwickelt. Dabei wird ein 15° gebogener Koronarangiographiedraht unter echokardiographischer Kontrolle über die A. carotis bis in den linken Ventrikel vorgeschoben und dann auf der Ebene der Aortenklappe 200-mal rotiert und 20-mal vor- und zurückgezogen (Honda *et al.*, 2014; Niepmann *et al.*, 2019).

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen mit dem Aktenzeichen 81-02.04.2019.A437 genehmigt.

Echokardiographie

Die Entwicklung der AKS wurde dann mittels Echokardiographie alle 14 Tage sowie vor der Drahtverletzung beurteilt. Hierfür wurde eine Fujifilm Visulasonics Vevo 2100 Ultra High Frequency Imaging Plattform verwendet und die Mäuse wurden mit 1,5 % Isofluran narkotisiert. Die maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe als Hauptparameter für die Entwicklung einer AKS wurde mit einem Pulsed-Wave Doppler bestimmt. Daneben wurden auch die Ejektionsfraktion und die linksventrikuläre Masse bestimmt.

Histologie

Die Tiere wurden 42 Tage nach der Drahtverletzung getötet und die Herzen entnommen. Diese wurden in Gewebe-Gefriermedium (Leica) eingebettet und in 8- μ m-dicke Schnitte auf Klappenebene geschnitten.

Zur Analyse der Immunezellinfiltration wurde eine CD68-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst mit -20 °C kaltem Aceton fixiert, anschließend mit bovinem Serum Albumin (BSA) geblockt und mit dem Primärantikörper (Ratte, Anti-Maus CD68, antibodies online ABIN 181836) 1:100 verdünnt in 2 % BSA in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Sekundärantikörper (Cy3, Esel Anti-Ratte AffiniPure, Jackson ImmunoResearch 712-165-153) wurde 1:500 verdünnt eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) eingedeckt. Zur Quantifizierung der Verkalkung wurde eine *von Kossa* Färbung nach Angaben des Herstellers (Merck) durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte 30 Minuten in 2%iger Silbernitratlösung und anschließend 5 Minuten in einer Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Die Dicke der Aortenklappe wurde in einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gemessen. Die Färbung erfolgte nach Standardprotokoll. Die Hämatoxylin- und Eosinlösungen (Hämatoxylinlösung nach Gill II, Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig, beide Carl Roth) wurden dabei jeweils 30 Sekunden inkubiert. Die Fibrosierung wurde mittels Siriusrot-Färbung bestimmt. Dafür wurden die Schnitte 15 Minuten in einer 0,1%igen Siriusrotlösung (Direktrot 80 Sigma in 1,2 % Pikrinsäure) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten in 10-facher Vergrößerung, und die

positiven Flächen für CD68, von Kossa und Siriusrot wurden automatisch mit der Zen3.2 pro Software (Zeiss) bestimmt.

Zellkultur

Für *in vitro* Versuche wurden VICs und THP-1 Zellen verwendet. Ein CerS5 und CerS6 Knockdown (KD) wurde mit small interfering RNA (siRNA, Invitrogen Cat# AM16708, Assay ID CerS5: 131807, CerS6: 149484; silencer negative control no.1 Cat# AM4611) in einer Konzentration von 10 nM und Lipofectamin (RNAiMAX, Invitrogen) in einer Konzentration von 3 µL/ml durchgeführt. Der KD erfolgte in antibiotikafreiem Medium mit Opti-MEM serumreduziertem Medium (Thermo Fisher). Die Effektivität des KD wurde mittels Real-Time-PCR (rtPCR) überprüft. Die RNA-Isolierung wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Trizol (Invitrogen) lysiert, die RNA nach Hinzugabe von Chloroform extrahiert und anschließend mit Isopropanol gefällt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem NonoDrop 2000 (Thermo Fisher) bestimmt. Die Herstellung von cDNA erfolgte mit einem cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase inhibitor (Thermo Fisher) nach Angaben des Herstellers. Für die rtPCR wurden Taqman[®]-Assays für RUNX-2, CerS5, CerS6 und GAPDH als endogene Kontrolle (Thermo Fisher, RUNX-2 Cat# 4351370, Hs01047973_m1, CerS5 Cat# 4448892, Hs00332291_m1, CerS6 Cat# 4448892, Hs00826756_m1, GAPDH Cat# 4351368, Hs02758991_g1), Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher) und auf 1 ng/µl verdünnte cDNA verwendet. Die rtPCR wurde mit einem QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt und die relative Genexpression wurde als $2^{-(ddCT)}$ berechnet.

Für die Versuche zur *in vitro* Verkalkung von VICs, wurde die Verkalkung der Zellen mit einem prokalzifizierenden Medium (PCM) für 7 oder 21 Tage stimuliert. Das Medium enthält 2 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat, DMEM mit 5 % FBS und 50 µg/mL Ascorbinsäure und wurde dreimal pro Woche gewechselt (Goto et al., 2019). Zur Analyse der Verkalkung wurden die Zellen nach Fixierung mit 4 % Formaldehydlösung mit Alizarinrot (Sigma) gefärbt. Dazu wurde mit destilliertem Wasser eine 2 %-Alizarinrot-Lösung hergestellt und der pH auf 4,2 eingestellt. Die Färbung erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zur Analyse wurde die Alizarinrot-Färbung mit

Hexadecylpyridiniumchlorid-Monohydrat (Sigma) aufgelöst und die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

Zur Untersuchung der immunologischen Effekte von Ceramiden wurden Versuche an THP-1-Zellen durchgeführt. THP-1-Zellen sind häufig verwendete humane, monozytenähnliche Tumorzellen (Chanput et al., 2014). Für die Simulation der WD, von der angenommen wird, die Ceramidsynthese zu stimulieren, wurden die Zellen mit einer Lipidmischung, die Arachnoidon-, Linol-, Linolen-, Myristin-, Öl-, Palmitin-, Stearinsäure und Cholesterol enthält (1:200 verdünnt, Sigma, L0288) für 12 h behandelt (Beyaz et al., 2016; Zaytouni et al., 2017). Anschließend wurden die Zellen mit 50 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) (aus *E. coli*, Sigma, L2630) stimuliert. Die Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β im Zellüberstand wurden mit einem ELISA (beide DuoSet ELISA Kit, R&D System) bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurde eine 96-well Platte mit dem Capture-Antikörper inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Zellüberstände und die Standardreihe für zwei Stunden inkubiert, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation mit dem Detektionsantikörper. Zur Signalentwicklung wurde Streptavidin-HRP hinzugefügt, gefolgt von der Inkubation mit TMB-Substratlösung (TMB Substrate reagent set, BioLegend). Die Absorption wurde bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 570 nm mit einem TECAN Infinite M Plex Mikroplatten-Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte mit einer 4-Parameter-Logistik-Analyse (4-PL Analyse), die mit GraphPad Prism10 durchgeführt wurde. Zur Sicherstellung der Zellviabilität wurde diese mit einem MTT-Assay (Merck) gemessen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism10 durchgeführt. Für die Analyse von zwei Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, für mehr als zwei Gruppen wurde eine one-way ANOVA mit einem Tukey's Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Für Versuche im Zeitverlauf wurde eine two-way ANOVA mit Tukey's Mehrfachevergleiche Test durchgeführt. Alle p-Werte sind doppelseitig.

