

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an
Koronararterien des Menschen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Schlangen

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Siegel
 2. Prof. Dr. med. W. Haferkamp
 3. Prof. Dr. med. H. W. Hofer

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Flussabhängige Dilatation von Koronararterien	7
1.1.1 Entdeckung des Phänomens der flussabhängigen Dilatation.....	8
1.1.2 Zyklische Nukleotide als sekundäre Botenstoffe.....	10
1.1.3 Kreuzaktivierung der cA-PK und cG-PK	11
1.1.4 Matrixvermittelte flussabhängige Vasodilatation	12
1.2 Lipoproteine	12
1.2.1 Very Low Density Lipoproteins.....	13
1.2.2 Apolipoprotein E.....	14
1.3 Assoziation von Apo E4 mit neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen.....	16
1.3.1 Apo E4 und Alzheimer-Demenz.....	16
1.3.2 Apo E4 und kardiovaskuläre Erkrankungen	18
1.4 Zusammenhänge und Herleitung einer Aufgabenstellung.....	20
1.5 Ziel der Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Präparation der Koronararterien.....	22
2.1.1 Entnahme der Koronararterien.....	22
2.1.2 Aufbereitung der Koronararterie und Äquilibrierung.....	22
2.2 Lösungen und Substanzen	22
2.2.1 Krebslösung	22
2.2.2 Lipidlösungen.....	23
2.2.3 Apolipoprotein E-Genotypisierung.....	23
2.3 Registrierung der Kraftentwicklung.....	23
2.3.1 Messung der Flussrate.....	23
2.3.2 Einspannen des Präparates in die Messkammer.....	24
2.3.3 Registrierung des Gefäßtonus	24
2.3.4 Versuchsdurchführung	24
2.3.5 Korrektur der stress-relaxation.....	24
2.4 Intrazelluläre Membranpotentialableitung	25
2.4.1 Mikroelektroden, Messverstärker und Datenaufnahme	25
2.4.2 Einstiche.....	25
2.4.3 Versuchsdurchführung	26
2.5 Bestimmung der Konzentration von cAMP und cGMP.....	26
2.5.1 Gewebsaufschluss	26
2.5.2 Bestimmung der Konzentration von cAMP.....	26
2.5.3 Bestimmung der Konzentration von cGMP	27
2.5.4 Auswertung	28
2.6 Auswertung und Statistik	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Kraft- und Potentialentwicklung	29
3.1.1 Kontrollen	29
3.1.2 Gepooltes VLDL.....	32
3.1.3 Homozygotes Apo E4/E4-VLDL.....	35
3.1.4 Flussabhängige Dilatation in Anhängigkeit von verschiedenen VLDL- Isoformen	38

Inhaltsverzeichnis

3.2	Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide.....	40
3.2.1	Kontrollen	40
3.2.2	Gepooltes VLDL.....	42
3.2.3	Homozygotes Apo E4/E4-VLDL.....	44
3.2.4	Konzentrationsänderung von cAMP und cGMP in Abhängigkeit von verschiedenen VLDL-Isoformen.....	47
3.3	Darstellung des Gesamtmodells	50
3.3.1	Flussabhängige Dilatation in Abhängigkeit von verschiedenen VLDL- Isoformen	50
3.3.2	Korrelation der Konzentration zyklischer Nukleotide mit Tonusänderungen der glatten Gefäßmuskulatur.....	52
3.3.3	Stationäre Aktivierungskurve	54
4.	Diskussion	56
4.1	Wirkung von VLDL auf die flussabhängige Dilatation.....	56
4.1.1	Auswirkung auf die Tonusentwicklung	56
4.1.2	Auswirkung auf die Freisetzung von sekundären Botenstoffen	58
4.2	Wirkung von Apo E4 auf die flussabhängige Dilatation	61
4.2.1	Apo E4 und vaskuläre Pathologie	62
4.2.2	Apo E4 und NO-Produktion	63
5.	Zusammenfassung	66
	Literaturverzeichnis.....	68
	Lebenslauf	78
	Danksagung.....	79
	Erklärung.....	80

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AD	Alzheimer-Demenz
Apo E	Apolipoprotein E
Apo E4/E4	homozygotes Apolipoprotein E4
ATP	Adenosintriphosphat
Ca-CAM	Ca ²⁺ /Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin 3', 5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin 3', 5'-monophosphat
cA-PK	cAMP-dependent-protein-kinase
cG-PK	cGMP-dependent-protein-kinase
EDD	endothelium dependent dilation
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	lösliche NO-Synthase
FDD	flow dependent dilation
G _α	Adenylylcyclase aktivierendes G-Protein
G _β	Phospholipase C aktivierendes G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	high density lipoprotein
HS-PG	Heparansulfat-Proteoglykan
H ₂ O	Wasser
IDL	intermediate density lipoprotein
iNOS	inducible NO-Synthase
IP ₃	1,4,5-Inositoltrisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
L-NMMA	N-monomethyl-L-Arginin

Abkürzungsverzeichnis

LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL receptor related protein
M	Myosin
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
NSB	nicht spezifische Bindung
PGI ₂	Prostacyclin
PLC	Phospholipase C
RLC	myosin regulatory light chain
SEM	standard error mean
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TG	Triacylglycerin
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
VLDL	very low density lipoprotein
VLDL-R	VLDL-Rezeptor

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Alzheimer-Demenz (AD) zu einer der häufigsten chronischen Erkrankungen in Industrieländern entwickelt. Allein in den USA werden im Jahr 2050 schätzungsweise 13 Millionen Menschen an AD erkrankt sein [37]. Zirka einer von 8 Männern und fast eine von 4 Frauen werden im Laufe ihres Lebens eine AD entwickeln. Ein besseres Verständnis der Ätiologie und vor allem der Prävention dieser Erkrankung ist für das öffentliche Gesundheitswesen entscheidend.

Apolipoprotein E4 (Apo E4) ist der wichtigste bekannte Risikofaktor für die Entstehung einer Alzheimer-Demenz. Auch in der Atherosklerosegenese spielt Apo E4 eine entscheidende Rolle, wichtig vor allem im Hinblick auf Atherosklerose als pathologisches Korrelat der koronaren Herzerkrankung (KHK). In der Literatur sammeln sich die Hinweise für eine Assoziation zwischen kardiovaskulären Erkrankungen, ihren Risikofaktoren und einem erhöhtem Risiko für AD und dessen Vorläufer, dem geistigen Abbau [105]. Aus der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamts geht hervor, dass fast 50% der Todesfälle auf Erkrankungen des Kreislaufsystems, vor allem die Atherosklerose, zurückzuführen sind. Die Manifestation der Atherosklerose in hirnversorgenden Gefäßen, Herzkranz- und Extremitätenarterien stellt somit ein epidemiologisches und gesundheitspolitisches Kernproblem dar [1].

In den letzten Jahren kam es zu einem bedeutenden Erkenntniszuwachs über die komplexe Pathogenese atherosklerotischer Gefäßerkrankungen. Ein wichtiger Bereich der Atheroskleroseforschung ist die Aufklärung von Veränderungen der flussabhängigen Dilatation von Arterien. Diese Arbeit soll einen Beitrag zu Klärung des Effekts von Apo E4 auf die flussabhängige Dilatation leisten. Im Folgenden werden die für die vorgelegte Arbeit relevanten Erkenntnisse über die flussabhängige Dilatation von Arterien, den Aufbau von Lipoproteinen und die Funktionen des Apolipoprotein E erläutert.

1.1 Flussabhängige Dilatation von Koronararterien

Eine wichtige Funktion des arteriellen Gefäßsystems ist die ständige Regulierung der Gefäßweite, um das Sauerstoffangebot optimal an den Bedarf des Gewebes anzupassen. Grundsätzlich wird der Gefäßtonus, die aktive Spannung der glatten Gefäßmuskulatur, durch systemische Faktoren und die Autoregulation des Gefäßes moduliert. Die Autoregulation wird durch zwei entgegengesetzte Mechanismen geregelt, den Bayliss-Effekt (Vasokonstriktion) und die flussabhängige

ge Dilatation. Dem dilatierenden Moment der Gefäßregulation kommt dabei sowohl in physiologischen als auch pathologischen Reaktionsmustern die größere Bedeutung zu [80].

1.1.1 Entdeckung des Phänomens der flussabhängigen Dilatation

Arterien und Arteriolen dilatieren unter zunehmender Flussrate. Dieses Phänomen konnte schon 1932 von Schretzenmayr an der Femoralarterie des Menschen nachgewiesen werden [94]. Es dauerte jedoch noch Jahrzehnte bis der Mechanismus auch nur in Ansätzen verstanden wurde. So wurde erst 1975 die Annahme geäußert, dass das Endothel an der Grenzfläche zwischen Flussschehen und der Gefäßwand, in der Lage sei, Fluss zu „messen“ und so auf unterschiedliche Flusstärken des Blutes zu reagieren.

Am Gefäßendothel greifen dabei grundsätzlich zwei Kräfte an: einerseits pulsabhängiger Zug, eine entlang eines zur Fließrichtung des Blutes senkrechten Vektors auftreffende Kraft, die vom arteriellen Blutdruck abhängt, andererseits die parallel zur Fließrichtung auftretende Scherkraft (shear-stress). Letztere wird durch den viskoelastischen Zug des vorbeiströmenden Blutes auf die Gefäßwand erzeugt und ist proportional zur Viskosität und Menge des vorbeiströmenden Blutes.

Durch einen Zufall gelang Zawadski und Furchgott die Darstellung der endothelabhängigen Gefäßdilatation [30], ein Phänomen, welches sie durch Beobachtung von Reaktionen isolierter Gefäßstreifen auf Acetylcholin entdeckten. Anschließend Studien zeigten, dass die Relaxation durch eine Art endothelialen Mediator, den sie endothelium derived relaxing factor (EDRF) nannten, vermittelt wird. Der EDRF wird neben der Freisetzung durch shear-stress von einer Vielzahl an Substanzen freigesetzt (Noradrenalin, Angiotensin II, Serotonin, Histamin, Bradykinin). Nach Jahren intensiver Forschung konnte EDRF als NO identifiziert werden [43, 75].

Von Siegel et al. konnte gezeigt werden, dass Heparansulfat-Proteoglykane (HS-PG), ein im Körper ubiquitär vorkommendes viskoelastisches Makromolekül, als integraler Bestandteil der Membranen im Gefäßsystem, den Flussreiz in ein biochemisches Signal umwandelt. Das HS-PG konnte somit als shear-stress-Sensor identifiziert werden. Der Biosensor reagiert auf Flussreiz mit einer Konformationsänderung [99]. Dieser folgt ein verstärkter Na^+ -Einstrom in die Zelle, welche die Zelle depolarisiert und mit einem nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom einhergeht. Ca^{2+} bindet an Calmodulin und der Ca^{2+} /Calmodulin (Ca-CAM)-Komplex aktiviert die NO-Synthase (NOS). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS), ein membranständiges, konstitutiv exprimiertes Enzym spaltet aus der Guanidinogruppe von L-Arginin freies NO ab (Abb.1).

Einleitung

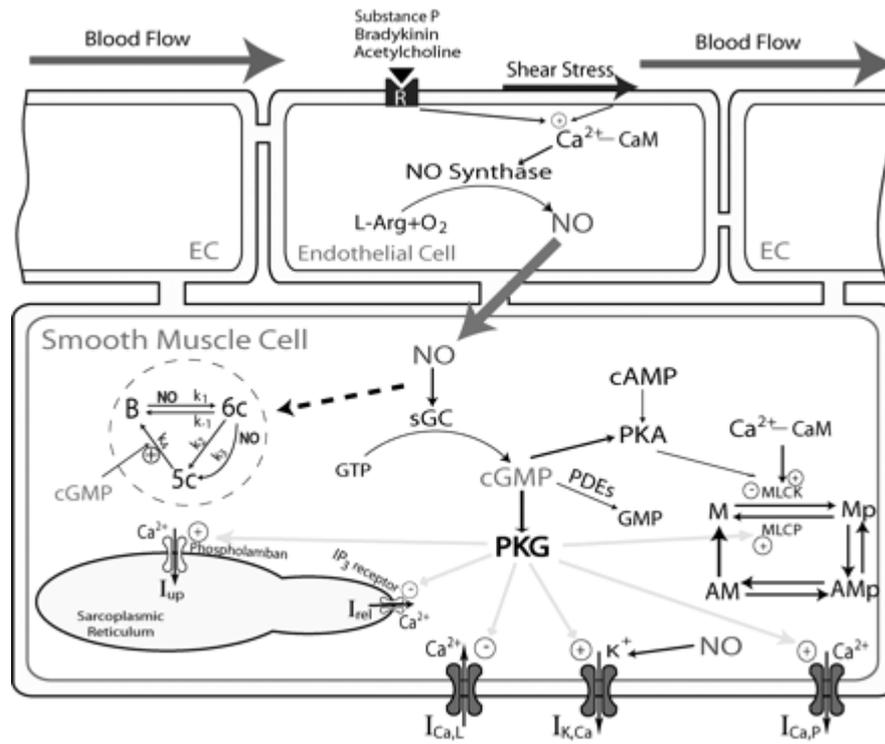


Abb. 1: Shear stress vermittelte Relaxation von glatter Gefäßmuskulatur durch 2nd Messenger [124]

Unter Einwirkung von shear-stress wird NO in zwei Phasen produziert: Bei Einsetzen des Flussreizes erfolgt ein initialer schneller Anstieg, dessen Höhe zunächst einmal unabhängig von der Größe der ansetzenden Scherkraft ist. Bei anhaltendem Fluss folgt dann eine zweite plateauförmige Produktionsphase, in der die Konzentration des produzierten NO direkt abhängig vom Ausmaß der Scherkraft ist. Es konnte gezeigt werden, dass der initiale Anstieg ein kalziumabhängiger Prozess ist, während die kontinuierliche basale NO-Freisetzung kalziumunabhängig ist [7].

Von den Endothelzellen diffundiert NO, ein hochdiffusibles Gas, in die darunter liegenden glatten Muskelzellen [97]. Noch bevor NO identifiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von ERDF zu einem Anstieg von zyklischem Guanosin-3', 5'-monophosphat (cGMP) in der glatten Gefäßmuskulatur führt [40, 42]. In den Myozyten bindet NO an zweiwertiges Eisen der hämhaltigen Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase, welche eine Konformationsänderung des benachbarten katalytischen Zentrums und damit scherkraftabhängig eine Steigerung der Konversionsrate $GTP \rightarrow cGMP$ auslöst [69].

Einleitung

Ein weiterer durch shear-stress freigesetzter Mediator ist das Prostacyclin (PGI_2) [28], welches sowohl im Endothel als auch in den Myozyten entsteht [41]. Im Gegensatz zu NO führt ein Anstieg von PGI_2 jedoch zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase, welche ATP in zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) wandelt. Beide Substanzen, cAMP und cGMP, wirken synergistisch und werden über einen Corelease aus den Endothelzellen freigesetzt [97].

1.1.2 Zyklische Nukleotide als sekundäre Botenstoffe

Die von der Adenylylcyclase bzw. Guanylylcyclase gebildeten zyklischen Nukleotide aktivieren cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinasen (cA-PK und cG-PK), welche über Phosphorylierung von

- Ca^{2+} -Kanälen (Deaktivierung)
- K_{ca} -Kanälen (Aktivierung) [2]
- plasmalemaler Ca^{2+} -ATPase (Stimulierung) [31]
- sarkolemmalen Ca^{2+} -Pumpe (Stimulierung)

eine Reduzierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervorrufen [16, 60, 116] (Abb. 1). Die Zelle hyperpolarisiert und konsekutiv dilatieren die glatten Muskelzellen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl cAMP als auch cGMP eine von der intrazellulären Calciumkonzentration unabhängige Relaxation auslösen können [73]. Die Aktivität der Myosin II ATPase der glatten Gefäßmuskelzelle, und somit die Kontraktion der Zelle, wird nur durch Aktin angeregt, wenn Myosin am Ser-19 an der myosin regulatory light chain (RLC) phosphoryliert ist. Das Ausmaß der RLC-Phosphorylierung wird vom Gleichgewicht der Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosinleichtkettenkinase (MLCK) und der Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) bestimmt [50]. Der Begriff Ca^{2+} -Sensitivierung bzw. Ca^{2+} -Desensitivierung beschreibt die Modulation der MLCK- und/oder MLCP-Aktivität durch verschiedene Signalwege. Zyklische Nukleotide tragen zur Ca^{2+} -Desensitivierung durch Dephosphorylierung der RLC über verschiedene Angriffspunkte bei. So konnte schon vor einiger Zeit gezeigt werden, dass cAMP die MLCK inhibiert. Die Ca-CAM-Aktivierung der MLCK wird durch die Phosphorylierung der site A dieses Enzyms von der cA-PK inhibiert [32]. Die MLCK-Aktivität kann jedoch nicht durch cGMP beeinflusst werden, da die cG-PK-abhängige Phosphorylierung der site B des Enzyms keinen Einfluss auf die Aktivität der MLCK zeigt [32]. Die von cGMP verursachte Ca^{2+} -Desensitivierung wird über die Beeinflussung der MLCP-Aktivität vermittelt. Zurzeit werden verschiedene Mechanismen, über den die cG-PK die MLCP aktiviert, diskutiert. Zum einen wird über eine Interaktion des Leucin-Zipper-Motifs der cG-PK

mit der Untereinheit MYPT1 der MLCP diese direkt aktiviert [109]. Der weitaus wichtigere Mechanismus scheint jedoch die Phosphorylierung der RhoA, welche die Bindung an Rho-Kinase verhindert, zu sein [49, 90]. Somit wird die Phosphorylierung entsprechend einer Inhibierung der MLCP unterbunden.