1.3 Ergebnisse

Der Verlust der CerS5 Funktion führt in Kombination mit Westlicher Diät zu einer verringerten Entwicklung von Aortenklappenstenosen bei Mäusen

Bevor, 14, 28 und 42 Tage nach der Drahtverletzung wurde die Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe als Parameter für die Entwicklung einer AKS gemessen. Die Flussgeschwindigkeiten stiegen 14 Tagen nach der Drahtverletzung in beiden Gruppen signifikant an. Dabei zeigten CerS5^{-/-} Mäuse mit WD eine signifikant geringere maximale Flussgeschwindigkeit als WT Mäuse 28 und 42 Tage nach Drahtverletzung $1866,6 \pm 183,87$ mm/s vs. $1431,32 \pm 92,5$ mm/s, $p=0,028$. Außerdem bestand kein signifikanter Unterschied der Flussgeschwindigkeit vor und nach der Drahtverletzung bei CerS5^{-/-} Mäusen (Abbildung 2). Es gab keine Unterschiede in der Ejektionsfraktion oder der linksventrikulären Masse zwischen den Gruppen. Die Körpergewichte der Mäuse fettreicher Ernährung waren ähnlich zu denen mit normaler Diät. Es kam in den Gruppen mit normaler Diät und WD zu einer Gewichtszunahme von ca. 20 % (Reese et al., 2024).

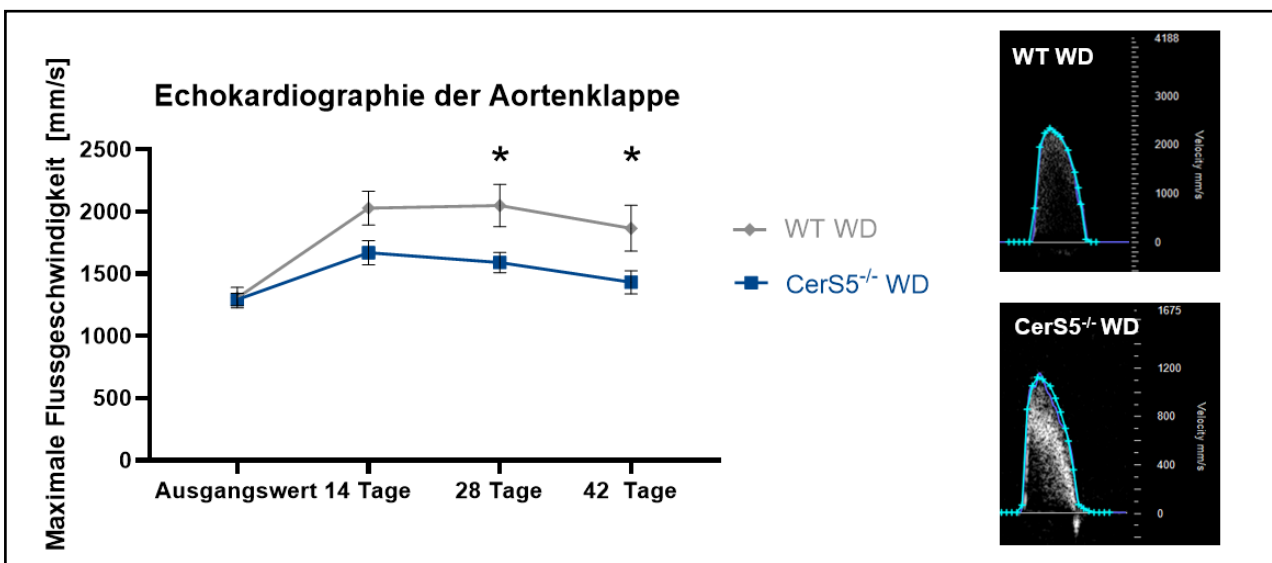


Abb. 2: Echokardiographische Analyse der maximalen Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe bei Mäusen nach Drahtverletzung und WD, WT n=8 vs. CerS5^{-/-} n=14, mit repräsentativen Bildern der Dopplersignale 42 Tage nach Drahtverletzung. Alle Daten mit Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.05$. Modifiziert nach Reese *et al* (Reese et al., 2024), Wildtyp (WT), CerS5 Knockout (CerS5^{-/-}), Westliche Diät (WD).

CerS5 Knockout reduziert die Immunzellinfiltration und die Verkalkung der Aortenklappe bei Mäusen mit Westlicher Diät

Die Analyse der Immunzellinfiltration mit einer CD68 Färbung zeigte, dass die Aortenklappen von CerS5^{-/-} Mäusen mit WD eine deutlich geringere Immunzellinfiltration aufweisen als WT Mäuse mit WD 3035±586,1 μm^2 vs. 8745±1182 μm^2 p=0,0002. Auch die Verkalkung, gemessen mittels von Kossa Färbung, war bei CerS5^{-/-} Mäusen mit WD signifikant geringer 2331±444,1 μm^2 vs. 4282±601,4 μm^2 p=0,015 (Abbildung 3). Die Dicke der Aortenklappe und die Fibrosierung, gemessen mittels HE- und Siriusrot-Färbung, war in beiden Gruppen ähnlich (Reese et al., 2024).