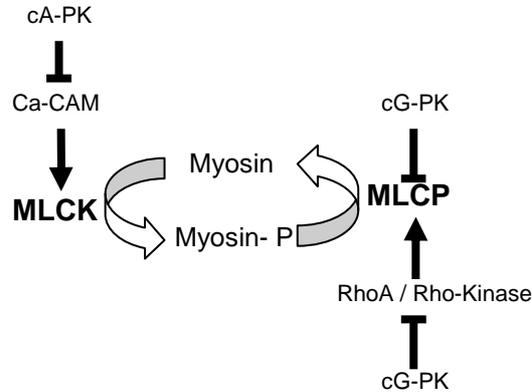


Abb. 2: Interaktion von MLCK und MLCP

1.1.3 Kreuzaktivierung der cA-PK und cG-PK

cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen sind homologe Proteine die sehr ähnliche dreidimensionale Strukturen aufweisen. Lange Zeit wurde angenommen, dass die zyklischen Nucleotide ausschließlich ihre eigene Proteinkinase aktivieren. Die cG-PK kann jedoch auch von cAMP aktiviert werden, dies erfordert allerdings eine fast 10-mal so hohe cAMP-Konzentration [55]. Auch umgekehrt ist eine Aktivierung der cA-PK durch cGMP möglich. In glatten Muskelzellen ist die cAMP-Konzentration normalerweise ca. 10-mal höher als die cGMP-Konzentration [32]. Folglich kann cAMP sowohl die cA-PK als auch die cG-PK aktivieren (siehe Abbildung 1). Diese Hypothese konnte von Thomas Lincoln in einer Studie belegt werden, in der cAMP die Ca^{2+} -Konzentration in glatten Muskelzellen mit fehlender cG-PK erst reduzierte, nachdem cG-PK hinzu gegeben wurde [60]. Wenig später konnte gezeigt werden, dass schon ein moderater Anstieg von cAMP die cG-PK aktiviert [47]. Heutzutage geht man davon aus, dass obwohl cGMP im glatten Muskel keine 10-fach höheren Konzentrationen als cAMP erreicht, eine Aktivierung der cA-PK möglich ist. Der erste Hinweis einer cGMP-abhängigen Kreuzaktivierung mit der Proteinkinase A wurde in der intakten Aorta der cG-PK^{-/-}-Maus gezeigt [92]. Hohe Konzentrationen an NO relaxieren den Hormon-induzierten Tonus der cG-PK^{-/-}-Aorta unabhängig von der cG-PK. An neuronalen Zellen konnte ein Anstieg von cAMP und cGMP mit einhergehender Vasodilatation als Reaktion auf Hyperkapnie registriert werden. Hier zeigte sich, dass der Anstieg beider zyklischer Nucleotide durch Zugabe von NOS-Inhibitoren und Prostacyclin-Synthese-Inhibitoren blockiert wurde [117]. Insgesamt lässt sich vermuten, dass die cG-PK und

cA-PK relativ spezifisch von dem jeweiligen zyklischen Nukleotid aktiviert werden, sowohl cAMP als auch cGMP aber in der Lage sind, durch Kreuzaktivierung die andere Proteinkinase zu aktivieren [48]. Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, wird der synergistische Effekt der zyklischen Nukleotide nicht nur über die Kreuzaktivierung der Proteinkinasen vermittelt. So kann cAMP zusätzlich den Efflux von cGMP aus der Endothelzelle drosseln [122].

1.1.4 Matrixvermittelte flussabhängige Vasodilatation

Das Ausmaß der flussabhängigen Dilatation von Koronararterien ist von der „shear responsiveness“ der Gefäßwand abhängig. Die Vasodilatation ist dabei immer der Nettoeffekt von myogener Antwort (Bayliss-Effekt), der Wirkung von vasoaktiven systemischen Metaboliten und ihren Antagonisten sowie der endothelabhängigen Reaktion auf die lokal vorliegende Scherkraft. 1988 wies Bevan erstmals die flussabhängige Dilatation einer pharmakologisch vorkontrahierten mittelgroßen Kaninchenarterie nach, die nach mechanischer Entfernung des Endothels in geringerem Ausmaß persistierte [11]. Der Autor machte für diese Restdilatation bindegewebige „stress fibers“ der Subintima verantwortlich, die nach Entfernung des Endothels der direkten Einwirkung der Scherkraft ausgesetzt waren. Auch Vequaud sah an der Rattenkoronararterie eine deutliche flussabhängige Vasodilatation nach Entfernung des Endothels [114]. In der Literatur wird auch oft ein Verschwinden dieses Effektes nach Entfernung des Endothels beschrieben [54, 81]. Zurzeit existiert keine eindeutige Erklärung für diesen Effekt. Wahrscheinlich ist, dass subendotheliale, membran- oder matrixgebundene Proteoglykane eine endothelunabhängige Dilatation vermitteln. Eine erste vergleichende Untersuchung des Beitrags von Endothel und Matrix zu Membranpotential und Tonusentwicklung in Abhängigkeit von systematisch variierten Flussraten wurde in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in Abhängigkeit von der Flussrate Endothel und subendotheliale Matrix zu unterschiedlichen Anteilen zum Membranpotential und der Tonusentwicklung der glatten Gefäßmuskulatur beitragen [67]. Bei physiologischen Flussraten zwischen 20 mL/min und 40 mL/min ist das endotheliale Kompartiment normaler humaner Koronararterien zu etwa 65% an der flussabhängigen Relaxation beteiligt, während bei Flussraten von 100 mL/min die flussabhängige Tonusabnahme zu 72% von der subendothelialen Matrix getragen wird.

1.2 Lipoproteine

Initialereignis der Entwicklung atherosklerotischer Plaques ist die subendotheliale Ablagerung cholesterolreicher Lipoproteine. Lipoproteine sind für den Transport endogener und exogener Lipide im menschlichen Organismus verantwortlich. Dabei handelt es sich um Mikroemulsio-

Einleitung

nen, die als zentrale sog. Core-Lipide apolare Cholesterinester, Triglyzeride und andere fettlösliche Stoffe (z.B. Vitamine) und als Hülle polare Phospholipide (Lecithin, Sphingomyelin), freies Cholesterin, Fettsäuren, Apolipoproteine und Kohlenhydrat-Ester enthalten [33]. Die Apolipoproteine besitzen als Proteinkomponente der Lipoproteine neben der Stabilisierung der Lipidkomplexe spezifische Funktionen in Lipidtransport, Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Schlüsselenzyme des Lipidstoffwechsels, Rezeptorinteraktion und Interaktion zwischen Lipoproteinen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften (Dichte, Löslichkeit, Ladung etc.) lassen sich die Lipoproteine in verschiedene Klassen einteilen. Mit Hilfe der Ultrazentrifuge können die Lipoproteine nach ihrer Dichte in fünf Hauptklassen aufgetrennt werden: Chylomikronen ($d < 1,000$ g/mL), Very Low Density Lipoproteins (VLDL, $d < 1,006$ g/mL), Intermediate Density Lipoproteins (IDL, $d < 1,019$ g/mL), Low Density Lipoproteins (LDL, $d < 1,063$ g/mL) und High Density Lipoproteins (HDL, $d < 1,120$ g/mL) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Lipoproteine, modifiziert nach Harrison „Principles of Internal Medicine“ [84]

	Dichte (g/mL)	Größe (nm)	Apolipoprotein
Chylomikronen	0,93	75-1200	B-48,A-I,A-IV, C-I,C-II,C-III,E
VLDL	0,93-1,006	30-80	B-100,A-I,A-II,A-V,C-I,C-II,C-III,E
IDL	1,006-1,019	25-35	B-100,C-I,C-II,C-III,E
LDL	1,019-1,063	18-25	B-100
HDL	1,050-1,120	5-12	A-I,A-II,A-IV,C-III,E

Lipoproteine entstehen in der Leber bzw. im Darm. Sie werden ins Blut abgegeben und auf diese Weise im Organismus verteilt. Es findet also ein Lipidtransport von der Leber zu den Verbrauchsorganen statt. Dort werden die Lipoproteine, abhängig von den enthaltenen Apolipoproteinen, die als Erkennungsmoleküle für Membranrezeptoren und Enzyme dienen, in die Zellen aufgenommen. Gespalten werden Lipoproteine durch die Lipoproteinlipase, die in Kapillarendothelien und Zellmembranen lokalisiert ist.

1.2.1 Very Low Density Lipoproteins

Lipoproteine sehr geringer Dichte werden von der Leber für den Transport von endogenen Triacylglycerinen (TG) und Cholesterin gebildet. Neben je einem Molekül Apo B100 enthalten die

dort gebildeten VLDL auch einen geringen Anteil an Apo E und Apo C. Im Verlauf nehmen die VLDL zusätzlich Apo E- und Apo C-Moleküle auf, die zum einen als Kofaktoren der Lipoproteinlipase (LPL) die Hydrolyse der Triglyzeride aktivieren bzw. inhibieren (Apo CII bzw. Apo CIII), zum anderen aber eine vorzeitige Entfernung aus der Zirkulation verhindern (Apo CI, Apo CIII). Durch schrittweise Hydrolyse der TG entstehen so genannte VLDL-Remnants, die reich an Cholesterinestern und Apo E sind. Diese VLDL-Remnants können entweder über den LDL-Rezeptor direkt in die Leber aufgenommen oder schrittweise über IDL in LDL umgewandelt werden. 1992 wurde von Takahashi ein weiterer Rezeptor entdeckt und aufgrund seiner Spezifität als VLDL-Rezeptor bezeichnet [112]. Hinsichtlich der Gewebeverteilung konnte die mRNA dieses Rezeptors in Herzmuskelzellen, Muskelzellen und Fettgewebszellen nachgewiesen werden, wohingegen in Dünndarm und Leber nur geringste Mengen detektierbar waren [74]. Ligandenspezifität und Gewebeverteilung legen nahe, dass der VLDL-Rezeptor seine Funktion hauptsächlich in der Speicherung und Gewinnung von Energie aus triglyzeridreichen Lipoproteinen in stoffwechselaktiven Geweben erfüllt [123]. Zusätzlich können Lipoproteine über zellmembranständigen Heparansulfat-Proteoglykane gebunden werden [62]. Mithilfe der Ellipsometrie konnten Siegel et al. die spezifische Bindung von Lipoproteinen an HS-PG, wahrscheinlich über positiv geladene Aminosäureabschnitte der Apolipoproteine, nachweisen [98].

1.2.2 Apolipoprotein E

Die Proteinbestandteile von Lipoproteinen werden als Apolipoproteine bezeichnet. Sie sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, deren Funktion die Solubilisierung der hydrophoben Lipide in wässrigem Milieu und die Aufrechterhaltung ihrer dreidimensionalen Struktur ist. Als Kofaktoren beeinflussen sie durch Aktivierung bzw. Inhibierung von lipolytischen Enzymen den Abbau der Lipoproteine. Durch die Bindung an membranständige Rezeptoren sind die Apolipoproteine zudem wesentlich an der Aufnahme und Sezernierung der Lipoproteine beteiligt. Die 15 bisher identifizierten Apolipoproteine lassen sich in 10 Klassen (A bis J) einteilen. So sind z.B. die Apolipoproteine B100 und E Liganden für spezifische Rezeptoren und vermitteln die Internalisierung der Lipoproteine und damit deren weitere Verstoffwechslung. Apo CII aktiviert die Lipoproteinlipase und die Apolipoproteine A-I, C-I und D sind Aktivatoren der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Diese Arbeit befasst sich vor allem mit Apolipoprotein E als ein Bestandteil der VLDL.

Apolipoprotein E wird zu 90% in der Leber synthetisiert, daneben aber auch in Monozyten, Macrophagen und Astrogliazellen im peripheren und zentralen Nervensystem. Das Protein be-

Einleitung

steht aus einer Sequenz von 299 Aminosäuren [85]. Auf dem Genlocus des Apo E sind drei Allele bekannt, ϵ_2 , ϵ_3 und ϵ_4 . Die Isoformen unterscheiden sich durch den Austausch von jeweils einer Aminosäure an den Positionen 112 und 158 (ϵ_2 : Cys112, Cys158; ϵ_3 : Cys112, Arg158; ϵ_4 : Arg112, Arg158) [5, 113]. Durch kodominante Vererbung existieren dadurch drei homozygote ($E_3/3$, $E_2/2$, $E_4/4$) und drei heterozygote Isoformen ($E_3/4$, $E_2/3$, $E_4/2$), die durch posttranslationale Modifikation mit Neuraminsäure zusätzlich verändert werden. Die Aminosäuresubstitutionen beeinflussen die dreidimensionale Struktur und die Bindungseigenschaften der Isoformen. Apo E2 reagiert aufgrund des Cysteins saurer als Apo E3 und besitzt nur etwa 2% von dessen Rezeptorbindungsvermögen [119]. Unter bestimmten Umweltbedingungen entwickeln besonders homozygote Träger des ϵ_2 -Allels eine Typ III-Hyperlipidämie mit massiv erhöhten, atherogenen VLDL-Cholesterolverwerten. Apo E4 trägt an beiden eben erwähnten Positionen Arginin, zeigt demzufolge die stärkste alkalische Reaktion und besitzt dadurch eine höhere Rezeptoraffinität als Apo E3. Dies führt zu einem effektiveren Metabolismus der Apo E4-haltigen Lipoproteine mit einem verbesserten intrazellulären Cholesterolangebot. Aufgrund der konsekutiven „*Downregulation*“ von LDL-Rezeptoren kann ein pathologisches Lipidprofil entstehen. Die in diesem Zusammenhang erhöhten Werte für LDL-Cholesterol, Triglyzeride und Apo B machen das für Apo E4 kodierende ϵ_4 -Allel zu einem Kandidatengen für atherosklerotische Gefäßveränderungen [103].

Apo E3 ist die Isoform, die in der Bevölkerung am häufigsten vorkommt. Deshalb bezeichnet man Apo E3 als Wildtyp und betrachtet Apo E2 und E4 als Varianten. Auch Apo E4 ist weit verbreitet. Ungefähr 30% der Bevölkerung tragen mindestens ein E4-Allel. Am seltensten wird Apo E2 vererbt. Die Häufigkeiten der Allele zeigen signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen. Innerhalb europäischer Populationen und der weißen Bevölkerung Nordamerikas stimmen die Häufigkeiten in der Verteilung der Isoformen weitgehend überein. Die Häufigkeit des E4-Allels nimmt von Nord- nach Südeuropa ab. E3/E3 ist unter kaukasischen Bevölkerungsgruppen in ca. 54% vertreten. Die relativen Allelfrequenzen für Männer und Frauen sind ungefähr gleich [101].

Apo E ist Ligand vieler Lipoprotein-Rezeptoren (z. B. LDL-R, LRP, VLDL-R, HS-PG). Dabei bindet Apo E mit einer 25fach höheren Affinität als Apo B100 an den LDL-Rezeptor und vermittelt so den Abbau triglyceridreicher Partikel (VLDL, Chylomikronen) [45]. Durch direkte Inhibition sowie durch Verdrängung und Maskierung von Apo CII, dem Kofaktor der LPL, beeinflusst Apo E die Lipolyse triglyceridreicher Lipoproteine [41]. Neben der Bindung an den

LDL-Rezeptor gibt es einen zweiten Rezeptor über den vor allem die VLDL-Remnants in die Hepatozyten aufgenommen werden. Dieser wurde von Herz et al. als LDL receptor related protein (LRP) beschrieben und bindet neben Apo E eine Vielzahl anderer Liganden [38]. Apo E-haltige Lipoproteine können über den HS-PG-Rezeptor, über eine Interaktion mit der lipid binding region, direkt in die Endothelzellen aufgenommen werden [98]. Auch scheint Apo E die hepatische VLDL- und TG-Produktion direkt zu stimulieren [63] und den Zusammenbau und/oder die Sekretion Apo B100-haltiger Lipoproteine zu beeinflussen [25]. An HDL gebunden ist Apo E zudem an der Mobilisierung von freiem Cholesterin aus nicht-hepatischen Zellen, z. B. Makrophagen, und an der Aufnahme von HDL in die Leber beteiligt (reverser Cholesterintransport). Zusätzlich werden Apo E Funktionen außerhalb des Lipoproteinstoffwechsels zugeschrieben: Modulation der zellulären Immunantwort, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Regulation der Steroidhormonsynthese. Eine weitere Rolle kommt Apo E im zentralen und peripheren Nervensystem durch Beeinflussung von Wachstum und Differenzierung von Neuronen zu. Die Bedeutung des Apolipoprotein E geht damit weit über seine zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel hinaus.

1.3 Assoziation von Apo E4 mit neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen

Apolipoprotein E ist in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen und der Alzheimer-Demenz zugeschrieben worden. Es sind verschiedene Hypothesen über den Beitrag der drei Apo E-Allele, insbesondere des Apo E4, zur Pathogenese dieser Erkrankungen erstellt worden. Zudem konnte eine deutliche Assoziation zwischen dem Auftreten von KHK und Alzheimer-Demenz gefunden werden [105].

1.3.1 Apo E4 und Alzheimer-Demenz

Seit Mitte der 80iger Jahre sammeln sich die Hinweise einer bedeutenden Rolle von Apo E in der Entwicklung von neurologischen Erkrankungen. Apo E wird nicht nur in Gehirnzellen produziert, sondern ist auch eines der wichtigsten Apoproteine im Liquor. Außerdem werden alle bekannten Apo E-bindenden Rezeptoren im Gehirn exprimiert [78]. Auch in peripheren Nerven fand man nach Verletzung eine hohe Apo E-Konzentration. Somit scheint Apo E eine wichtige Rolle bei der Verteilung von Lipiden in regenerierenden Axonen und Schwann'Zellen bei Remyelinisierungsprozessen nach Nervenverletzung zu spielen [44].

Einleitung

Über einen Zusammenhang des fakultativen molekulargenetischen Risikofaktors Apo E4 mit der Alzheimer-Demenz berichteten 1993 erstmals Strittmatter et al. [108]. Seither bestätigten unzählige Studien die Assoziation der Alzheimer-Demenz mit dem Apo E4-Allel auf Chromosom 19 [87]. Insgesamt liegt das Lebenszeitrisiko der Entwicklung einer AD einer 65-jährigen Person bei 12 - 15%. Apo E4-heterozygote Individuen haben ein schätzungsweise zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko für eine Alzheimer-Demenz und homozygote Individuen sogar ein achtfach erhöhtes Risiko [96]. Weiterhin geht man davon aus, dass Apo E4 zu einem früheren Beginn einer Alzheimer-Demenz führt [12]. So zeigen Patienten, die homozygot für E4 sind, im Durchschnitt 15 Jahre früher Symptome der Krankheit als Menschen mit einem E2- oder E3-Allel [66]. Das Apo E2-Allel scheint, gegenüber dem Apo E3-Allel, sogar eine schützendere Funktion einzunehmen [19]. Ungefähr 50% der klinisch identifizierten Alzheimerpatienten im Alter zwischen 65 und 75 Jahren tragen mindestens eine Kopie des E4-Allels. In dieser Altersgruppe ist die Assoziation von Apo E4 mit der Alzheimer-Demenz am stärksten ausgeprägt [29]. Demnach ist Apo E4 ein sehr wichtiger Faktor für die genetische Bereitschaft, eine Alzheimer-Demenz zu entwickeln.

Die Mechanismen, über die Apo E an der Entstehung einer Alzheimer- Demenz beteiligt ist, sind noch nicht vollständig bekannt. Es existieren jedoch verschiedene Hypothesen zu dieser Assoziation. So ist Apo E das einzige bekannte Molekül, das mit allen für die Alzheimer-Demenz charakteristischen biochemischen Veränderungen verknüpft ist [17]:

- β -Amyloidablagerung
- Neurofibrillenbündel
- Oxidativer Stress
- Neurodegeneration
- Dysfunktion der Lipide
- Synapsenverlust
- Cholinerge Dysfunktion

Eine der wichtigsten Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten ist die Amyloidose der Gefäßwände der Hirngefäße, welche durch massive Ablagerungen von β -Amyloid gekennzeichnet ist. Dabei steigt die Dichte der so genannten Neuroplaques abhängig vom Alter und der Krankheitsdauer an [70]. Hinweise auf die Bedeutung von Apo E ergeben sich durch dessen immunhistochemischen Nachweis in β -Amyloidplaques im Gehirn von Alzheimerpatienten [72]. *In*

vitro-Versuche bestätigen eine vergleichbar größere Bindungsaffinität der E4-Isoform an β -Amyloid [121]. Die Effekte des Apo E bei der Entstehung von Plaques beruhen vermutlich auf der Rolle im Transport bzw. in der *Clearance* von β -Amyloid. Die Amyloid-Peptide unterliegen einem permanenten *Turnover*, d.h. Amyloid wird abgelagert und ein Teil davon wieder entfernt. Dabei zirkuliert es gebunden an Lipoproteine [18]. Zum Unterschied zwischen den Apo E-Isoformen bezüglich β -Amyloidablagerungen gibt es zwei aktuelle Theorien. Zum einen könnte Apo E, indem es an β -Amyloid bindet, die Löslichkeit dieses Komplexes senken und so die β -Faltblattstruktur der Amyloidfibrillen stabilisieren [35]. Hierbei wäre die größere Affinität von E4 zu β -Amyloid der ausschlaggebende Faktor. Oder aber, Apo E fängt möglicherweise aktiv Amyloid aus dem Extrazellulärraum ab und verhindert so dessen Aggregation. In diesem Falle wäre der Besitz eines E4-Allels mit einer Funktionsminderung gegenüber E2 oder E3 gleichzusetzen [82].

Genetische und epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Apo E4 den wichtigsten bekannten Risikofaktor für die Entstehung einer Alzheimer-Demenz darstellt. In Anbetracht der Tatsache, dass bisher keine vollständig akzeptierte Hypothese der zeitlichen Vorgänge der molekularen und zellulären Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung postuliert wurde, könnte ein Schlüssel zu Klärung dieser Frage in der weiteren Erforschung der Omnipräsenz von Apo E4 in der komplizierten Pathologie liegen.

1.3.2 Apo E4 und kardiovaskuläre Erkrankungen

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte im Verständnis der Rolle von Apolipoprotein E in der Entstehung der Atherosklerose erzielt werden. Viele Studienergebnisse legen eine protektive Rolle von Apo E bei der Atheroskleroseentstehung nahe. Folgende, die Pathogenese beeinflussende Faktoren, werden von Apo E moduliert [22]:

- Begünstigung der Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen aus der Zirkulation
- Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Homöostase von Lipiden und Makrophagen
- Funktion im zellulären Cholesterolefflux und reversem Cholesterintransport
- Wirkung als Antioxidans
- Inhibition der Plättchenaggregation
- Modulierung von immunologischen Vorgängen

Die antiatherogene Wirkung von Apo E wird jedoch wesentlich von der Isoform beeinflusst. Ähnlich der Rolle von Apo E in der Entstehung der Alzheimer-Demenz, werden Apo E3 eher

Einleitung

protektive Eigenschaften zugeschrieben, während Apo E4 die Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen fördert.

Von besonderer klinischer Relevanz ist die Entstehung von atherosklerotischen Plaques in den Gefäßwänden der Koronarien, die über eine Lumeneinengung zu vorzeitiger koronarer Herzerkrankung (KHK) führen. Davignon et al. beschrieben, dass die Häufigkeit des Apo E4-Allels in Populationen mit einem hohen Risiko für koronare Herzerkrankungen (KHK) erhöht und in Regionen mit einem geringen Risiko erniedrigt ist [22]. Etliche Fallstudien sowie einige longitudinale Studien stellten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Apo E4-Allels und einer großen Häufigkeit von KHK fest [21, 27, 120]. Laut Stengard et al. ist die Variation des Apo E-Allels ein signifikanter Prädiktor für den letalen Ausgang einer KHK bei älteren Männern aus Finnland [107].

Lange Zeit wurde der erhöhte LDL-Serumspiegel bei Vorliegen von Apolipoprotein E4 für dessen Atherogenität verantwortlich gemacht. Dies konnte jedoch 2001 von Scuteri et al. widerlegt und die Tatsache, dass Apo E4 ein starker, von der Lipidkonzentration im Serum unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist, belegt werden [95]. Bestätigung fand diese Hypothese auch im WHO MONICA Projekt (Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease), in welchem eine Variation der relativen Häufigkeit des Apo E4-Allels einhergehend mit einer 40%igen Variation der KHK-Mortalitätsrate unabhängig von Apo E4-Effekten auf den Plasmacholesterinspiegel gefunden wurde [106]. Eine Schlussfolgerung aus der Framingham Offspring Study ist, dass das geschätzte KHK-Risiko stärker mit dem Apo E4 Allel assoziiert ist, als mit jeglicher bekannter Lipidstoffwechselstörung [120].

1.4 Zusammenhänge und Herleitung einer Aufgabenstellung

In den letzten Jahren hat die Bedeutung, die man der flussabhängigen Tonusregulation von Gefäßen für die Herz-Kreislauffunktion zuschreibt, durch neue Erkenntnisse stetig zugenommen. In unserer sowie in anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen die flussabhängige Dilatation (FDD) herabgesetzt ist [14, 71, 100]. Neben den allgemein bekannten Risikofaktoren einer KHK sammeln sich klinische Hinweise, dass erhöhte Triglyzeride im Blut die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigen [76, 77]. Triglyzeride werden im Kreislauf hauptsächlich von VLDL transportiert. Erhöhte Konzentrationen von VLDL begünstigen somit die Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen. Für die Hypercholesterinämie, einem Hauptrisikofaktor der KHK, konnte in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen hohen LDL-Spiegeln und herabgesetzter, endothelabhängiger Dilatation (EDD) von Arterien nachgewiesen werden [52]. Ob eine ähnliche Beeinflussung der Gefäßweite auch durch VLDL hervorgerufen werden kann, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. 1998 beschrieben Doi et al. eine Einschränkung der EDD durch Chylomikronen-Remnants [26]. Lewis et al. untersuchten erstmals den Einfluss von hohen Triglyzeridspiegeln auf endothelabhängige Dilatation in normocholesterinämischen Patienten. Es zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der Dilatation von Arterien auf Acetylcholin [58]. Folglich ist dies eine mögliche Ursache für die Atherogenität von hohen Plasmatriglyzeridspiegeln unabhängig von LDL- bzw. Gesamtcholesterinspiegeln. In keiner der bisher veröffentlichten Studien wurde jedoch der Einfluss von physiologischen VLDL-Konzentrationen auf die Relaxation von Gefäßen untersucht.

Es existieren viele Hypothesen über den Mechanismus, wie atherosklerotische Gefäßerkrankungen die Entstehung einer Alzheimer-Demenz beeinflussen können [56]. Jedoch stützen nur wenig gesicherte Daten eine der Hypothesen im Besonderen. Dabei werden vor allem drei Möglichkeiten der Beziehung der Erkrankungen zueinander diskutiert. Erstens ist es möglich, dass KHK und AD lediglich gemeinsame Risikofaktoren besitzen bzw. die gleichen Risikofaktoren unabhängig voneinander die Entstehung der Krankheiten fördern. Zweitens könnte es einen indirekten Einfluss von Atherosklerose geben: Krankhaft veränderte Gefäße im Gehirn schaffen Bedingungen, die zu Neurodegeneration prädisponieren. Und zuletzt könnte die Entwicklung einer AD direkt von Gefäßveränderungen, die zu neuronalem Zelltod und Ansammlung von Neuroplaques und Fibrillen (dem Kennzeichen der AD) führen, abhängig sein. Apolipoprotein E4 ist solch ein gemeinsamer Risikofaktor, der über die bisher beschriebenen Mechanismen die Entstehung der pathologischen Veränderungen fördert. Ob Apo E4 zusätzlich über eine Beeinträchti-

gung der flussabhängigen Dilatation von hirnersorgenden Gefäßen die AD beeinflusst, ist bisher nicht untersucht worden.

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung des Einflusses von physiologischen Konzentrationen VLDL auf die flussabhängige Dilatation. Dabei soll speziell der Unterschied zwischen VLDL mit nicht näher bestimmtem „gepooltem“ Apo E-Anteil und VLDL mit homozygotem Apo E4-Anteil untersucht werden. Um einen möglichst genauen Eindruck der Änderung der Gefäßweite zu erhalten, wurde, neben der direkten Messung von Tonus- und Potentialentwicklung von glatter Gefäßmuskulatur, die Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP bestimmt. Abgesehen von der Darstellung des Effektes auf die endothelabhängige Dilatation wurde zusätzlich der Einfluss auf die Matrix an deendothelialisierten Präparaten getestet. Im Hinblick auf die klinische Relevanz führten wir die Untersuchungen mit von Probanden entnommenem VLDL an Koronararterien des Menschen durch.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation der Koronararterien

2.1.2. Entnahme der Koronararterien

An den im Rahmen einer Herztransplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin entnommenen Empfängerherzen wurde ausgehend vom Sinus aortae die Arteria coronaria sinistra oder Arteria coronaria dextra aufgesucht. Ein ca. 14 cm langes Stück der Arterie wurde unter sterilen Bedingungen stumpf aus dem epikardialen Fettgewebe freipräpariert. Während der Präparation wurde das Herz mit gekühlter isotoner Kochsalzlösung feucht gehalten und, um das Endothel nicht zu verletzen, die Sondierung und Quetschung der Koronarie streng vermieden. Sofort nach Entnahme wurde das Gefäß in gekühlter Krebslösung transportiert.

2.1.2. Aufbereitung der Koronararterie und Äquilibration

Die Feinpräparation erfolgte in gekühlter Krebslösung, wobei die Koronararterie von angelagertem Fett und von der Adventitia befreit und in ca. 5-7 mm große Stücke geschnitten wurde. Um den ursprünglichen Na^+ - und K^+ -Gradienten wiederherzustellen, wurden die Präparate anschließend mindestens zwei Stunden in carbogenisierter Krebslösung äquilibriert und langsam erwärmt (Temperatur 37°C ; pH 7,35; 95% O_2 ; 5% CO_2). Für die Versuche mit deendothelialisierten Präparaten wurde das Endothel mit Hilfe eines im 30° -Winkel aufgesetzten Skalpell vorsichtig abgeschabt. Die Effektivität dieser Methode konnte licht- und elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

2.2 Lösungen und Substanzen

2.2.1 Krebslösung

Sämtliche Präparate wurden in einer isotonen Blutersatzlösung (Krebslösung) transportiert und äquilibriert. Die Elektrolytzusammensetzung entspricht folgenden Konzentrationen: Na^+ 151,16 mmol/L; K^+ 4,69 mmol/L; Ca^{2+} 2,52 mmol/L; Mg^{2+} 1,1 mmol/L; Cl^- 145,4 mmol/L; HCO_3^- 16,31 mmol/L; H_2PO_4^- 1,38 mmol/L; Glucose 7,77 mmol/L bei 310K und einem pH von 7,35. Die Lösung wurde mit einem Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 (Carbogen) durchperlt.

2.2.2 Lipidlösungen

Zur Gewinnung der Lipide entnahmen wir Blut von gesunden Probanden, die mindestens 10 Tage gefastet hatten und keine, die Lipidkonzentration im Blut beeinflussenden Medikamente oder antioxidierende Vitamine eingenommen hatten. Die Entnahme erfolgte in mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA in einer Endkonzentration von 1 mg/dL Blut) versetzten Röhrchen. Durch Zentrifugation (2500 x g für 6 min) gewannen wir Plasma, welches vorsichtig abpipettiert wurde. Aus diesem konnten die Lipoproteinfraktionen mittels Ultrazentrifugation in einer OptimaTM TLX Ultrazentrifuge mit Rotor TLA-120.2 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA) bei voller Geschwindigkeit von 120 000 rpm (entsprechend 625000 x g) und einer Temperatur von 18°C isoliert werden [36, 57]. Im ersten Schritt wurden die Teströhrchen mit 0,5 mL Plasma gefüllt, welches mit 0,5 mL eines Mediums mit festgelegter Dichte überdeckt wurde. Die Dichtemedien wurden zuvor mit Argon entgast und gereinigt, um die vollständige Deoxygenierung sicherzustellen. Für die Isolierung der einzelnen Lipoproteine wählten wir sowohl eine unterschiedlich lange Zentrifugationsdauer als auch verschieden dichte Medien: 30 min und 1,006 kg/L für VLDL, 150 min und 1,063 kg/L für LDL und 260 min und 1,21 kg/L für HDL. Die überstehende, mit Lipoproteinen angereicherte Flüssigkeit, wurde anschließend mit feinsten Pipetten aspiriert und, um die Oxidation zu minimieren, unter kontinuierlicher Stickstoffbegasung in kleine Glasröhrchen abgefüllt. Zuletzt reinigten wir die Lipoproteinfraktionen von EDTA und Kupferionen durch Gelfiltration. Für die Verdünnung verwendeten wir entgaste Krebslösung mit einem pH-Wert von 7,35. Die Endkonzentration der Lipoproteine wurde dabei für alle Versuche entsprechend den physiologischen Blutkonzentrationen gewählt: VLDL 30 mg/dL, IDL 10 mg/dL, LDL 100 mg/dL, HDL 50 mg/dL.

2.2.3 Apolipoprotein E-Genotypisierung

Die Genotypisierung der Probanden erfolgte durch Analyse der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen [101]. Für die Versuche mit gepooltem VLDL wurden die Proben verschiedener Probanden gemeinsam verwendet, für die Versuche mit homozygotem Apo E4/E4-VLDL die eines einzelnen genotypisierten Probanden.

2.3 Registrierung der Kraftentwicklung

2.3.1 Messung der Flussrate

Die verwendeten Lösungen wurden über einen Wärmeaustauschkreislauf zur Messkammer geleitet. Die gewünschte Flussrate konnte über ein direkt vor der Kammer angebrachtes Schraubventil

verstellt werden. Die gewählte Flussrate wurde manuell mit Hilfe einer Stoppuhr und eines Messzylinders überprüft und protokolliert.

2.3.2 Einspannen des Präparates in die Messkammer

Die 5 mm großen Präparate wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in Längsrichtung quer zur zirkulär verlaufenden glatten Ringmuskulatur eröffnet. Die so entstandenen 5 - 10 mm langen Streifen wurden entlang der Längsausrichtung der Myozyten mit dem Endothel nach oben in der Messkammer fixiert. Die eine Seite des Präparates wurde über eine feststehende Schraubklemme fixiert, die andere direkt am Arm eines isometrischen Kraftaufnehmers (KWS 522.C, K 52 C; Hottinger-Baldwin, Darmstadt, Deutschland).

2.3.3 Registrierung des Gefäßtonus

Das Signal des isometrischen Kraftaufnehmers konnte von einem digitalen Messverstärker direkt als Tonuswert in Gramm abgelesen werden. Zu Beginn der Versuche wurden die Gefäßstreifen nach einem standardisierten Muster vorgedehnt. Über einen Zeitraum von 5 min wurde die Spannung kontinuierlich bis auf 2 cN (entsprechend 2,04 g) erhöht und dann für weitere 5 min konstant gehalten. Das Vordehnen simulierte die in vivo durch den arteriellen Blutdruck entstehende Spannung der Gefäßwand. Während der Versuche wurde die Temperatur der Lösungen mit einem Haake-Thermostat kontrolliert und auf 37°C gehalten. Der pH-Wert wurde durch die ständige Carbogen-Durchperlung der Krebslösung zwischen 7,3 und 7,4 eingestellt.

2.3.4 Versuchsdurchführung

Nach dem Einspannen und Vorspannen des Gefäßes in Krebslösung bei einer Flussrate von 3 mL/min über einen Zeitraum von 10 min wurde der Versuch mit der jeweiligen Versuchslösung gestartet. Nach 5 min erfolgte die erste Registrierung des Gefäßtonus. Um die flussabhängige Entwicklung des Gefäßtonus zu registrieren, wurde die Flussrate in 10-minütigen Abständen auf folgende Werte erhöht: 5 mL/min, 20 mL/min, 40 mL/min und 100 mL/min. Der Tonus wurde dabei in 5-minütigem Abstand protokolliert. Bei Versuche wurden die Präparate bei der herrschenden Flussrate ausgespannt und sofort in flüssigem Stickstoff für die Messung der zyklischen Nukleotide eingefroren.

2.3.5 Korrektur der stress-relaxation

Der Tonus des Gefäßstreifens ändert sich bei allen Versuchen auch unabhängig vom jeweiligen Fluss, die so genannte stress-relaxation. Um die flussabhängige Dilatation unabhängig von der stress-relaxation messen zu können, wurde zu jedem Versuch ein Kontrollversuch unter gleichen

Bedingungen mit einem konstanten Fluss von 3 mL/min durchgeführt. Durch den Abzug vom Gesamteffekt erhielten wir die als korrigiert angegebenen Kurven.