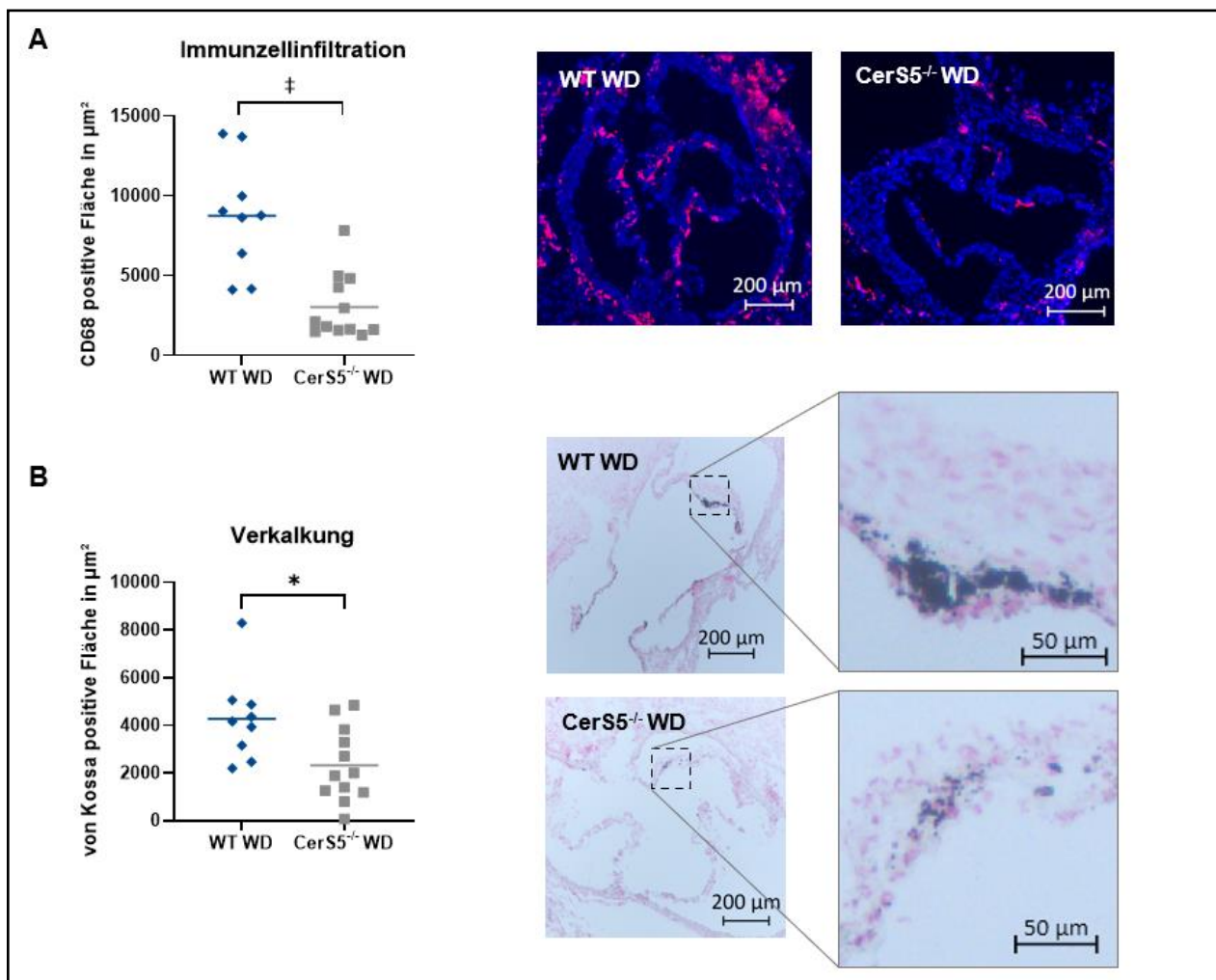


Abb. 3: Histologische Analyse der Aortenklappe von Mäusen mit Drahtverletzung und fett- und cholesterinreicher Diät. A Immunzellinfiltration, CD68 Färbung. B Verkalkung, von Kossa Färbung. WT n=9 vs CerS5^{-/-} n=12. Datenpunkte mit Mittelwert, *p < 0,05, ‡p < 0,001. Ein ungepaarter t-Test wurde für A und B durchgeführt. Modifiziert

nach *Reese et al* (Reese et al., 2024), Wildtyp (WT), CerS5 Knockout (CerS5^{-/-}), Westliche Diät (WD).

CerS5 Knockout kann die Entwicklung einer Aortenklappenstenose bei normaler Diät nicht verhindern

Im Gegensatz zu dem Versuch mit WD, zeigte sich bei normaler Diät kein Unterschied der maximalen Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe zwischen CerS5^{-/-} und WT Mäusen. Auch in der histologischen Analyse der Immunzellinfiltration und der Verkalkung gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 4).

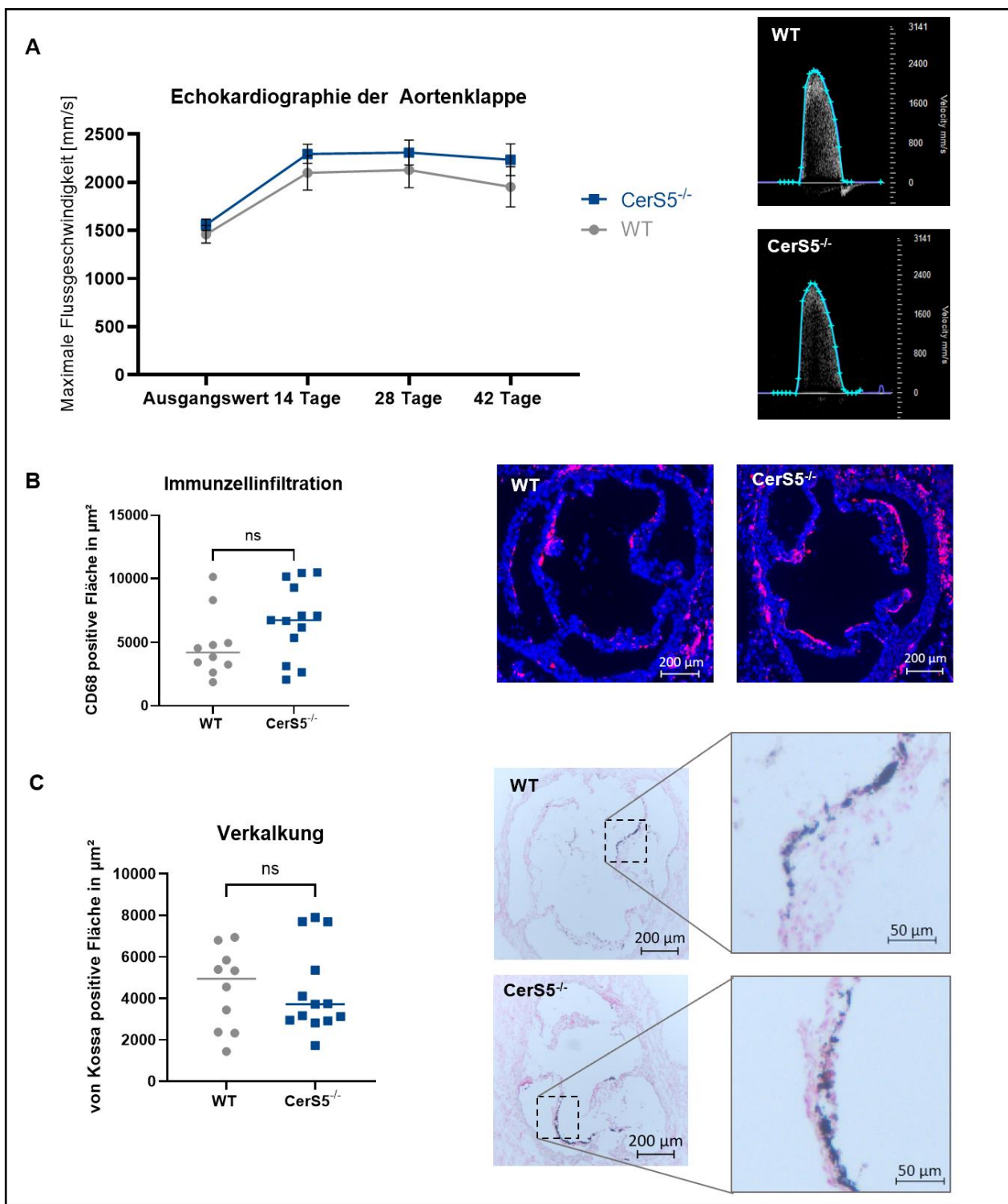


Abb. 4: Echokardiographische Analyse der maximalen Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe und histologische Analyse der Aortenklappe von Mäusen mit Drahtverletzung und normaler Diät. A Echokardiographische Analyse der maximalen Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe bei Mäusen nach Drahtverletzung mit normaler Diät. B Immunzellinfiltration, CD68 Färbung. C Verkalkung, von Kossa Färbung. WT n=10 vs. CerS5^{-/-} n=13. Mittelwert \pm SEM in A. Datenpunkte mit Mittelwert für B und

C. Ein ungepaarter t-Test wurde für B und C durchgeführt, ns = nicht signifikant. Modifiziert nach Reese *et al* (Reese et al., 2024), Wildtyp (WT), CerS5 Knockout (CerS5^{-/-}).

CerS5 reguliert die Verkalkung von VICs *in vitro*

Um die Ergebnisse der Tierversuche für humane Zellen zu überprüfen, wurden *in vitro* Kalzifizierungsversuche mit VICs durchgeführt. Die Behandlung mit PCM führte nach sieben Tagen zu einer signifikant erhöhten RUNX-2 Genexpression im Vergleich zum Kontrollmedium, wobei dieser Effekt nach 21 Tagen nicht mehr beobachtet werden konnte. Ebenso zeigte sich nach siebentägiger Stimulation mit PCM eine signifikante Erhöhung der CerS5 und CerS6 Expression, CerS5: Relative Genexpression CM: $1 \pm 0,001$, PCM: $1,552 \pm 0,102$ $p=0,006$. Diese Veränderungen korrelieren mit einer verstärkten *in vitro* Kalzifizierung: Bereits nach sieben Tagen führte die Behandlung mit PCM zu einer deutlichen Verkalkung der VICs, die mittels Alizarinrot-Färbung quantifiziert wurde. Diese Verkalkung konnte durch einen KD von Cer S5, CerS6 oder der kombinierten Suppression beider Gene (CerS5+6 KD) signifikant reduziert werden siRNA cont vs. CerS5 KD: $0,78 \pm 0,064$ vs $0,43 \pm 0,084$ $p=0,042$ (Abbildung 5) (Reese et al., 2024).