2.4 Intrazelluläre Membranpotentialableitung

2.4.1 Mikroelektroden, Messverstärker und Datenaufnahme

Die intrazelluläre Membranpotentialableitung erfolgte mit Mikroelektroden, die mit 3 mol/L KCl gefüllt waren. Sie wurden aus einem Spezialglas (Pyrex Brand K2916 Corning Glass Works, New York; Innen-/Außendurchmesser 1,8/3,0 mm) mit einem Horizontalpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) bei 6,8 A Heizstrom in 2 min ausgezogen. Die Elektroden wurden direkt nach Herstellung auf Größe und Durchgängigkeit kontrolliert. Es wurden nur Elektroden mit einem Spitzendurchmesser kleiner 1 μm und einem Widerstand zwischen 60-100 M Ω verwendet. Die Tip-Potentiale wurden während der Versuchsdurchführung zur Kontrolle gemessen und betrugen zwischen -40 bis -80 mV. Als indifferente Elektrode diente eine Agar-Brücke, die mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllt war. Sie verband die Messkammer mit einem mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllten Gefäß, das durch eine Ag/AgCl/Platin-Elektrode mit dem Messverstärker verbunden war. Zur Abschirmung des gesamten Versuchsaufbaus dienten ein großer Faraday-Käfig sowie eine separate Abschirmung der einzelnen Mikroelektroden bis zu ihrer Spitze. Das gemessene Potential wurde 10-fach verstärkt auf einem Großbildoszilloskop (SGM 43 BN901 s/N293, Knott, München) dargestellt. Die Daten wurden, zusätzlich zur schriftlichen Dokumentation, über einen Analog/Digital-Digital/Analog-Wandler (DT 2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) an einen PC (80486 DX-66, Highscreen, Vobis, Aachen) weitergeleitet und in Win ADDA (V.1.31, Mikrotaurus, Software, Berlin) in Echtzeit dargestellt und gespeichert.

2.4.2 Einstiche

Die Messelektrode wurde mittels eines Mikromanipulators senkrecht an die luminale Seite des Gefäßstreifens herangeführt. Der Einstich erfolgte durch Klopfen an den Antivibrationstisch, so dass Endothel und Basalmembran durchstoßen wurden. Der Vorgang wurde auf dem Großbildoszilloskop kontrolliert. Bei korrektem Eindringen in den Intrazellulärraum der glatten Muskelzelle erfolgte ein sofortiger steiler Potentialabfall auf -50 bis -80 mV. Positivere Werte als -50 mV wurden als von Endothelzellen stammend interpretiert und verworfen. Um möglichst repräsentative Werte der gesamten Präparate zu bekommen wurde die Position der Elektrode in kleinen Schritten durch Horizontalverschiebung verändert. Nach jeder Messserie wurden Tip-

Potential und Elektrodenwiderstand überprüft und nur bei gegenüber Messbeginn unveränderten Parametern die Potentiale in die Auswertung mit aufgenommen.

2.4.3 Versuchsdurchführung

Die intrazelluläre Membranpotentialableitung wurde unter gleichen Bedingungen und simultan zur Registrierung des Gefäßtonus durchgeführt. Die Potentialableitungen erfolgten jeweils 10 min nach Beginn einer Flussrate, da nach dieser Zeit die Kraftentwicklung in einen steady-state übergegangen war und mechanisch gesehen quasi-stationäre Bedingungen herrschten. Nach Einspannen der Präparate in Krebslösung erfolgte zunächst eine Ableitung des Membranpotentials in Krebslösung. Anschließend erfolgte der Wechsel zur jeweiligen Versuchslösung.

2.5 Bestimmung der Konzentration von cAMP und cGMP

2.5.1 Gewebsaufschluss

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden in auf ca. -80°C vorgekühlte 2 mL Polypropylengefäße eingewogen und sodann wiederum in flüssigem N_2 bis zum Aufschluss gelagert. Der Aufschluss erfolgte durch dreimaliges manuelles Homogenisieren in 2 mL Glas-Potter-Homogenisatoren in jeweils 0,2 mL 6%iger Trichloressigsäure. Die Homogenisate wurden in den Polypropylengefäßen gesammelt. Präzipitierte Anteile des Homogenats wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 23000 g sedimentiert und der Überstand abgetrennt. Anschließend wurde die Trichloressigsäure in den Überstand durch viermaliges Abschütteln mit je 1 mL wassergesättigtem Diäthyläther entfernt. Die verbleibende wässrige Phase wurde gefriergetrocknet, die löslichen Sedimente in 0,2 mL Testpuffer (50 mM Na-Acetat, pH 5,8, BSA 0,02%) aufgenommen und bis zur Bestimmung bei -80°C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Konzentration von cAMP

Die Bestimmung der Konzentration von cAMP erfolgte mit den Biotrak ELISA Reagenzien von Amersham Pharmacia Biotech in der Regel ohne Acetylierung. Das Verfahren beruht auf der Konkurrenz der Bindung des freien cAMP der Probe mit einem cAMP-Peroxidase-Konjugat um immobilisiertes cAMP-spezifisches Antiserum. Das Antiserum und cAMP-Peroxidase-Konjugat wurden in jeweils 11 mL Testpuffer gelöst. Das Antiserum wurde vor der Verwendung nochmals 1:2 mit Testpuffer verdünnt. Eine Verdünnungsreihe der Standards wurde mit Hilfe einer Stammlösung (32 nmol/L) hergestellt und enthielt 0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, und 3200 fmol in jeweils 100 μL Volumen. Die Ansätze wurden auf einer 96-well ELISA-Platte, welche mit Anti-Kaninchen-IgG beschichtet war, hergestellt. Sie enthielten entweder 100 μL

Standard oder 80 μL Testpuffer plus 20 μL Probe. Bei hohen cAMP-Konzentrationen in der Probe wurde die Probenmenge entsprechend reduziert. Duplikate der Standards und Proben sowie 200 μL Testpuffer zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Konjugats „NSB“ wurden mit 100 μL Antiserum (mit Ausnahme der NSB Ansätze) versetzt und 120 min inkubiert. Soweit nicht anders vermerkt erfolgten die Inkubationen bei 4°C im Kühlraum auf einem Schüttler. Anschließend wurde zu allen Ansätzen 50 μL cAMP-Peroxidase-Konjugat gegeben und nochmals 60 min inkubiert. Danach wurden die Ansätze 5-mal mit Waschpuffer (Testpuffer plus 0,05% Tween 20) gewaschen und die Platten sorgfältig getrocknet. Die Menge des gebundenen Peroxidase-Konjugats wurde über die Umsetzung von 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durch die Peroxidase in Gegenwart von H₂O photometrisch bestimmt. In alle Wells wurden 150 μL der fertigen TMB-Substratlösung gegeben und bei Raumtemperatur die Blaufärbung des Standards beobachtet. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde versucht, die Reaktionszeit so zu wählen, dass die Absorptionen den Wert von 1,5 – 1,7 Absorptionseinheiten nicht überstiegen. Die hierfür benötigten Zeiten variierten erheblich zwischen 10 und 120 min. Beim Erreichen einer optimalen Blaufärbung der Nullwerte wurde 100 μL 1 M Schwefelsäure zugegeben, wobei ein Farbumschlag nach Gelb erfolgte, welcher bis zu einer Stunde stabil war. Die Absorptionsmessung erfolgte in einem ELISA Reader bzw. einem Perkin-Elmer Victor ELISA Platten Photometer bei 450 nm.

2.5.3 Bestimmung der Konzentration von cGMP

Die Bestimmung von cGMP erfolgte über eine analoge Bestimmungsmethode, jedoch nach Acetylierung von Standards und Samples. Aufgrund einer erhöhten Affinität des Antiserums zu acetylierten Zyklonukleotiden wird die Sensitivität des Tests etwa um den Faktor 10 gesteigert. Das Acetylierungsreagenz wurde durch Mischen von einem Teil Essigsäureanhydrid mit 2 Teilen Triäthylamin hergestellt. Davon wurde 1/10 des Probenvolumens zu Proben und Standards gegeben. Die Acetylierungsreaktionen waren innerhalb von ca. 5 min abgeschlossen. Die Standards enthielten 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512 fmol/Ansatz (in einem Volumen von 50 μL). Die Acetylierungen wurden mit 0,5 mL Standardlösung plus 50 μL Acetylierungsreagenz durchgeführt. Für die Acetylierung der Proben wurden 100 μL Probe in ein 0,5 mL Probengefäß gegeben, mit 10 μL Testpuffer verdünnt und 11 μL Acetylierungsreagenz wurde verwendet. Für die Messansätze wurden (nach Ansetzen der Acetylierungsreaktionen) 100 μL Antiserum vorgelegt (aufgelöst wie oben, jedoch nicht nachverdünnt) und anschließend jeweils 50 μL Standard oder Probe zugegeben. Alle Ansätze wurden in Duplikaten hergestellt. Der NSB-Ansatz enthielt 150 μL Testpuffer. Die Ansätze wurden 120 min inkubiert. Danach wurden 100 μL cGMP-

Peroxidase-Konjugat zugegeben, gefolgt von weiteren 60 min Inkubation. Anschließend wurden die Ansätze gewaschen und mit 200 μL TMB- H_2O_2 -Reagens versetzt und wie bereits beschrieben für einen variablen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte nach Zugabe von 100 μL 1 M Schwefelsäure.

2.5.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte über eine parallel angelegte Eichkurve mit cAMP-Mengen zwischen 0 und 3200 fmol/Ansatz. Die Standardkurven wurden erstellt durch den Fit der Absorption an die Funktionsgleichung $f = ((a*b)/(b+x))+c$, wobei x für die Konzentration des Standards steht. Aus den Fitparametern a, b und c wurde die Menge (x) cAMP der Proben (in fmol) über $x = ((a*b)/(y-c))-b$ errechnet, wobei y für die Absorption bei 450 nm steht. Zur Errechnung der Konzentrationen wurde x mit Faktor $F = (\text{Gesamtvolumen}/\text{eingesetztes Probenvolumen})$ multipliziert und durch das Gewebsgewicht (in mg) geteilt. Die so ermittelte Konzentration ist in nmol/kg angegeben.

2.6 Auswertung und Statistik

Für die Auswertung der Kraftentwicklung wurden die Messwerte von Koronararterien aus insgesamt 14 Herztransplantationen unter den jeweils identischen Bedingungen zusammengefasst. Es wurde der arithmetische Mittelwert \pm SEM angegeben. Da zu jeder Arterie ein Kontrollversuch mit Krebslösung durchgeführt wurde, konnten wir in die Darstellung der Standardkontrollkurve eine größere Anzahl von Versuchen einfließen lassen. Die Ergebnisse der VLDL-Versuche stammen von 6 Patienten. Die Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP ist ebenfalls als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test nach Student für unverbundene Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten herangezogen. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Kraft- und Potentialentwicklung

3.1.1 Kontrollen

Um die Auswirkung von VLDL auf die flussabhängige Dilatation beschreiben zu können, wurde an jeder verwendeten Koronararterie ein Kontrollversuch mit Krebslösung durchgeführt. Dabei konnte an Gefäßabschnitten mit intaktem Endothel, wie zuvor vielfach beschrieben [89], eine deutliche flussabhängige Dilatation beobachtet werden. Diese nahm stufenartig nach jeder Erhöhung der Flussgeschwindigkeit zu. Nach der beschriebenen Vordehnung auf 2 g stellte sich nach einer zehnminütigen Anpassungsphase unter einem Fluss von 3 mL/min im Mittel ein Ausgangstonus von $1,648 \pm 0,064$ g ein. Bei einem Nettokraftverlust von 0,468 g in 40 min fand sich bei einer zuletzt herrschenden maximalen Flussrate von 100 mL/min noch ein Tonus von $1,180 \pm 0,032$ g (Abb. 3). Dies entspricht einer Gesamttonusabnahme von 28,5% mit der stärksten Relaxation bei einer Erhöhung der Flussrate von 3 – 20 mL/min. Um den reinen flussabhängigen Effekt darzustellen, wurde der Kraftverlust bei gleichbleibendem Fluss von 3 mL/min registriert, im Folgenden als flussunabhängige Dilatation bezeichnet. Da bis zur ersten Registrierung des Tonus der Versuchablauf mit dem der Präparate mit Flusserhöhung identisch ist, konnte ein gemeinsamer Ausgangspunkt ermittelt werden. Nach 40 min bei konstantem Fluss fand sich im Mittel noch ein Tonus von $1,445 \pm 0,033$ g (Abb. 3). Durch Abzug der stress-relaxation vom gesamten dilatierenden Effekt unter Flusserhöhung kann eine Kurve ermittelt werden, die die Dilatation der Gefäße als reine Reaktion auf shear-stress-Exposition darstellt (siehe 2.3.5). Diese korrigierte Kurve zeigt einen Nettokraftverlust von 0,265 g auf $1,383 \pm 0,046$ g, entsprechend einer Tonusabnahme von 16,1% (Abb. 5b). Untersucht man das Membranpotential der glatten Gefäßmuskulzelle bei steigenden Flussraten zeigt sich eine Hyperpolarisation von $-57,08 \pm 0,57$ mV auf $-60,20 \pm 0,73$ mV (Abb. 5a). Dies entspricht einer Zunahme der Negativität des Ausgangspotentials um 5,5%. Präparate, an denen zuvor das Endothel entfernt wurde, zeigten, ausgehend von einem Tonus von $1,778 \pm 0,030$ g, nach 40 min bei stufenweiser Erhöhung des Flusses auf 100 mL/min einen Tonus von $1,341 \pm 0,095$ g, entsprechend einem Nettokraftverlust von 24,6%. Flussunabhängig zeigten die Präparate eine Tonusabnahme um 0,297 g auf $1,481 \pm 0,049$ g.

Ergebnisse

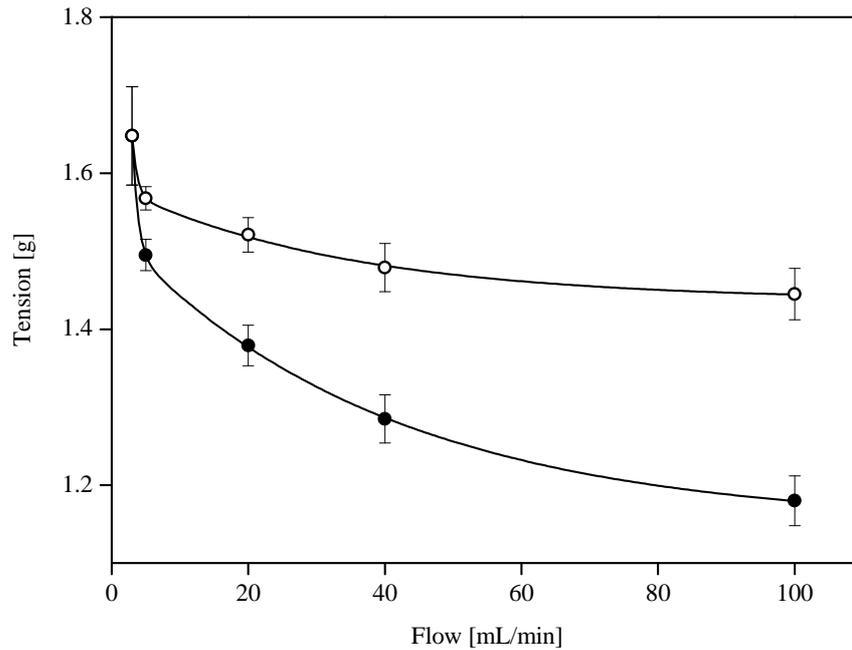


Abb. 3: Tonusentwicklung von unbehandelten Präparaten in Krebslösung. Flussabhängige Dilatation (●);flussunabhängige Dilatation (○) [n=18].

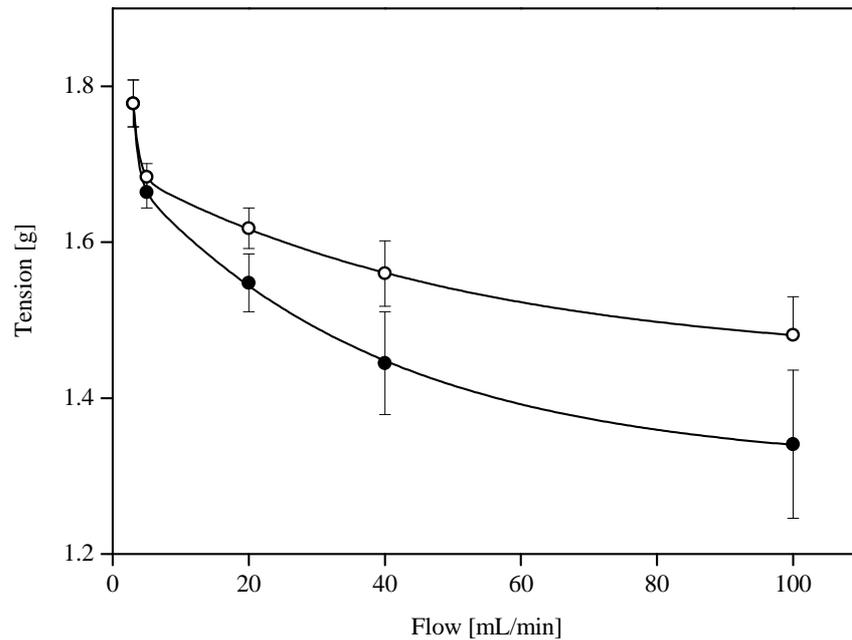


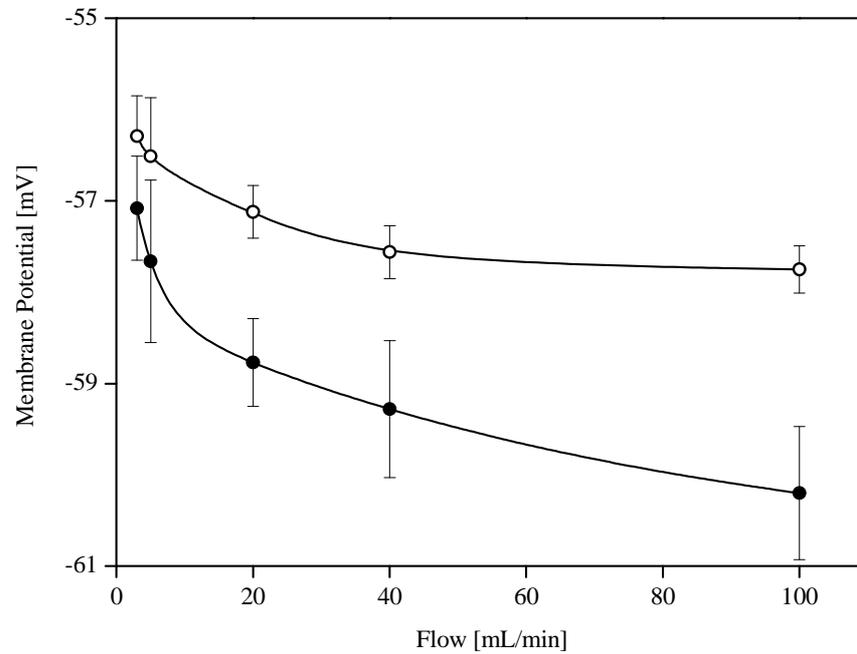
Abb. 4: Tonusentwicklung von deendothelialisierten Präparaten in Krebslösung. Flussabhängige Dilatation (●);flussunabhängige Dilatation (○) [n=20].

Wie Abbildung 5b zeigt, ergibt sich korrigiert um die stress-relaxation ein Nettokraftverlust von 0,140 g auf $1,638 \pm 0,107$ g. Parallel dazu hyperpolarisierten die glatten Muskelzellen der Gefäßwände von $-56,29 \pm 0,44$ mV auf $-57,75 \pm 0,26$ mV (Abb. 5a). Insgesamt zeigten die Präpara-

Ergebnisse

te im Vergleich mit Gefäßen mit intaktem Endothel eine geringere flussabhängige Dilatation von 7,9% und einen um 7,5% höheren Basaltonus.

a)



b)

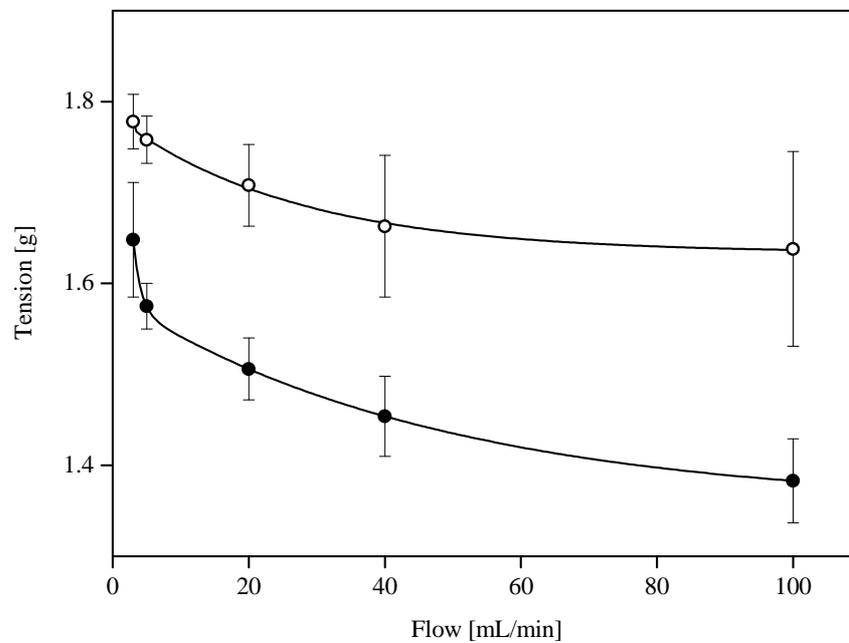


Abb. 5: a) Potentialentwicklung von normalen (●) [n=4] und deendothelialisierten Präparaten (○) [n=4].
b) Tonusentwicklung von normalen (●)[n=18] und deendothelialisierten Präparaten (○) [n=20]. Tonus um die stress-relaxation korrigiert.

Ergebnisse

Die statistische Überprüfung der Kraftentwicklung ergab bei allen Flussraten über 3 mL/min einen signifikanten Unterschied zwischen deendothelialisierten und Normalpräparaten ($p < 0,035$), hinsichtlich der Potentialentwicklung bestand bei Flussraten von 20 und 100 mL/min ein signifikanter Unterschied ($p < 0,03$).

3.1.2 Gepooltes VLDL

Nachdem sämtliche Präparate in Krebslösung vorgedehnt wurden, stellte sich nach zehnmütigem Einfluss von VLDL bei einer Flussrate von 3 mL/min ein Basaltonus von $1,417 \pm 0,131$ g ein. Der Tonus nahm flussunabhängig um 0,206 g auf $1,211 \pm 0,046$ g ab. Bei Steigerung des Flusses zeigte sich auch unter Einfluss von VLDL eine Relaxation. Im Mittel fand sich ein Endtonus von $1,084 \pm 0,080$ g. (Abb. 6). Wie in Abbildung 8b dargestellt lag der Endtonus der um die stress-relaxation korrigierten Kurve bei $1,290 \pm 0,093$ g, die Gesamttonusabnahme beträgt 9%. Der Relaxation ging einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur von $-59,52 \pm 0,48$ mV auf $-60,59 \pm 0,59$ mV voraus (Abb. 8a).

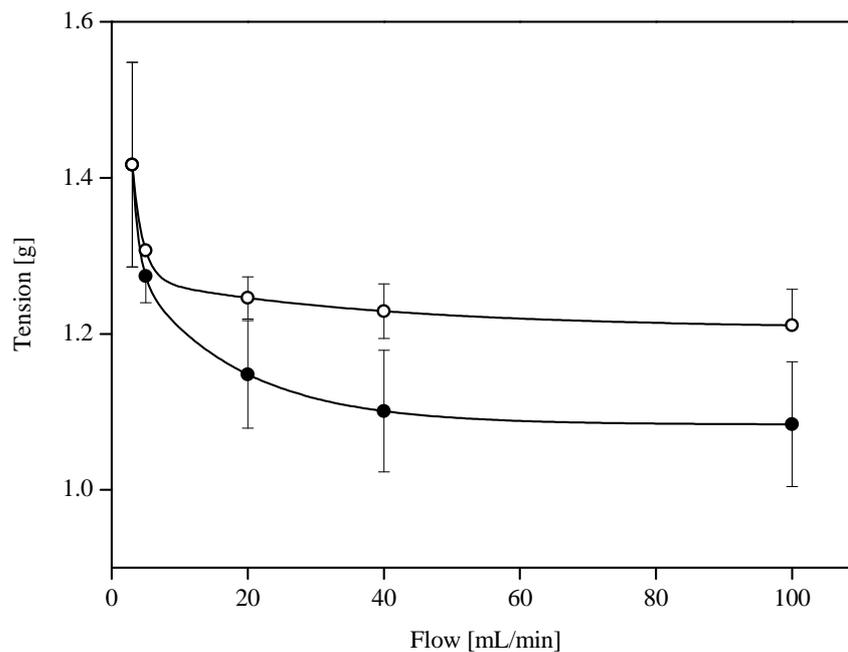


Abb. 6: Tonusentwicklung von Präparaten mit intaktem Endothel in gepooltem VLDL. Flussabhängige Dilatation (●); flussunabhängige Dilatation (○) [n=12].

Bei identischem Versuchsablauf und Verwendung der gleichen VLDL-Lösung, fand sich an deendothelialisierten Gefäßen ein Ausgangstonus von $1,611 \pm 0,077$ g. Dieser nahm flussunabhängig um 0,269 g auf $1,343 \pm 0,057$ g und flussabhängig um 0,360 g auf $1,252 \pm 0,046$ g ab (Abb. 7). Korrigiert um die stress-relaxation lag der Endtonus bei $1,520 \pm 0,073$ g (Abb. 8b).

Ergebnisse

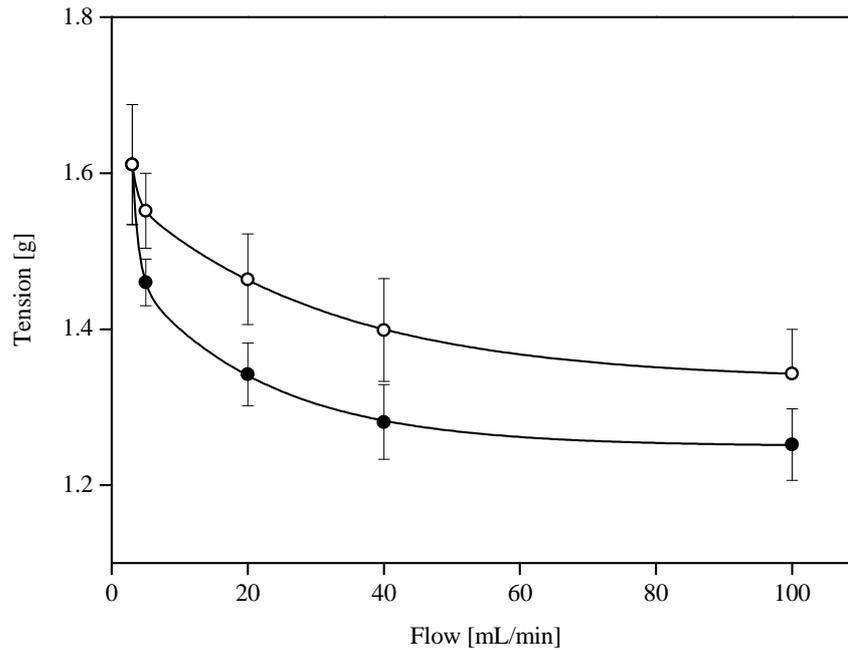
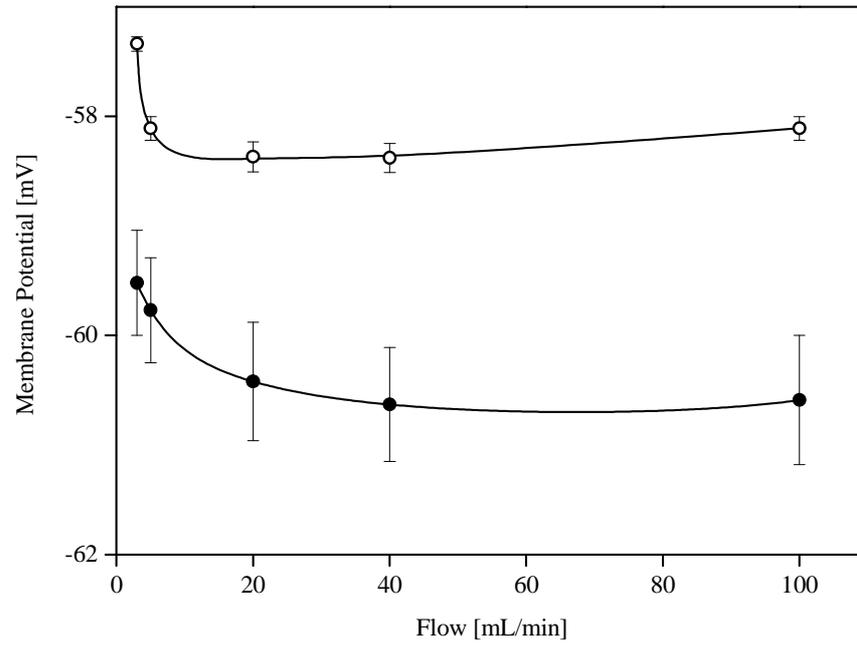


Abb. 7: Tonusentwicklung von deendothelialisierten Präparaten in gepooltem VLDL. Flussabhängige Dilatation (●); flussunabhängige Dilatation (○) [n=9].

Die Membranen der glatten Gefäßmuskelzellen hyperpolarisierten dabei von $-57,34 \pm 0,07$ mV auf $-58,11 \pm 0,11$ mV (Abb. 8a). Insgesamt lag der Basaltonus der Gefäße mit intaktem Endothel 12% unter dem der deendothelialisierten Präparate. Entsprechend den Kontrollversuchen, zeigten die deendothelialisierten VLDL-Präparate eine geringere, um die stress-relaxation korrigierte flussabhängige Dilatation von nur 5,6% gegenüber den unbehandelten VLDL-Präparaten mit einem reinen Nettokraftverlust von 9,0%.

Ergebnisse

a)



b)

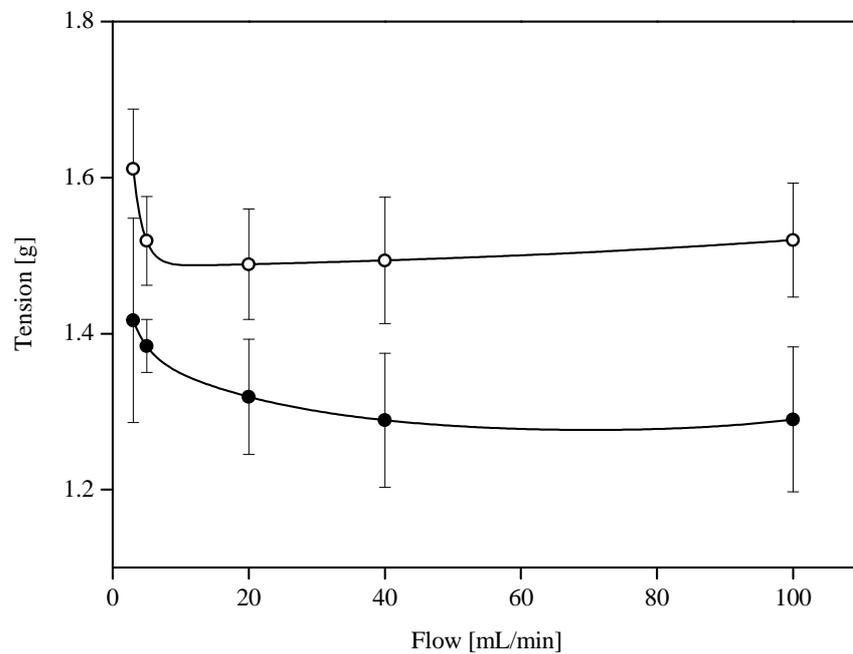


Abb. 8: a) Potentialentwicklung von normalen (●)[n=4] und deendothelialisierten Präparaten (○) [n=4] in gepooltem VLDL.
b) Tonusentwicklung von normalen (●) [n=12] und deendothelialisierten Präparaten (○) [n=9] in gepooltem VLDL. Tonus um die stress-relaxation korrigiert.

3.1.3 Homozygotes Apo E4/E4-VLDL

Entsprechend dem Versuchablauf mit gepoolter VLDL-Lösung wurde die Kraftentwicklung an Gefäßabschnitten in Abhängigkeit von homozygotem Apo E4/E4-VLDL registriert. Es fand sich im Mittel ein Anfangstonus von $1,707 \pm 0,061$ g. Flussunabhängig registrierten wir eine Relaxation auf $1,399 \pm 0,072$ g. Bei Erhöhung der Flussrate auf 5 - 20 mL/min konnte eine geringe Relaxation gemessen werden, die jedoch bei höheren Flüssen in eine Kontraktion überging. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, fiel dabei der Tonus insgesamt auf $1,621 \pm 0,083$ g und somit im Mittel um 0,085 g.

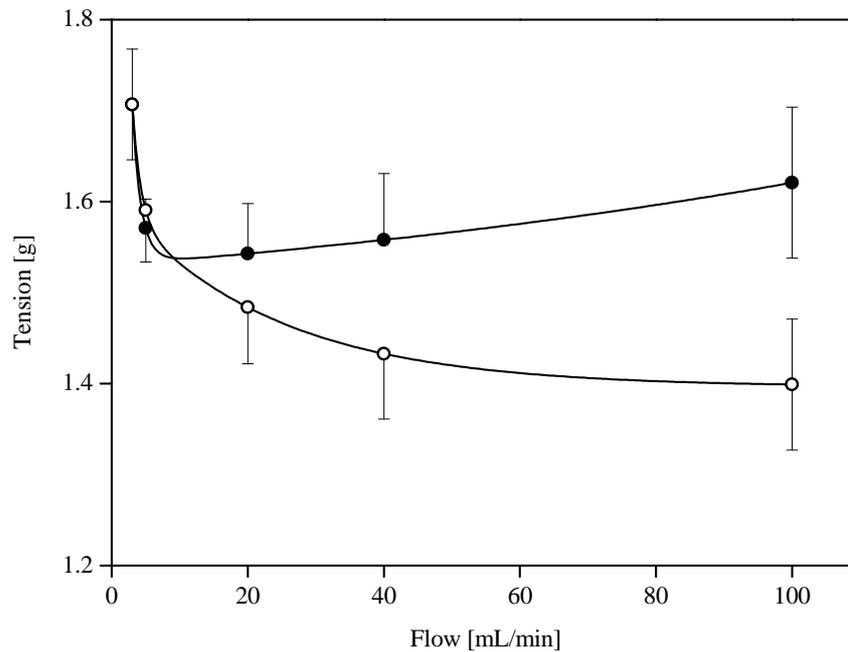


Abb. 9: Tonusentwicklung von normalen Präparaten in homozygotem Apo E4/E4-VLDL. Flussabhängige Dilatation (●); flussunabhängige Dilatation (○) [n=12].

Korrigiert um den shear-stress nimmt der Tonus nur bei einer Flusserhöhung bis 5 mL/min ab, bei höheren Flüssen resultiert eine Gesamttonuszunahme von insgesamt 13% (Abb. 11b). Flussabhängig scheint es somit zu einer Kontraktion zu kommen, die jedoch in der Messung durch die gleichzeitige stress-relaxation überlagert wird und in der Kurve als Tonusabnahme zusehen ist (Abb. 9). Die Messung des Membranpotentials zeigte eine der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur vorausgehende Depolarisation ausgehend von einem Potential von $-56,17 \pm 0,12$ mV auf $-55,38 \pm 0,33$ mV (Abb. 11a). Nach Entfernung der Endothelschicht konnte ein Ausgangstonus von im Mittel $1,824 \pm 0,029$ g gemessen werden. Es zeigte sich sowohl flussabhängig als auch bei gleich bleibendem Fluss eine Relaxation. Wie in Abbildung 10 dargestellt, war diese

Ergebnisse

jedoch flussunabhängig größer (Abnahme auf $1,560 \pm 0,156$ g) als bei Steigerung des Flusses (Abnahme auf $1,651 \pm 0,108$ g).