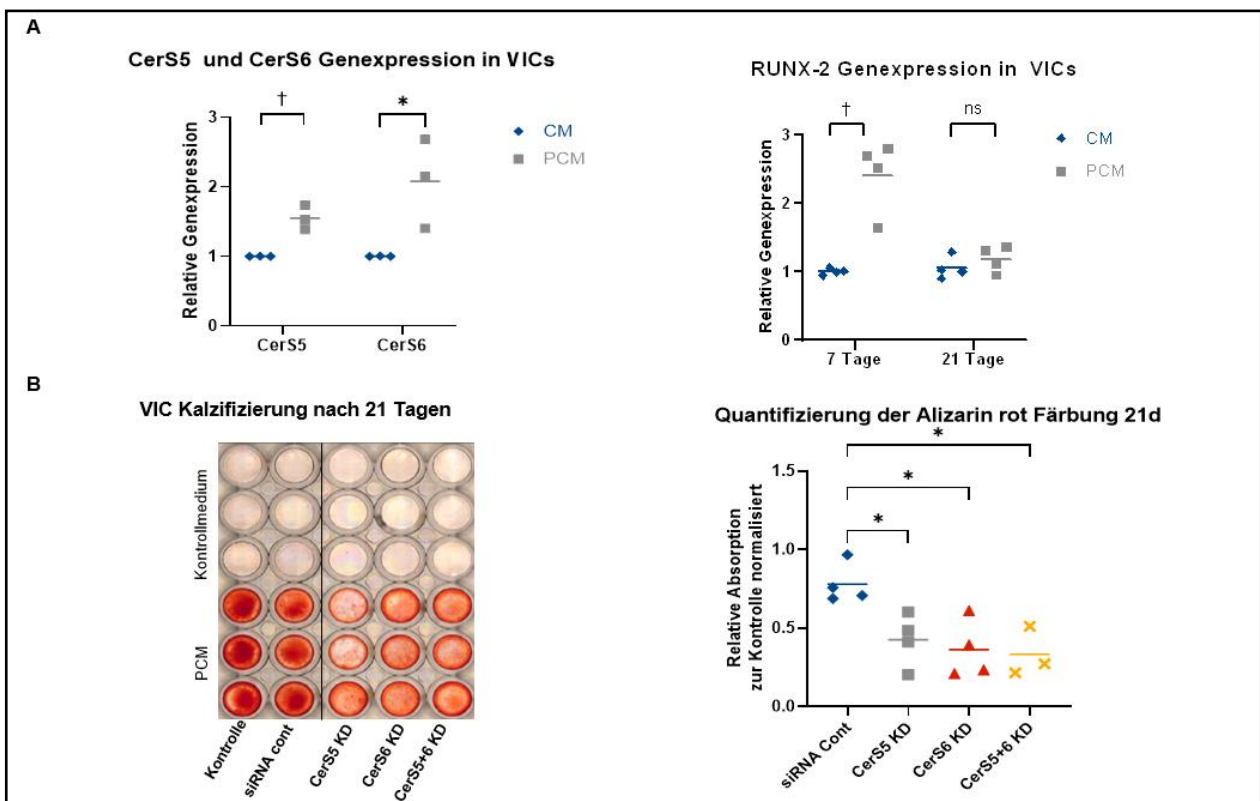


Abb. 5: A rtPCR Analyse von CerS5, CerS6 und Runx-2 nach Kontrollmedium (CM) und prokalzifizierendem Medium (PCM), relative Genexpression dargestellt als 2^{-ddCT} vs GAPDH $n=3$ bzw. 4. B Alizarin rot Färbung der VICs mit CerS5, CerS6, CerS5+CerS6 und Kontrollen nach PCM oder CM. Alle Ergebnisse sind als individuelles Experiment mit dem Mittelwert dargestellt, ns, nicht signifikant, $*p < 0.05$, $\dagger p < 0.01$, ungepaarter t-Test für A, ANOVA+ Tukey's Mehrfachvergleichtest für B. Modifiziert nach Reese *et al* (Reese *et al.*, 2024), Ceramidsynthese (CerS), Human aortic valvular interstitial cells (VICs), Knockdown (KD), Kontroll small interfering RNA (siRNA Cont).

Der CerS5 Knockdown reduziert die TNF- α und IL-1 β Sezernierung von THP-1-Zellen

Um den Einfluss von CerS5 auf die Aktivierung von Immunzellen zu untersuchen, wurden THP-1-Zellen 12 h mit 50 ng/ml LPS oder zunächst mit einer Lipidmischung und anschließend mit LPS stimuliert. Die Konzentration von TNF- α und IL-1 β wurde im Zellüberstand gemessen. Die Sezernierung von TNF- α und IL-1 β konnte durch einen CerS5 KD deutlich reduziert werden. Die Vorbehandlung mit LM zeigte einen protektiven Effekt und verringerte die Sezernierung dieser Zytokine IL-1 β : sicont LPS

vs CerS5 KD LPS: $2659 \pm 174,2$ pg/ml vs. $1431 \pm 82,40$ pg/ml $p < 0,0001$; TNF- α : sicont LPS vs CerS5 KD: $153,9 \pm 3,92$ pg/ml vs $94,79 \pm 0,55$ pg/ml $p < 0,0001$ (Abbildung 6) (Reese et al., 2024).

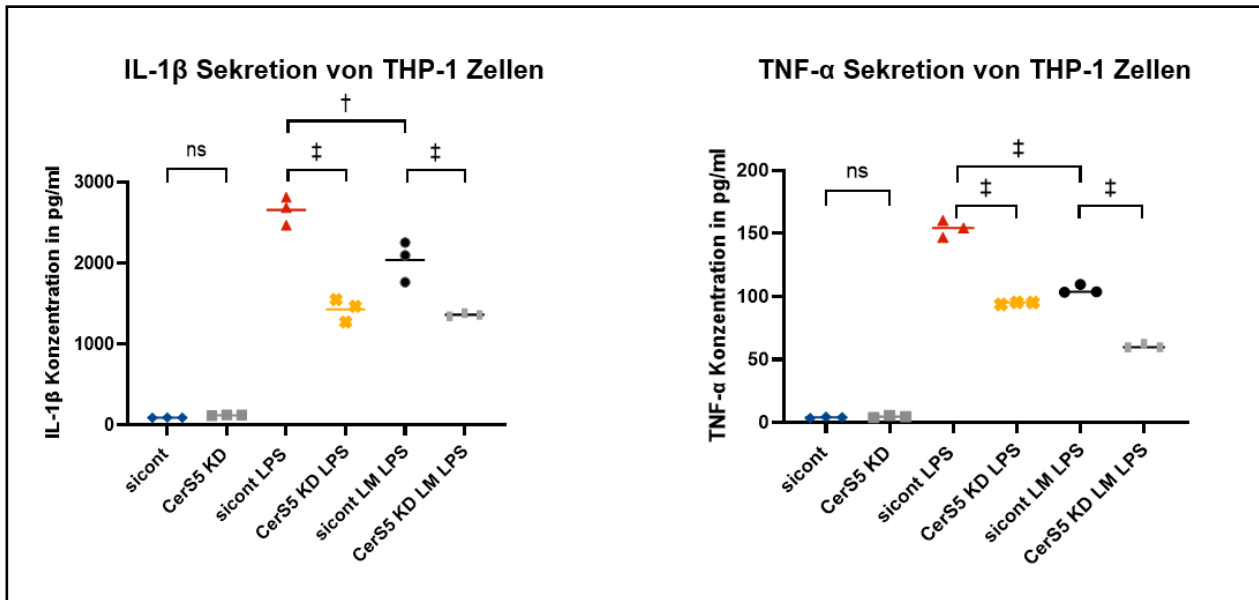


Abb. 6: Interleukin 1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Sekretion von THP-1-Zellen mit Ceramidsynthese 5 Knockdown (CerS5 KD) oder Kontrolle (sicont) nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) für 12 h oder Lipidmischung (LM) für 12 h und LPS. IL-1 β und TNF- α Konzentrationen wurden in THP-1 Zellüberständen mit einem ELISA bestimmt. Alle Daten sind als einzelnes Experiment mit dem Mittelwert dargestellt, ns: nicht signifikant, † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.001$, ANOVA+ Tukey's Mehrfachvergleichstest. Modifiziert nach Reese *et al* (Reese et al., 2024).

CerS5 Knockout in Kombination mit Westlicher Diät führt nicht zu einer Hochregulierung von CerS2 oder CerS6

Um zu untersuchen, ob ein CerS5 KO zu einer vermehrten Synthese von Ceramiden mit längerer Acylgruppe durch CerS2 oder zu vermehrter Produktion von C16 Ceramiden über CerS6 führt, isolierten wir RNA aus Aortengewebe der Versuchstiere. Hier konnte keine erhöhte Expression von CerS2 oder CerS6 festgestellt werden (Reese et al., 2024).

1.4 Diskussion

Diese Studie zeigt erstmals, dass Ceramide die Entwicklung der Aortenklappenstenose beeinflussen indem sie Regulatoren der endothelialen Inflammation und Kalzifikation *in vivo* und *in vitro* sind. Der Verlust der CerS5 Funktion reduziert bei Mäusen die Entwicklung einer AKS, wobei der Effekt abhängig von einer WD ist. *In vitro* verringerte ein CerS5 KD die Verkalkung von VICs und die TNF- α und IL-1 β Ausschüttung von THP-1-Zellen.

Ceramide regulieren Entzündungsreaktionen. (Al-Rashed et al., 2020; Gaggini et al., 2022; Schilling et al., 2013). Nach WD zeigen CerS5^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen eine geringere Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen im weißen Fettgewebe des Nebenhodens, in dem CerS5 besonders stark exprimiert ist (Gosejacob et al., 2016). Dazu passend wurde auch in unseren Versuchen eine geringere Immunzellinfiltration in den Aortenklappen von CerS5^{-/-} Mäusen mit WD im Vergleich zum WT beobachtet. Schilling *et al* zeigte, dass LPS nur in Kombination mit der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure, zu einer gesteigerten Ceramidsynthese in murinen Makrophagen führt und die Ausschüttung Zytokinen steigert (Schilling et al., 2013). Auch dieser Mechanismus könnte erklären, dass nur bei WD ein Verlust der CerS5 Aktivität die Entwicklung einer AKS verhindert.

Um den Einfluss von CerS5 auf Immunzellen zu untersuchen nutzten wir THP-1-Zellen. Diese sind ein etabliertes Modell für humane Monozyten, wobei ihre Immunantwort der von im Blut zirkulierenden Monozyten ähnelt (Bosshart und Heinzelmann, 2016; Chanput et al., 2014). In unseren Experimenten reduzierte ein CerS5 KD die Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β stark. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der Inhibition von anderen Enzymen der Ceramidsynthese beobachtet: Die Inhibition nSMase2 mit GW4869 oder der KD des codierenden Gens SMPD3 führen zu einer reduzierten Immunantwort von THP-1-Zellen und murinen Makrophagen (Al-Rashed et al., 2020). Die Zugabe einer Lipidmischung zu THP-1-Zellen mit CerS5 KD, um den Lipidüberschuss in unserem Tierversuch nachzubilden, verstärkt den antiinflammatorischen Effekt, und spiegelt damit die *in vivo* Befunde wider. Dieses Ergebnis könnte erklären, dass der CerS5 KO in

unseren Tierversuchen nur in Kombination mit fett- und cholesterinreicher Diät zu einer Reduktion der Entwicklung von AKS geführt hat (Reese et al., 2024).

Kalzifizierung ist ein entscheidender Mechanismus in der Entwicklung von AKS. In Studien von Song *et al* und Liao *et al* wurde bereits gezeigt, dass Ceramide die Verkalkung von humanen vaskulären glatten Muskelzellen regulieren (Liao et al., 2013; Song et al., 2017). Passend dazu zeigten unsere Experimente an VICs, dass ein CerS5 KD zu einer verringerten Verkalkung dieser Zellen führt. Im Tiermodell wiesen *Cers5^{-/-}* Mäusen mit WD im Vergleich zu WT Mäusen eine geringere Verkalkung der Aortenklappe auf.

In vivo konnte ein Verlust der CerS5 Aktivität die Entwicklung einer AKS nur in Kombination mit WD abschwächen. Eine fettreiche Diät führt zu einem Anstieg von C16-22 Ceramiden, vor dem *Cers5^{-/-}* Mäuse teilweise geschützt sind (Gosejacob et al., 2016). Bei normaler Diät bestehen keine Unterschiede der Serumceramide zwischen *Cers5^{-/-}* und WT (Gosejacob et al., 2016). Unsere Versuche zeigen, dass die Immunzellinfiltration der Aortenklappen bei *Cers5^{-/-}* Mäusen mit WD geringer ist als bei *Cers5^{-/-}* Mäusen mit normaler Diät (Reese et al., 2024).

Ceramide sind eng mit dem Fettstoffwechsel verknüpft und daher untersuchten wir, ob eine fettreiche Diät in Kombination mit einem CerS5 KO zu einer Produktion von protektiven Ceramiden mit längeren Acylgruppen durch die CerS2 führt. Es zeigte sich jedoch kein Anstieg der CerS2 Aktivität und eine Hochregulation von CerS2 kann diesen Effekt daher nicht erklären (Reese et al., 2024).

In unseren Experimenten zeigte sich kein Unterschied des Körpergewichts zwischen Mäusen mit WD und normaler Diät. Das kann durch die kurze Fütterungsdauer von nur sechs Wochen erklärt werden (Gosejacob et al., 2016).

Weitere Studien, die Ceramide in Zusammenhang mit Aortenklappenstenosen bringen werden gerade durchgeführt. Wir untersuchen neben der CerS5 auch den Einfluss der nSMase2, die für die Ceramidproduktion als Reaktion auf Entzündungsreize verantwortlich ist. Die Inhibition der nSMase2 ist mit einer verringerten Entwicklung von Atherosklerose bei Mäusen assoziiert (Lallemand et al., 2018). Der nSMase-Inhibitor

GW4869 reduziert im Drahtverletzungsmodell die Entwicklung der AKS bei Mäusen und bewirkt eine geringere Entzündungsreaktion von humanen aortalen valvulären Endothelzellen (Reese et al., 2022). Rawish *et al* zeigen, dass der Ceramidgehalt in verkalktem Aortenklappengewebe von Menschen erhöht ist. Hier zeigte sich insbesondere ein vermehrtes C16 Ceramid, welches unter anderem durch die nSMase2 und die CerS5 gebildet wird. Sie führen ähnliche Versuche zur Verkalkung von VICs durch und konnten hier eine verstärkte Verkalkung durch die Zugabe von Ceramiden messen (Rawish et al., 2023).