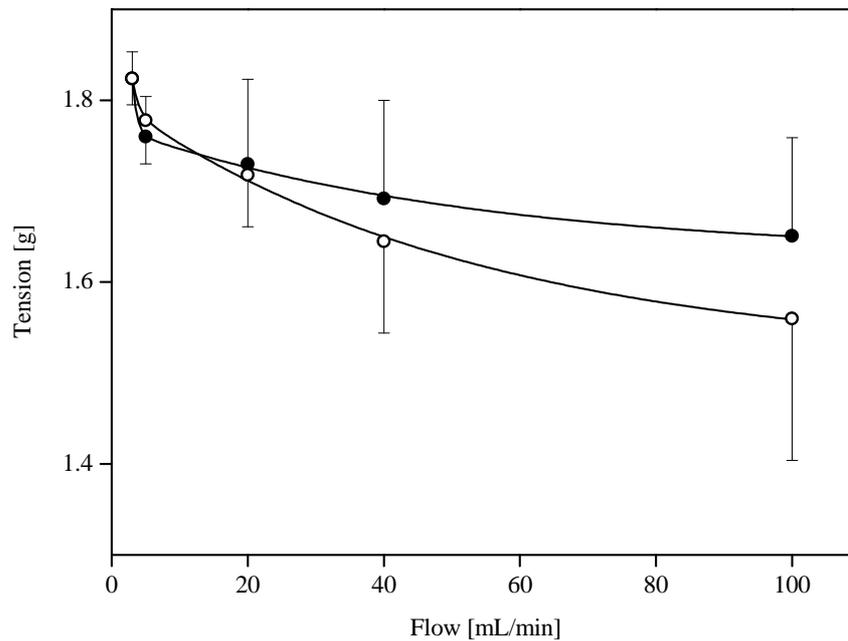
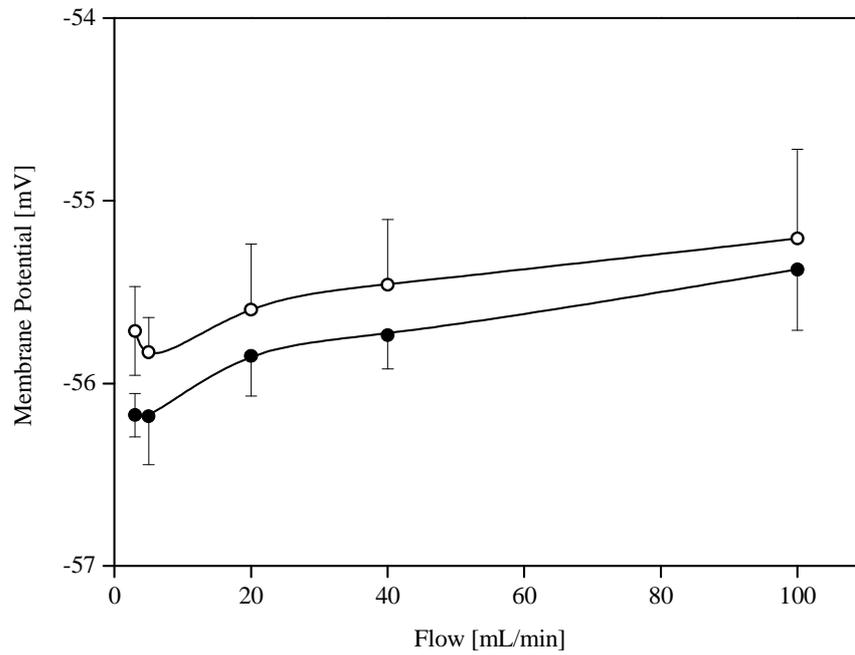


Abb. 10: Tonusentwicklung von deendothelialisierten Präparaten in homozygotem Apo E4/E4-VLDL. Flussabhängige Dilatation (●); flussunabhängige Dilatation (○) [n=11].

Wie bei den unbehandelten Arterienstreifen ergibt sich bei Korrektur um die stress-relaxation, aufgrund der stärkeren Relaxation der flussunabhängigen Präparate, eine Nettokraftzunahme von 0,095 g, entsprechend einer Tonuszunahme um 5% (Abb. 11b). Auch die Präparate ohne Endothel zeigen in der Potentialableitung eine Depolarisation, von $-55,71 \pm 0,24$ mV auf $-55,21 \pm 0,49$ mV (Abb. 11a).

Ergebnisse

a)



b)

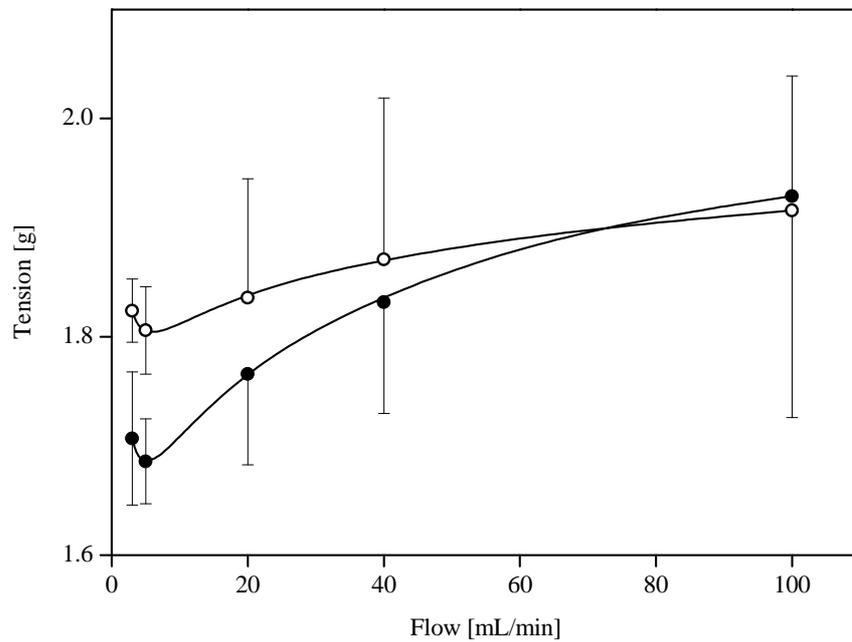


Abb. 11: a) Potentialentwicklung von normalen (●) [n=3] und deendothelialisierten Präparaten (○) [n=3] in homozygotem Apo E4/E4-VLDL.
b) Tonusentwicklung von normalen (●)[n=12] und deendothelialisierten Präparaten (○) [n=11] in homozygotem Apo E4/E4-VLDL. Tonus um die stress-relaxation korrigiert.

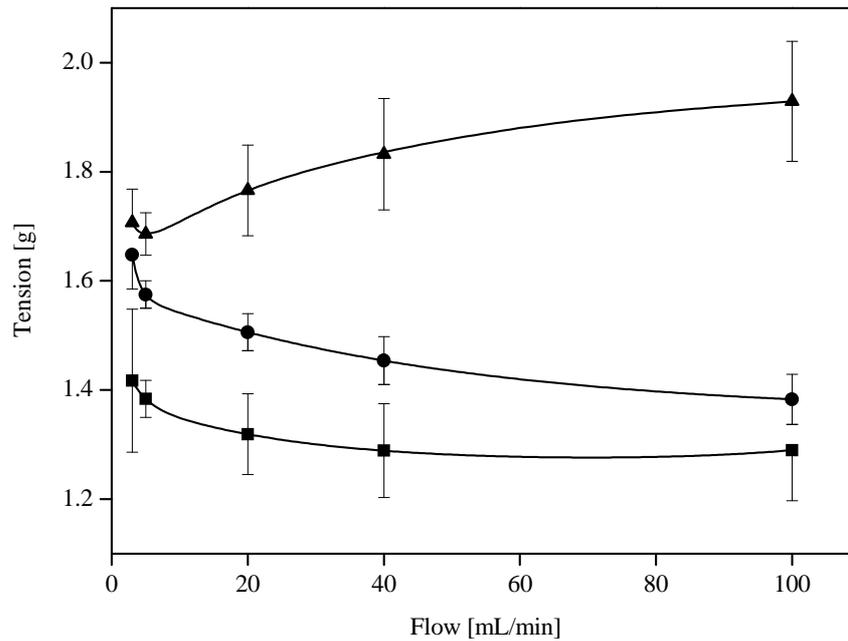
3.1.4 Flussabhängige Dilatation in Anhängigkeit von verschiedenen VLDL-Isoformen

Um einen besseren Überblick zu erhalten, wurde die Kurve der Kontrollen und der VLDL-Präparate in Abbildung 12 gemeinsam dargestellt. Dabei zeigt sich neben dem Einfluss auf die Relaxation auch ein von der VLDL-Isoform abhängiger Einfluss auf den Basaltonus der Gefäße. So liegt der Ausgangstonus der gepoolten VLDL-Kurve mit intaktem Endothel um 14% unter der Standardkontrollkurve. Im Gegensatz dazu fand sich unter dem Einfluss von homozygotem Apo E4/E4-VLDL ein um 3,5% erhöhter Ausgangstonus. Vergleicht man den Tonus der verschiedenen VLDL-Präparate untereinander, so erhält man einen um 20,5% höheren Tonus der Apo E4/E4-Präparate gegenüber den gepoolten VLDL-Präparaten. Gleichartige Veränderungen zeigen sich auch bei deendothelialisierten Präparaten. Der Unterschied des Ausgangstonus im Vergleich der gepoolten VLDL-Präparate und Apo E4/E4-Präparate ohne Endothel ergab eine statistische Signifikanz ($p < 0,02$).

Während der Basaltonus durch gepooltes VLDL herabgesetzt wird, zeigte sich ein gegenteiliger Einfluss auf die flussabhängige Dilatation. An unbehandelten Arterienstreifen nahm der Gesamttonus unter gepooltem VLDL um 9% ab, verglichen mit 16% unter Krebslösung. Eine weitere Einschränkung der flussabhängigen Dilatation konnte unter E4/E4-VLDL gemessen werden. Wie in Abbildung 12a dargestellt kam es zu einer geringfügigen Relaxation bei niedrigen Flüssen, ab einer Flussrate von 20 mL/min sogar zu einer erheblichen Tonuszunahme. Es resultiert eine Gesamttonuszunahme von 13%. Die statistische Überprüfung der Tonusentwicklung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollkurve und VLDL-Pool-Kurve für Flüsse von 5-20 mL/min ($p < 0,03$) und der E4/E4-VLDL-Kurve für alle Flüsse ($p < 0,025$). Ein hohe Signifikanz bei allen Flussgeschwindigkeiten ergab der Vergleich der VLDL-Kurven untereinander ($p < 0,001$). Die Resultate nach Entfernung des Endothels sind in Abbildung 12b dargestellt. Durch die Entfernung des Endothels verringerte sich an allen Koronararterien die flussabhängige Dilatation bzw. Kontraktion. Die Kontrollen relaxierten im Mittel um 7,8% unter den Ausgangstonus. Vergleicht man die Kurve für gepooltes VLDL mit der Kontrollkurve, zeigt sich insgesamt eine wenig veränderte Gesamttonusabnahme von 5,7%, jedoch eine wesentlich andere Art des Kurvenverlaufs. Wie bei den unbehandelten Präparaten kam es zunächst zu einer Relaxation, die jedoch bei zunehmender Flussgeschwindigkeit in eine leichte Kontraktion überging (signifikanter Unterschied für Flussraten von 5-20 mL/min; $p < 0,014$). Das Umfließen der Präparate mit homozygotem E4/E4-VLDL führte zu einer leichten flussabhängigen Kontraktion von 5% über den Basaltonus.

Ergebnisse

a)



b)

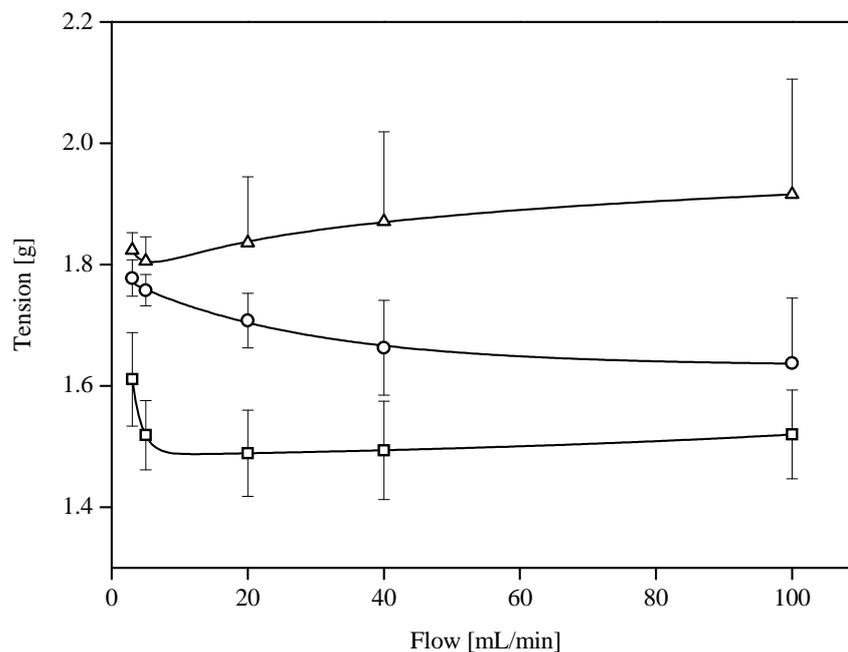


Abb. 12: a) Tonusentwicklung von Präparaten, korrigiert um die stress-relaxation, mit intaktem Endothel. (●) Kontrollpräparate in Krebslösung; (■) gepooltes VLDL; (▲) Apo E4/E4-VLDL.
b) Tonusentwicklung von Präparaten, korrigiert um die stress-relaxation, ohne Endothel. (○) Kontrollpräparate in Krebslösung; (□) gepooltes VLDL; (△) Apo E4/E4-VLDL.

Unter Einfluss von E4/E4-VLDL ist nach Entfernung des Endothels, in Relation zu einer Abnahme der flussabhängigen Relaxation der Kontrollen und der gepoolten VLDL-Präparate und

verglichen mit den Präparaten mit intaktem Endothel eine Einschränkung der flussabhängigen Kontraktion zu sehen. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz ergab einen Unterschied zwischen E4/E4-VLDL-Kurve und gepooltem VLDL für Flussgeschwindigkeiten bis 40 mL/min.

3.2 Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide

Wie in der Einleitung (siehe Abschnitt 1.1.1) beschrieben, geht die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur mit einer Freisetzung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP einher. Die Präparate wurden sofort nach der Messung der Kraftentwicklung bei 100 mL/min Fluss in flüssigem Stickstoff eingefroren. So konnte die zu diesem Zeitpunkt herrschende Nukleotidkonzentration gemessen werden, ohne dass es zu einer Veränderung des intrazellulären Spiegels kam. Um Fehler auszuschließen, wurde von jedem Präparat die Konzentration mindestens zweifach bestimmt und anschließend gemittelt.

3.2.1 Kontrollen

Nachdem die Präparate 50 Minuten lang einem konstanten Fluss von 3 mL/min ausgesetzt waren, wurde im Mittel eine cGMP-Konzentration von $3,836 \pm 0,536$ nmol/kg (n=11) gemessen. Nach stufenweiser Erhöhung der Flussrate auf 100 mL/min stieg die cGMP-Konzentration um 96,4% auf $7,532 \pm 0,373$ nmol/kg (n=42) an. In deendothelialisierten, flussunabhängig gemessenen Präparaten fand sich ein geringerer cGMP-Spiegel von $3,221 \pm 0,384$ nmol/kg (n=11). Auch hier zeigte sich ein Anstieg von cGMP nach Steigerung der Flussrate, jedoch lediglich um 50,4% auf $4,842 \pm 0,762$ nmol/kg (n=40) (Abb. 13).

Auch die Messung der cAMP-Konzentration der Kontrollpräparate zeigte einen Anstieg von cAMP in Abhängigkeit von der Flussrate. So fand sich bei konstantem Fluss von 3 mL/min eine Konzentration von $182,090 \pm 19,709$ nmol/kg (n=12), die im Mittel auf $239,830 \pm 23,870$ nmol/kg (n=43) anstieg. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, zeigten auch die deendothelialisierten Präparate einen Anstieg der cAMP-Konzentration von $159,819 \pm 21,038$ nmol/kg (n=9) auf $194,213 \pm 17,203$ nmol/kg (n=40). Insgesamt stieg die cAMP-Konzentration der Präparate mit intaktem Endothel um 31,7%, der deendothelialisierten Präparate um 21,5%.

Ergebnisse

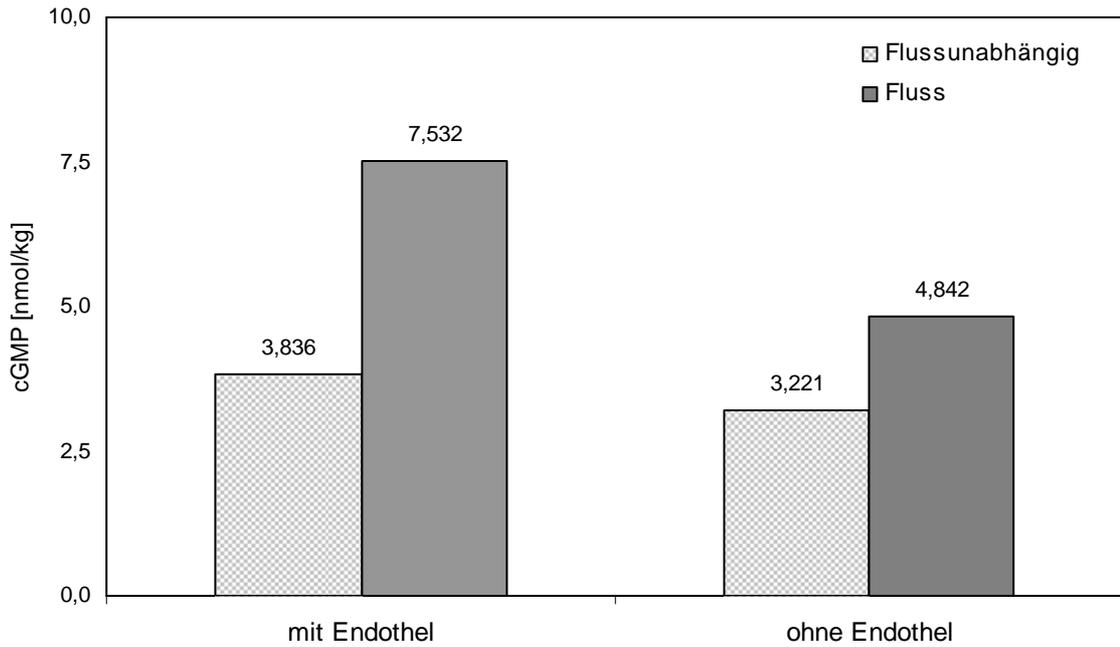


Abb. 13: cGMP-Konzentration der Kontrollpräparate mit und ohne Endothel

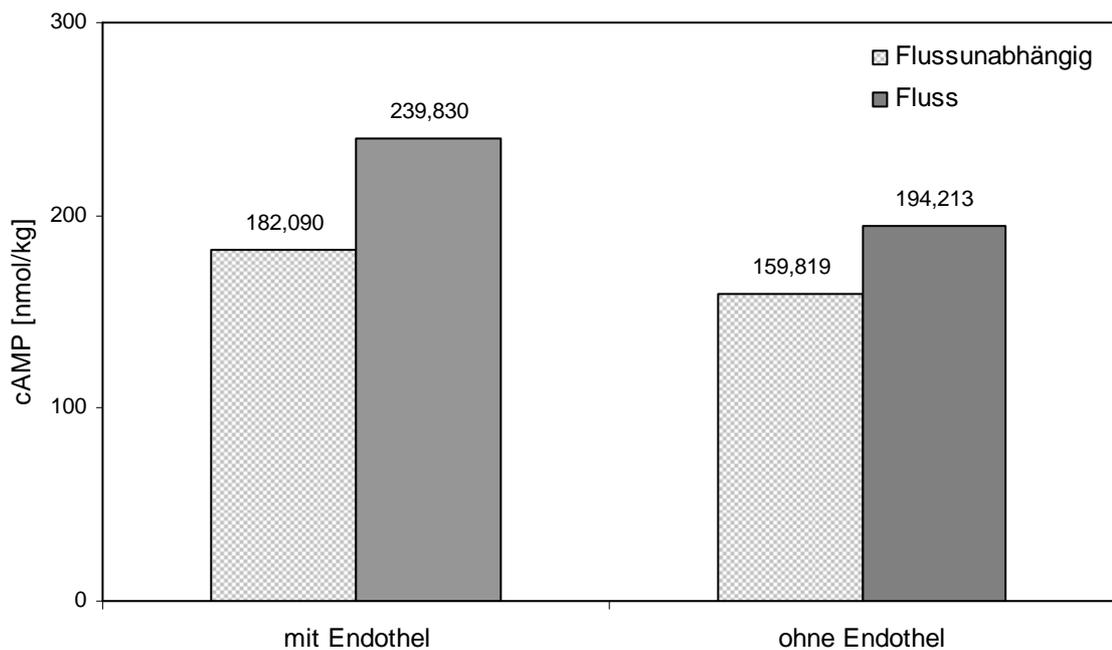


Abb. 14: cAMP-Konzentration der Kontrollpräparate mit und ohne Endothel.