Der Aufbau der Aortenklappe unterscheidet sich zwischen Menschen und Mäusen. Die humane Aortenklappe besteht aus drei Schichten mit valvulären Endothelzellen außen und VICs innen, während die Aortenklappe von Mäusen nur wenige Zellen dick ist. Mäuse entwickeln natürlicherweise im Alter keine Verkalkung der Aortenklappe (Hinton et al., 2008). Die Drahtverletzung entspricht nicht dem natürlichen Prozess beim Menschen, welcher sich über viele Jahre erstreckt, jedoch kann sie die mechanische Belastung der Klappe imitieren und erfordert im Gegensatz zu anderen Modellen keine extreme Hypercholesterinämie (Sider et al., 2011). Außerdem spiegelt das Drahtverletzungsmodell die Hauptmechanismen der Entstehung der AKS wie Immunzellinfiltration und Verkalkung wider (Niepmann et al., 2019).

Um die Übertragbarkeit auf den Menschen zu überprüfen, haben wir neben den Tierversuchen auch Versuche an humanen Zellen durchgeführt. Um die Bedeutung von Ceramiden bei der Entstehung von AKS bei Menschen zu untersuchen sind Studien notwendig, die Ceramide in humanem Aortenklappengewebe untersuchen.

Bislang gibt es keine klinisch eingesetzte ceramidreduzierende Therapie. Das in Tierversuchen häufig eingesetzte Myriocin, welches das initiale Enzym der De-novo-Synthese von Ceramiden, die Serin-Palmitoyltransferase, inhibiert, wirkt toxisch auf den Darm (Choi et al., 2021). GW4869, ein Inhibitor der nSMasen, den wir ebenfalls für Experimente zur AKS eingesetzt haben, führt zu einer Störung des räumlichen Gedächtnisses bei Mäusen (Tabatadze et al., 2010). Zur Verwendung bei Menschen einsetzbar wären cholesterinsenkende Medikamente wie Statine, Fenofibrat und PCSK9-Inhibitoren, welche das Serumceramid um etwa 30 % reduzieren (Choi et al., 2021; Hilvo

et al., 2020b). Allerdings haben prospektive Studien keinen positiven Effekt dieser Medikamente auf die Entwicklung von AKS gezeigt (Chan et al., 2010; Evangelista et al., 2024). Auch Antidiabetika wie Metformin und Pioglitazon sowie eine Ernährungsumstellung können die Ceramidspiegel senken (Hilvo et al., 2020b; Mathews et al., 2017).

Zusammenfassend zeigt unsere Arbeit erstmals, dass Ceramide eine Rolle bei der Entwicklung der AKS bei Mäusen mit WD spielen, indem sie Inflammation und Kalzifikation beeinflussen. Die CerS5 kann als Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie der AKS dienen. Weitere Studien sind erforderlich, um die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zu bestätigen und potenzielle therapeutische Strategien zu entwickeln.

1.5 Zusammenfassung

Einleitung: Die Aortenklappenstenose ist die häufigste Herzklappenerkrankung beim Menschen. Bis heute ist die Pathophysiologie der Erkrankung nicht ausreichend verstanden und es ist keine medikamentöse Therapie verfügbar. Hauptmechanismen der Entstehung sind Inflammation und Kalzifikation. Ceramide regulieren diese beiden Faktoren und erhöhte Serumceramidwerte sind mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden. In unserer Studie untersuchen wir erstmals den Einfluss von Ceramiden bei der Entwicklung von Aortenklappenstenosen. Da die Ceramidsynthase 5 (CerS5) in früheren Studien mit Übergewicht und Insulinresistenz in Verbindung gebracht wurde und Übergewicht ein Risikofaktor der AKS ist, wurde der Einfluss einer fett- und cholesterinreichen Diät (Westliche Diät, WD) untersucht.

Methoden und Ergebnisse: Um die Entwicklung einer AKS in Mäusen zu stimulieren verwendeten wir ein Drahtverletzungsmodell, bei dem ein Draht über der Aortenklappe rotiert wird um eine Verletzung der Aortenklappe hervorzurufen. Unsere Experimente umfassten vier Gruppen: CerS5^{-/-} Mäuse und WT Mäuse jeweils mit normaler Diät oder WD. Die Entwicklung einer AKS wurde mittels Echokardiographie quantifiziert. Ein CerS5 Knockout (KO) konnte dabei nur in Kombination mit einer WD die Entwicklung einer AKS vermindern. Ohne WD hatte der CerS5 KO keinen Effekt. Damit einhergehend zeigte eine CD68 Färbung eine deutlich reduzierte Immunzellinfiltration und eine *von Kossa* Färbung

eine signifikant reduzierte Verkalkung der Aortenklappen der CerS5^{-/-} Mäuse mit WD im Vergleich zu WT Mäusen. In den Gruppen mit normaler Diät konnten diese Unterschiede nicht festgestellt werden. *In vitro* Versuche mit humanen aortalen valvulären interstitiellen Zellen (VICs) zeigten, dass CerS5 und CerS6 nach einer Behandlung mit prokalzifizierendem Medium (PCM) hochreguliert waren. Eine Alizarinrot-Färbung für Verkalkung zeigte, dass VICs mit CerS5- oder CerS6-KD unter PCM-Behandlung weniger verkalkten. In monozytenähnlichen THP-1-Zellen führte ein CerS5 KD zu einer deutlich geringeren Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β nach LPS-Stimulation.

Schlussfolgerung: Unsere Studie zeigt erstmals den Einfluss von Ceramiden auf die Entwicklung von Aortenklappenstenosen. Die Ausschaltung von Cers5 in Kombination mit einer WD verringerte die Entwicklung einer AKS, indem Inflammation und Verkalkung reduziert wurden. Ceramide sind damit ein Ansatzpunkt in der Entwicklung von medikamentösen Therapien und sollten auch im klinischen Bereich weiter untersucht werden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Airola MV ,Hannun YA. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol* 2013; 57-76

Al-Rashed F, Ahmad Z, Thomas R, Melhem M, Snider AJ, Obeid LM, Al-Mulla F, Hannun YA ,Ahmad R. Neutral sphingomyelinase 2 regulates inflammatory responses in monocytes/macrophages induced by TNF-alpha. *Sci Rep* 2020; 10: 16802

Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong SJ, Bauer-Rowe KE, Xifaras ME, Akkad A, Arias E, Pinello L, Katz Y, Shinagare S, Abu-Remaileh M, Mihaylova MM, Lamming DW, Dogum R, Guo G, Bell GW, Selig M, Nielsen GP, Gupta N, Ferrone CR, Deshpande V, Yuan GC, Orkin SH, Sabatini DM ,Yilmaz Ö H. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. *Nature* 2016; 531: 53-58

Bosshart H ,Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med* 2016; 4: 438

Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A ,Tam J. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation* 2010; 121: 306-314

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

Choi RH, Tatum SM, Symons JD, Summers SA ,Holland WL. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* 2021; 18: 701-711

Clarke CJ, Cloessner EA, Roddy PL ,Hannun YA. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor- α in MCF-7 cells. *Biochem J* 2011; 435: 381-390

Coté N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Pagé S, Trahan S, Boulanger MC, Fournier D, Pibarot P ,Mathieu P. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation* 2013; 36: 573-581

de Mello VD, Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, Lehto S, Seppänen-Laakso T, Oresic M, Pulkkinen L, Uusitupa M ,Erkkilä AT. Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease. *Diabetologia* 2009; 52: 2612-2615

Dharmarajan S, Speer MY, Pierce K, Lally J, Leaf EM, Lin M-E, Scatena M, Giachelli CM. Role of Runx2 in Calcific Aortic Valve Disease in Mouse Models. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2021; 8

Evangelista A, Galian-Gay L, Guala A, Teixido-Tura G, Calvo-Iglesias F, Sevilla T, Bermejo J, Méndez I, Sánchez V, Robledo Carmona JM, Alegret JM, Ferrer-Sistach E, Saura D, Ruiz-Muñoz A, Dux-Santoy L, Carmona M, Huguet M, Cuellar-Calabria H, Sao-Avilés A, Ferreira-González I, Rodríguez-Palomares JF. Atorvastatin Effect on Aortic Dilatation and Valvular Calcification Progression in Bicuspid Aortic Valve (BICATOR): A Randomized Clinical Trial. *Circulation* 2024; 149: 1938-1948