Zusammenfassend konnte sowohl für cAMP als auch für cGMP im Einklang mit der Literatur eine Zunahme von zyklischen Nukleotiden bei Relaxation von glatter Gefäßmuskulatur beobachtet werden. Dabei war die prozentuale Zunahme von cGMP sowohl in den unbehandelten als auch in den deendothelialisierten Gefäßen höher als die Zunahme von cAMP (Abb. 15).

Ergebnisse

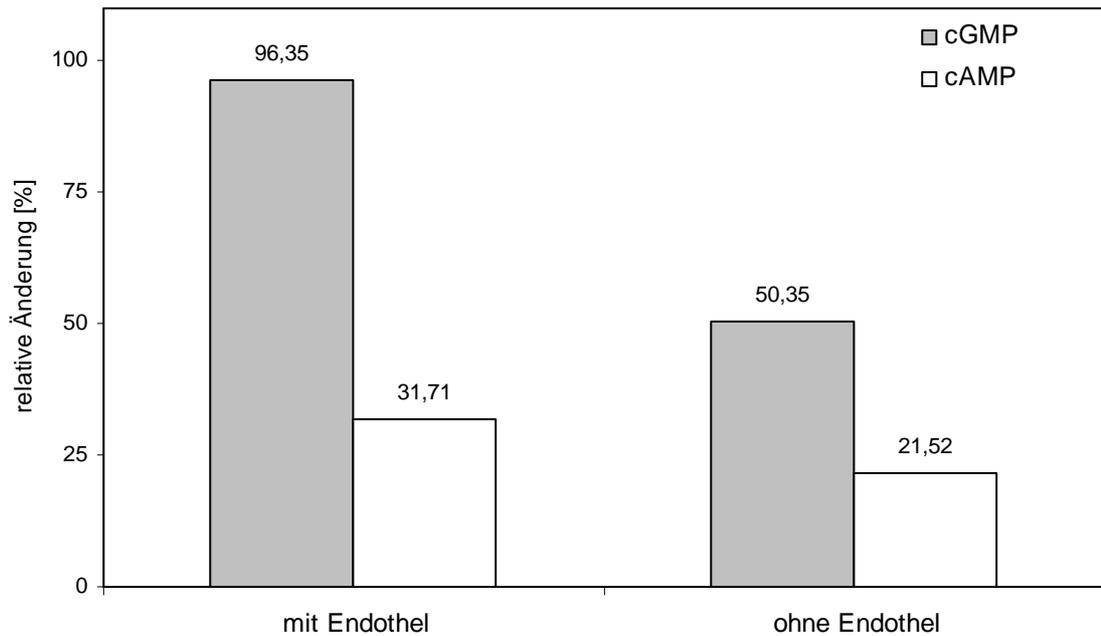


Abb. 15: Prozentuale Änderung der Konzentration zyklischer Nucleotide bei Flusserhöhung in Kontrollpräparaten mit und ohne Endothel.

3.2.2 Gepooltes VLDL

Unter konstantem Fluss von gepooltem VLDL betrug die mittlere cGMP-Konzentration der Präparate $14,953 \pm 3,760$ nmol/kg ($n=3$). Wie die Messung der Kraftentwicklung gezeigt hat, relaxierten die Gefäße nach Steigerung der Flussrate, und die cGMP-Konzentration stieg auf $26,425 \pm 3,580$ nmol/kg ($n=9$), das heißt um 76,7% an. Bei den deendothelialisierten Gefäßabschnitten zeigte sich nur ein geringer Anstieg von cGMP bei Steigerung der Flussrate. Der Spiegel stieg geringfügig um 10,2% von $14,608 \pm 6,000$ nmol/kg ($n=3$) auf $16,091 \pm 2,602$ nmol/kg ($n=9$) (Abb. 16).

Ergebnisse

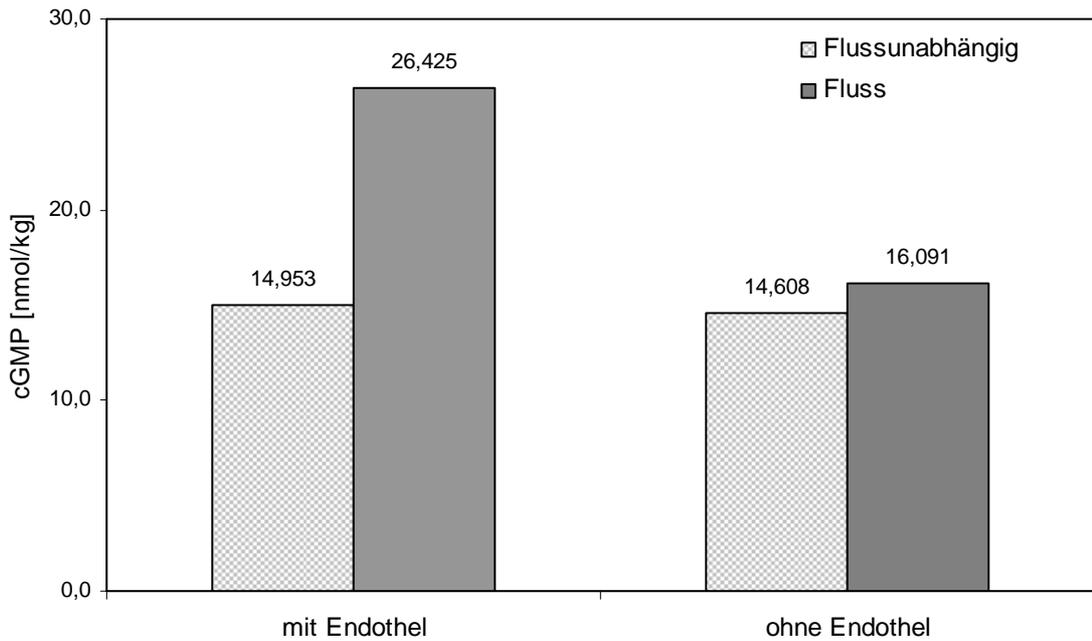


Abb. 16: cGMP-Konzentration der VLDL-Präparate mit und ohne Endothel.

Im Vergleich zum cGMP stieg die cAMP-Konzentration der unbehandelten Präparate lediglich um 17,1% an. Im Mittel fand sich bei gleich bleibendem Fluss eine Konzentration von $147,856 \pm 17,672$ nmol/kg ($n=3$), bei maximaler Flussrate von $173,196 \pm 30,265$ nmol/kg ($n=9$). Die mittlere cAMP-Konzentration von deendothelialisierten Gefäßen betrug $97,386 \pm 12,988$ nmol/kg ($n=3$) bei konstantem Fluss und $106,272 \pm 9,150$ nmol/kg ($n=9$) nach Steigerung des Flusses von gepoolter VLDL-Lösung.

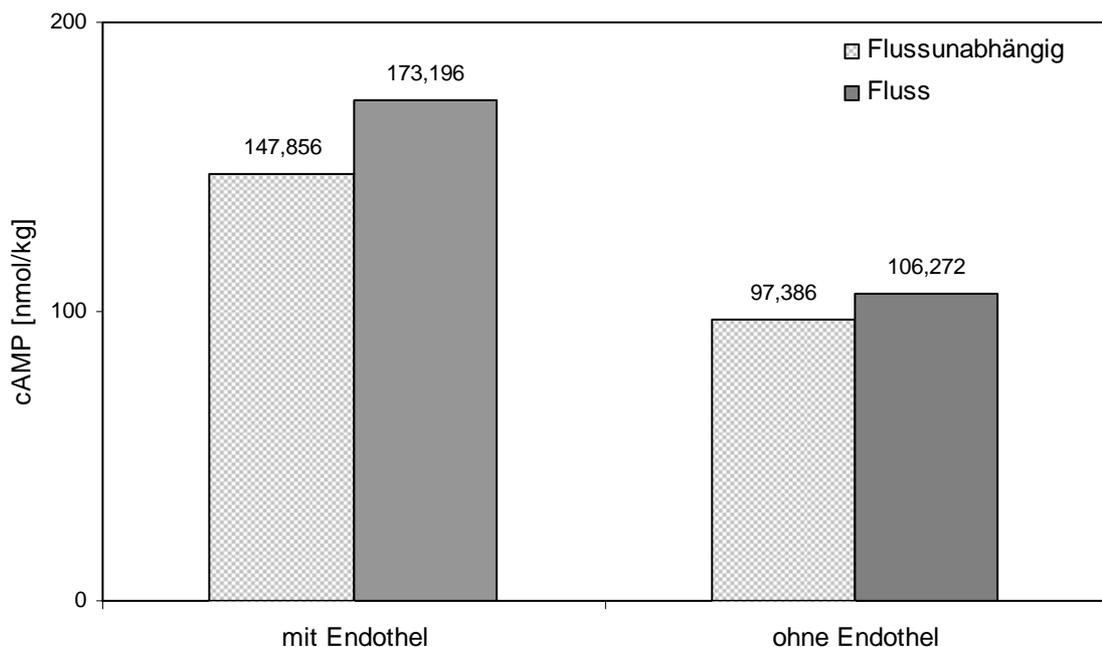


Abb. 17: cAMP-Konzentration der VLDL-Präparate mit und ohne Endothel.

Ergebnisse

Vergleichbar mit den Kontrollpräparaten stieg die cGMP-Konzentration unter maximaler Flussgeschwindigkeit prozentual höher an als die cAMP-Konzentration.

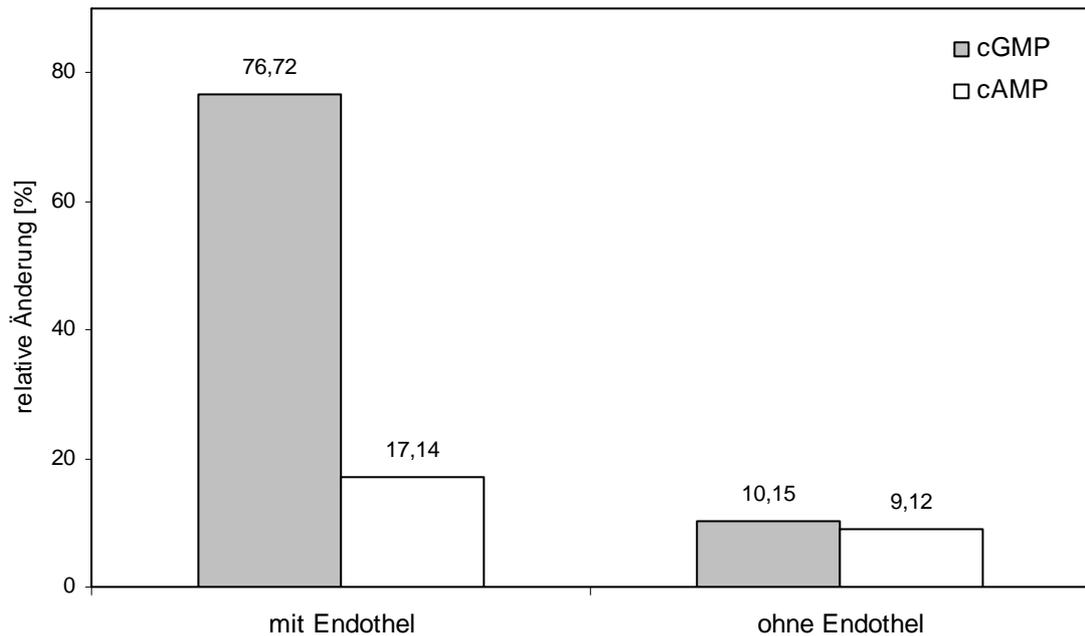


Abb. 18: Prozentuale Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide bei Flusserrhöhung in VLDL-Präparaten mit und ohne Endothel.

3.2.3 Homozygotes Apo E4/E4-VLDL

Bei einem konstanten Fluss von Apo E4/E4-VLDL zeigten die Gefäßabschnitte eine Relaxation (siehe 3.1.3), die jedoch bei hohen Flüssen in eine Kontraktion überging. Entsprechend fand sich an den flussunabhängig gemessenen Präparaten eine höhere cGMP-Konzentration von $23,016 \pm 4,352$ nmol/kg (n=4) gegenüber einer mittleren Konzentration von $19,825 \pm 4,093$ nmol/kg (n=9) der bei einem zuletzt herrschenden Fluss von 100 mL/min gemessenen Präparaten. Dies kommt einem 13,9%igen Abfall von cGMP gleich. Ein wesentlich größerer Abfall der cGMP-Konzentration bei steigender Flussrate fand sich an deendothelialisierten Präparaten. Hier kam es zu einer 46,9%igen Reduktion von $12,464 \pm 3,619$ nmol/kg (n=3) auf $6,614 \pm 1,409$ nmol/kg (n=8) ($p < 0,005$).

Ergebnisse

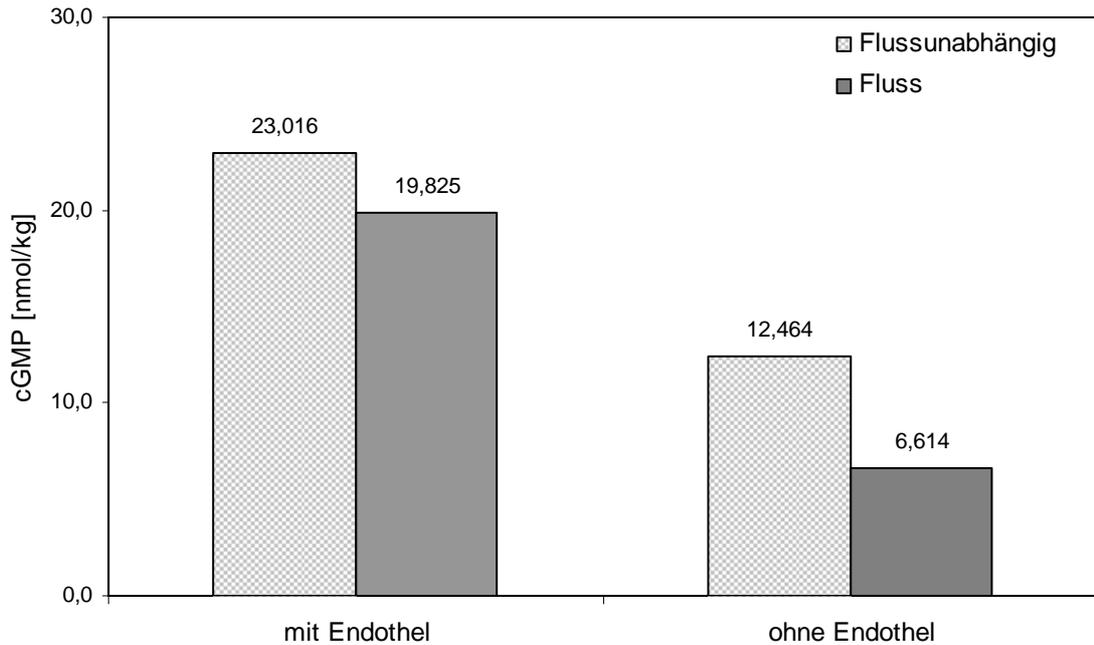


Abb. 19: cGMP-Konzentration der Apo E4/E4-VLDL-Präparate mit und ohne Endothel.

Wie beim cGMP zeigte die Messung der cAMP-Konzentration einen Abfall mit Zunahme der Flussrate. Die Konzentration der Gefäßabschnitte mit intaktem Endothel, die einem gleichbleibenden Fluss von 3 mL/min ausgesetzt waren, lag im Mittel bei $295,766 \pm 111,283$ nmol/kg ($n=3$). Nach Steigerung auf die maximale Flussrate fand sich eine Konzentration von $232,190 \pm 27,875$ nmol/kg cAMP ($n=9$). Dies entspricht einem Abfall um 21,5%. Die gemessenen absoluten cAMP-Konzentrationen von deendothelialisierten Präparaten lagen wesentlich niedriger. So fand sich bei konstantem Fluss eine mittlere Konzentration von $134,593 \pm 28,194$ nmol/kg ($n=3$), bei hohem Fluss von $121,981 \pm 25,477$ nmol/kg ($n=7$). Insgesamt fiel die Konzentration von cAMP dabei um 9,4% ab.