Gaggini M, Ndreu R, Michelucci E, Rocchiccioli S, Vassalle C. Ceramides as Mediators of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiometabolic Disease. *Int J Mol Sci* 2022; 23

Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Galadari A, Thayyullathil F. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids Health Dis* 2013; 12: 98

Galeone A, Paparella D, Colucci S, Grano M, Brunetti G. The role of TNF- α and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013: 875363

Généreux P, Sharma RP, Cubeddu RJ, Aaron L, Abdelfattah OM, Koulogiannis KP, Marcoff L, Naguib M, Kapadia SR, Makkar RR, Thourani VH, van Boxtel BS, Cohen DJ, Dobbles M, Barnhart GR, Kwon M, Pibarot P, Leon MB, Gillam LD. The Mortality Burden of Untreated Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2023; 82: 2101-2109

Getz GS, Reardon CA. Diet and Murine Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006; 26: 242-249

Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchrist D, Wang H, Chan C. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 21): 3209-3220

Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, Bönner F, Zimmer S, Nickenig G, Jansen F. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40: 885-900

Gosejacob D, Jager PS, Vom Dorp K, Frejno M, Carstensen AC, Kohnke M, Degen J, Dormann P, Hoch M. Ceramide Synthase 5 Is Essential to Maintain C16:0-Ceramide Pools and Contributes to the Development of Diet-induced Obesity. *J Biol Chem* 2016; 291: 6989-7003

Goto S, Rogers MA, Blaser MC, Higashi H, Lee LH, Schlotter F, Body SC, Aikawa M, Singh SA, Aikawa E. Standardization of Human Calcific Aortic Valve Disease in vitro Modeling Reveals Passage-Dependent Calcification. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6: 49

Hasegawa Y, Chen SY, Sheng L, Jena PK, Kalanetra KM, Mills DA, Wan YY, Slupsky CM. Long-term effects of western diet consumption in male and female mice. *Sci Rep* 2020; 10: 14686

Hernández-Corbacho MJ, Canals D, Adada MM, Liu M, Senkal CE, Yi JK, Mao C, Luberto C, Hannun YA, Obeid LM. Tumor Necrosis Factor- α (TNF α)-induced Ceramide Generation via Ceramide Synthases Regulates Loss of Focal Adhesion Kinase (FAK) and Programmed Cell Death. *J Biol Chem* 2015; 290: 25356-25373

Hilvo M, Meikle PJ, Pedersen ER, Tell GS, Dhar I, Brenner H, Schöttker B, Lääperi M, Kauhanen D, Koistinen KM, Jylhä A, Huynh K, Mellett NA, Tonkin AM, Sullivan DR, Simes J, Nestel P, Koenig W, Rothenbacher D, Nygård O, Laaksonen R. Development and validation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *Eur Heart J* 2020a; 41: 371-380

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

Hinton RB, Jr., Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, Yutzey KE. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H2480-2488

Hoffman M, Palioura D, Kyriazis ID, Cimini M, Badolia R, Rajan S, Gao E, Nikolaidis N, Schulze PC, Goldberg IJ, Kishore R, Yang VW, Bannister TD, Bialkowska AB, Selzman CH, Drakos SG, Drosatos K. Cardiomyocyte Krüppel-Like Factor 5 Promotes De Novo Ceramide Biosynthesis and Contributes to Eccentric Remodeling in Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation* 2021; 143: 1139-1156

Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, Knotts TA, Shui G, Clegg DJ, Wenk MR, Pagliassotti MJ, Scherer PE, Summers SA. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 1858-1870

Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, Otaki Y, Hasegawa H, Netsu S, Funayama A, Ishino M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T,

Miyashita T ,Kubota I. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 270-278

Jacquemyn X, Strom JB, Strange G, Playford D, Stewart S, Kutty S, Bhatt DL, Bleiziffer S, Grubb KJ, Pellikka PA, Clavel MA, Pibarot P, Mentias A, Serna- Gallegos D, Sá MP ,Sultan I. Moderate Aortic Valve Stenosis Is Associated With Increased Mortality Rate and Lifetime Loss: Systematic Review and Meta-Analysis of Reconstructed Time-to-Event Data of 409 680 Patients. *Journal of the American Heart Association* 2024; 13: e033872

Ji R, Akashi H, Drosatos K, Liao X, Jiang H, Kennel PJ, Brunjes DL, Castillero E, Zhang X, Deng LY, Homma S, George IJ, Takayama H, Naka Y, Goldberg IJ ,Schulze PC. Increased de novo ceramide synthesis and accumulation in failing myocardium. *JCI Insight* 2017; 2

Kitatani K, Idkowiak-Baldys J ,Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* 2008; 20: 1010-1018

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

Lallemant T, Rouahi M, Swiader A, Grazide MH, 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

Lancaster GI, Langley KG, Berglund NA, Kammoun HL, Reibe S, Estevez E, Weir J, Mellett NA, Pernes G, Conway JRW, Lee MKS, Timpson P, Murphy AJ, Masters SL, Gerondakis S, Bartonicek N, Kaczorowski DC, Dinger ME, Meikle PJ, Bond PJ ,Febbraio MA. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metab* 2018; 27: 1096-1110.e1095

Larsson SC, Bäck M, Rees JMB, Mason AM ,Burgess S. Body mass index and body composition in relation to 14 cardiovascular conditions in UK Biobank: a Mendelian randomization study. *European Heart Journal* 2019; 41: 221-226

Lerman DA, Prasad S ,Alotti N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Eur Cardiol* 2015; 10: 108-112

Levy M, Castillo SS, Goldkorn T. nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 900-905

Liao L, Zhou Q, Song Y, Wu W, Yu H, Wang S, Chen Y, Ye M, Lu L. Ceramide mediates Ox-LDL-induced human vascular smooth muscle cell calcification via p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *PLoS One* 2013; 8: e82379

Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Jung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16006

Mandal N, Gramberg R, Mondal K, Basu SK, Tahia F, Dagogo-Jack S. Role of ceramides in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *J Diabetes Complications* 2021; 35: 107734

Martinsson A, Li X, Andersson C, Nilsson J, Smith JG, Sundquist K. Temporal trends in the incidence and prognosis of aortic stenosis: a nationwide study of the Swedish population. *Circulation* 2015; 131: 988-994

Mathews AT, Famodu OA, Olfert MD, Murray PJ, Cuff CF, Downes MT, Haughey NJ, Colby SE, Chantler PD, Olfert IM, McFadden JW. Efficacy of nutritional interventions to lower circulating ceramides in young adults: FRUVEDomic pilot study. *Physiol Rep* 2017; 5

Meyer SG, de Groot H. Cycloserine and threo-dihydrosphingosine inhibit TNF- α -induced cytotoxicity: evidence for the importance of de novo ceramide synthesis in TNF- α signaling. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1643: 1-4

Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 396-403

Mohler ER, 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001; 103: 1522-1528

Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, Adam M, Nordsiek J, Gyamfi-Poku I, Piayda K, Sinning JM, Baldus S, Kelm M, Nickenig G, Zimmer S, Quast C. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. *Clin Res Cardiol* 2019; 108: 847-856

Rawish E, Rusack T, Inderhees M, Schneider M, Stiermaier T, Eitel I, Schmidt T, Frerker C. Ceramides accumulate in aortic valve tissue of calcific aortic valve disease patients and accelerate valve calcification via NLRP3 inflammasome activation. Congress Abstract DGK Herztage 2023. *Clinical Research in Cardiology* 2023; 112: 1713-1713

Reese L, Niepmann ST, Bulic M, Düsing P, Hosen MR, Nickenig G, Zimmer S, Jansen F, Zietzer A. Inhibition of neutral sphingomyelinase 2 by GW4869 reduces the development of aortic valve stenosis in mice. 88. Congress Abstract Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. *Clinical Research in Cardiology* 2022; 111: 592-592

Reese L, Niepmann ST, Düsing P, Hänschke L, Beiert T, Zimmer S, Nickenig G, Bauer R, Jansen F, Zietzer A. Loss of ceramide synthase 5 inhibits the development of experimentally induced aortic valve stenosis. *Acta Physiol (Oxf)* 2024; 240: e14140

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

Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* 2011; 2011: 364310

Sofi MH, Heinrichs J, Dany M, Nguyen H, Dai M, Bastian D, Schutt S, Wu Y, Daenthanasanmak A, Gencer S, Zivkovic A, Szulc Z, Stark H, Liu C, Chang YJ, Ogretmen B, Yu XZ. Ceramide synthesis regulates T cell activity and GVHD development. *JCI Insight* 2017; 2

Song Y, Hou M, Li Z, Luo C, Ou JS, Yu H, Yan J, Lu L. TLR4/NF- κ B/Ceramide signaling contributes to Ox-LDL-induced calcification of human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2017; 794: 45-51

Sverdlov AL, Ngo DT, Chapman MJ, Ali OA, Chirkov YY, Horowitz JD. Pathogenesis of aortic stenosis: not just a matter of wear and tear. *Am J Cardiovasc Dis* 2011; 1: 185-199

Tabatadze N, Savonenko A, Song H, Bandaru VV, Chu M, Haughey NJ. Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2940-2951

Vasile VC, Meeusen JW, Medina Inojosa JR, Donato LJ, Scott CG, Hyun MS, Vinciguerra M, Rodeheffer RR, Lopez-Jimenez F, Jaffe AS. Ceramide Scores Predict Cardiovascular Risk in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41: 1558-1569

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

Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, Alahdab F, Alashi A, Alipour V, Arabloo J, Azari S, Barthelemy CM, Benziger CP, Berman AE, Bijani A, Carrero JJ, Carvalho F, Daryani A, Durães AR, Esteghamati A, Farid TA, Farzadfar F, Fernandes E, Filip I, Gad MM, Hamidi S, Hay SI, Ilesanmi OS, Naghibi Irvani SS, Jürisson M, Kasaeian A, Kengne AP, Khan AR, Kisa A, Kisa S, Kolte D, Manafi N, Manafi A, Mensah GA, Mirrakhimov EM, Mohammad Y, Mokdad AH, Negoi RI, Thi Nguyen HL, Nguyen TH, Nixon MR, Otto CM, Patel S, Pilgrim T, Radfar A, Rawaf DL, Rawaf S, Rawasia WF, Rezapour A, Roeber L, Saad AM, Saadatagah S, Senthilkumaran S, Sliwa K, Tesfay BE, Tran BX, Ullah I, Vaduganathan M, Vasankari TJ, Wolfe CDA, Yonemoto N, Roth GA. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation* 2020; 141: 1670-1680

Yan AT, Koh M, Chan KK, Guo H, Alter DA, Austin PC, Tu JV, Wijeyesundera HC, Ko DT. Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study. *Journal of the American College of Cardiology* 2017; 69: 1523-1532

Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E211-224

Zaytouni T, Tsai PY, Hitchcock DS, DuBois CD, Freinkman E, Lin L, Morales-Oyarvide V, Lenehan PJ, Wolpin BM, Mino-Kenudson M, Torres EM, Stylopoulos N, Clish CB, Kalaany NY. Critical role for arginase 2 in obesity-associated pancreatic cancer. *Nat Commun* 2017; 8: 242

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Reese L, Niepmann ST, Düsing P, Hänschke L, Beiert T, Zimmer S, Nickenig G, Bauer R, Jansen F, Zietzer A. Loss of ceramide synthase 5 inhibits the development of experimentally induced aortic valve stenosis. *Acta Physiol (Oxf)* 2024; 240: e14140

<https://doi.org/10.1111/apha.14140>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Kardiologie unter Betreuung von PD Dr. Andreas Zietzer durchgeführt.

Die Planung der Tierversuche erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Andreas Zietzer und PD Dr. Felix Jansen. Die Koordination der Tierversuche erfolgte durch Dr. Sandra Adler. Die Konzeption der Zellversuche erfolgte durch mich.

Sämtliche Zellkulturversuche wurden von mir selbstständig durchgeführt. Dazu gehören die Etablierung und Durchführung der Stimulationsprotokolle, die RNA-Isolierung, sowie die Durchführung der qPCR, ELISA, der MTT-Assays und der *in vitro* Kalzifizierungsversuche.

Im Rahmen der Tierversuche war ich am Sacrifice beteiligt und übernahm hier insbesondere die Präparation und Einbettung der Aortenklappen für die histologische Analyse. Ich führte sämtliche Schritte der histologischen Analyse selbstständig durch. Die Tierversuche erfolgen mit Unterstützung der technischen Assistentinnen des Labors. Ich danke hier insbesondere Gloria Martinac, Henning Panatzek und Pia Fuchs.

Die Auswertung der Echokardiographie, der qPCR, der ELISA, der histologischen Schnitte und der *in vitro* Kalzifizierungsversuche erfolgte durch mich. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls durch mich. Ich erstellte die Graphen und Abbildungen der Publikation eigenständig.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte im regelmäßigen Austausch mit PD Dr. Andreas Zietzer. Ich erstellte das Manuskript, beantwortete die Kommentare der Reviewer während des Revisionsprozesses und überarbeitete das Manuskript entsprechend.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Andreas Zietzer für die Überlassung des Themas, seine ständige Unterstützung, sowie seine wertvollen Anregungen und kritischen Analysen danken. Ich konnte dadurch sehr viel lernen.

Bedanken möchte ich mich auch bei unserer Laborleitung Dr. Sandra Adler, die uns bei der Planung und Durchführung der Tierversuche unterstützt hat. Mein Dank gilt ebenfalls den technischen Assistentinnen und Assistenten Paula Levermann, Anna Flender, Pia Fuchs, Henning Panatzek und Gloria Martinac für ihre Unterstützung bei den Tierversuchen und der Einarbeitung in verschiedene Labortechniken.

Ich danke auch den Koautoren des Papers für ihre wertvollen Vorschläge. Besonders möchte ich Reinhard Bauer für die Bereitstellung der Versuchstiere danken. Ein Dankeschön geht auch an den Sonderforschungsbereich TRR 259-Aortic Disease für die finanzielle Förderung des Freisemesters und die Unterstützung bei der Teilnahme an Kongressen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freundinnen danken. Ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Ermutigung haben mir geholfen diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

5. Lebenslauf

Publikationen

- 2024 Loss of ceramide synthase 5 inhibits the development of experimentally induced aortic valve stenosis (Reese et al, Acta Physiologica)
- 2025 The role of uremic toxin indoxyl sulfate in the pathophysiology of aortic valve stenosis (Düsing et al, Cardiovascular Research)
- 2022 Ceramide Metabolism in Cardiovascular Disease: A Network With High Therapeutic Potential (Zietzer et al, ATVB)

Postervorträge

- 2021 und 2023 Inhibition of neutral sphingomyelinase 2 by GW4869 reduces the development of aortic valve stenosis in mice (2021 DGK Jahrestagung, 2023 Young DGK Basic Science Meeting)
- 2022 Loss of ceramide synthase 5 reduces the development of aortic valve stenosis in mice on high fat/ high cholesterol diet (European Society of Cardiology Congress)