Ergebnisse

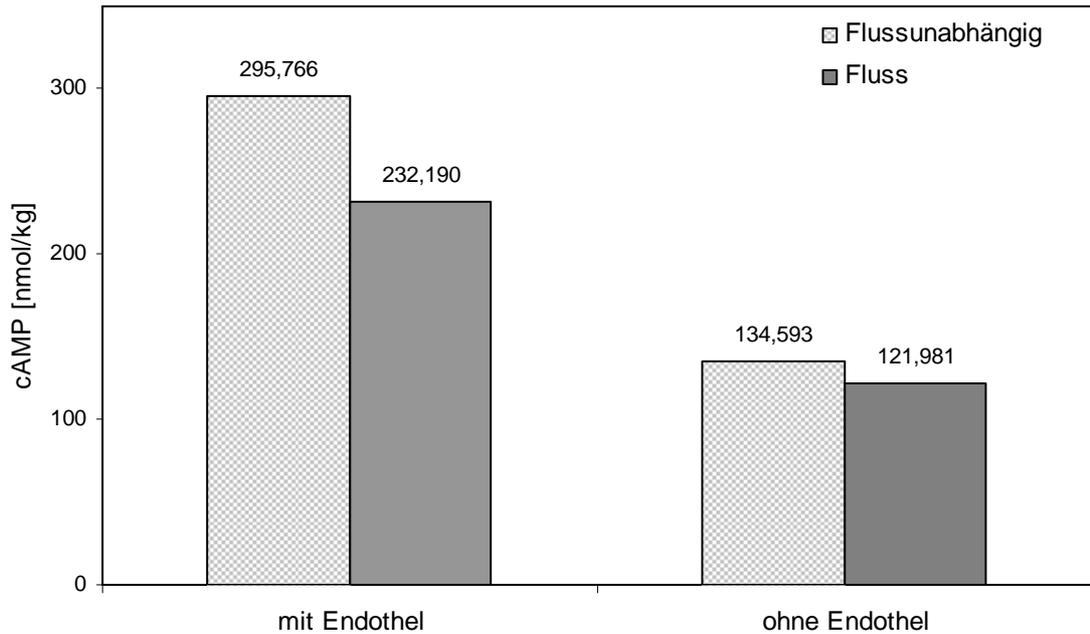


Abb. 20: cAMP-Konzentration der Apo E4/E4-VLDL-Präparate mit und ohne Endothel.

Passend zu der gemessenen Kontraktion der Präparate bei hohen Flüssen zeigte sich sowohl für cGMP als auch für cAMP ein Abfall der Konzentrationen in den glatten Gefäßmuskelzellen. Wie in Abbildung 21 dargestellt, registrierten wir an deendothelialisierten Präparaten einen stärkeren prozentualen Abfall von cGMP und einen geringeren prozentualen Abfall von cAMP im Vergleich zu den Gefäßstreifen mit intakter Endothelschicht.

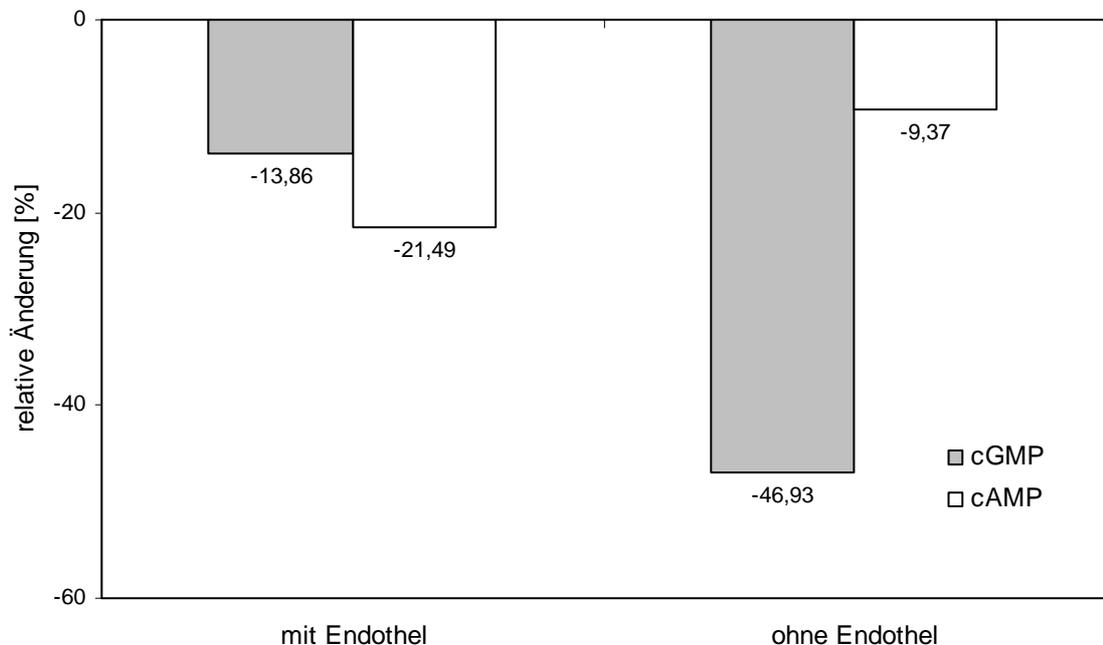


Abb. 21: Prozentuale Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide in Apo E4/E4-VLDL-Präparaten mit und ohne Endothel.

3.2.4 Konzentrationsänderung von cAMP und cGMP in Abhängigkeit von verschiedenen VLDL-Isoformen

Um die mit flussabhängiger Dilatation einhergehende Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide beurteilen zu können, wurde der prozentuale Unterschied zwischen flussunabhängig und flussabhängig gemessenen Präparaten bestimmt. Am stärksten stieg die cGMP-Konzentration in den Gefäßmuskelzellen der Kontrollpräparate mit intaktem Endothel. Hier zeigte sich mit einer fast 100%igen Zunahme ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$), während in den deendothelialisierten Präparaten der Unterschied lediglich 50% betrug. Verglichen mit den Kontrollen fand sich in den VLDL-Präparaten ein geringerer cGMP-Anstieg von ca. 77% ($p = 0,08$). In deendothelialisierten Präparaten änderte sich bei Flusserhöhung der cGMP-Spiegel kaum, es resultierte lediglich ein Anstieg um 10%. Im Gegensatz zu den Kontrollen und den gepoolten VLDL-Präparaten zeigten die E4/E4-Präparate eine stärkere Änderung der cGMP-Konzentration nach Entfernung des Endothels. Hier lag der cGMP-Spiegel nach Flusserhöhung statistisch signifikant ($p < 0,005$) um 47% unter dem der flussunabhängig gemessenen Präparate, während der Abfall in den Präparaten mit intaktem Endothel nur 14% betrug (Abb. 22).

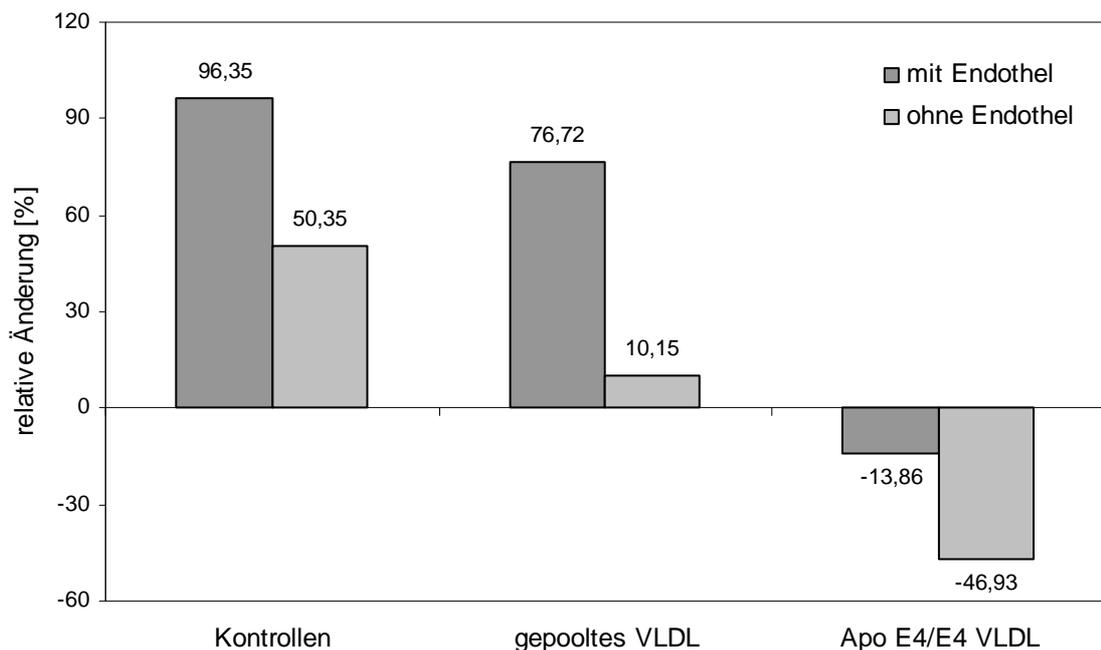


Abb. 22: Prozentuale Änderung der cGMP-Konzentration bei maximaler Steigerung des Flusses von gepoolter bzw. Apo E4/E4-VLDL-Lösung, verglichen mit den Kontrollpräparaten.

Ein Vergleich der basalen Konzentration von cGMP (Konzentration der flussunabhängig gemessenen Präparate) offenbart eine signifikant höhere cGMP-Konzentration der VLDL- und Apo E4/E4-VLDL-Präparate mit intaktem Endothel gegenüber den Kontrollen ($p < 0,0001$). Deendothelialisierte Kontrollpräparate zeigten einen signifikant niedrigeren cGMP-Spiegel gegenüber

Ergebnisse

den mit gepoolter VLDL-Lösung getesteten Präparaten ($p < 0,01$) und Apo E4/E4-Präparaten ($p < 0,001$) (Abb. 23).

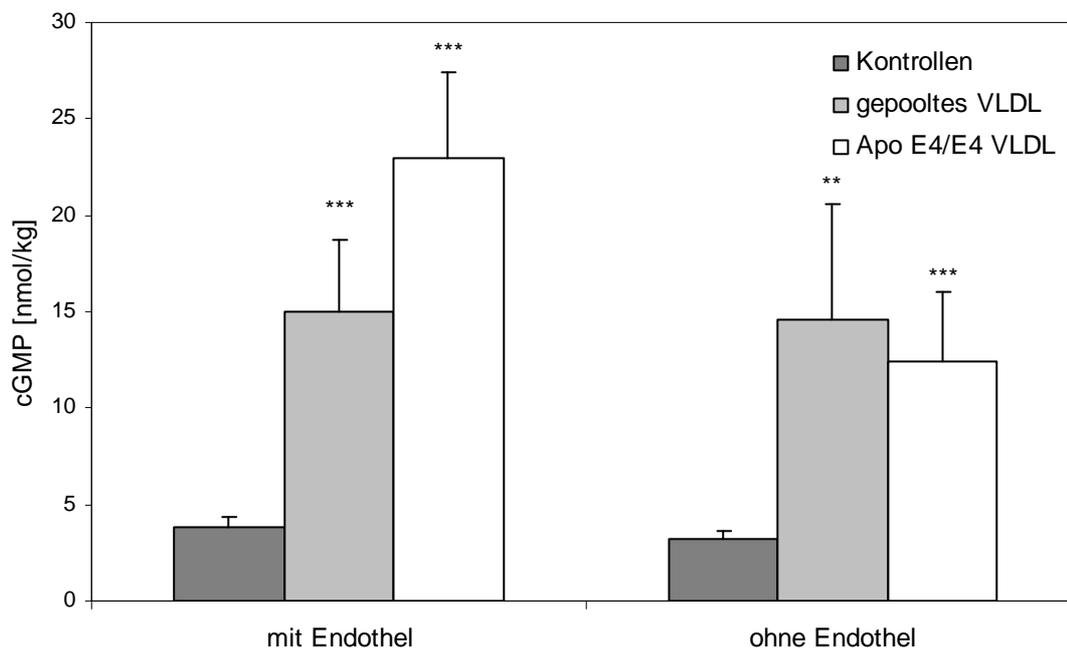


Abb. 23: Vergleich der basalen cGMP-Konzentrationen von Kontrollen, sowie von Präparaten in gepooltem VLDL und Apo E4/E4-VLDL mit und ohne Endothel \pm SEM. Signifikanz $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Betrachtet man die relative Änderung der cAMP-Konzentration der Präparategruppen, so fällt eine insgesamt geringere Zu- bzw. Abnahme verglichen mit der cGMP-Konzentration auf. Wie in Abbildung 24 dargestellt, betrug die maximale Änderung von cAMP ca. 32% in den unbehandelten Kontrollpräparaten. Nach Entfernung des Endothels fand sich eine Steigerung um 22%. Sowohl in den VLDL-Präparaten mit intaktem Endothel als auch in den deendothelialisierten Präparaten zeigte sich nur eine geringe Zunahme von cAMP. Im Gegensatz zum cGMP-Abfall der Apo E4/E4-Präparate, fiel die cAMP-Konzentration stärker an den Präparaten mit intaktem Endothel: Abfall um 22% versus 9% in den deendothelialisierten Präparaten.

Ergebnisse

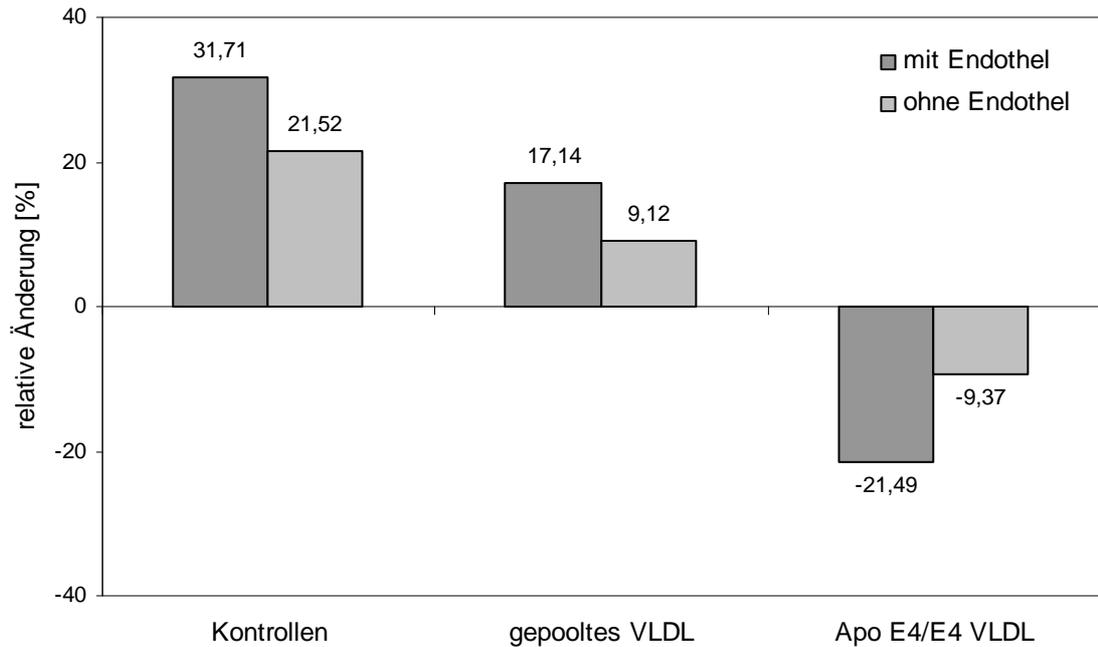


Abb. 24: Prozentuale Änderung der cAMP-Konzentration bei maximaler Steigerung des Flusses von gepoolter bzw. Apo E4/E4-VLDL-Lösung, verglichen mit den Kontrollpräparaten.

Ein Vergleich der basalen cAMP-Spiegel zeigt kein deutliches Bild einer höheren oder niedrigeren Konzentration der Kontrollen gegenüber den VLDL- bzw. Apo E4/E4-VLDL-Präparaten.

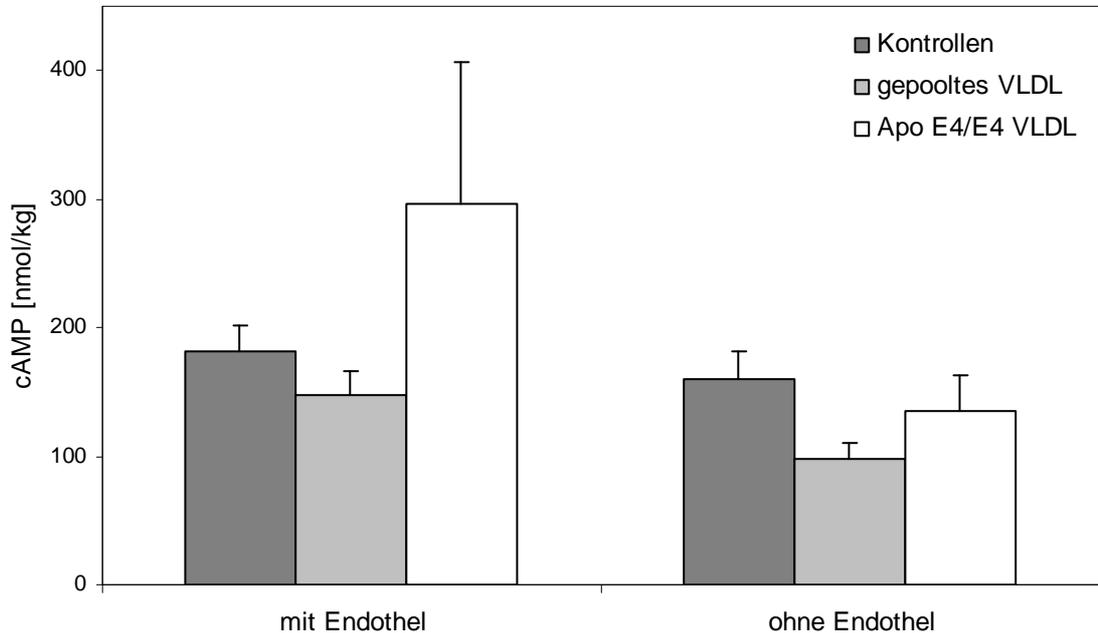


Abb. 25: Vergleich der basalen cAMP-Konzentrationen von Kontrollen, sowie von Präparaten in gepooltem VLDL und Apo E4/E4-VLDL mit und ohne Endothel \pm SEM.

3.3 Darstellung des Gesamtmodells

3.3.1 Flussabhängige Dilatation in Abhängigkeit von verschiedenen VLDL-Isoformen

Einen Überblick über den Einfluss der verschiedenen VLDL-Isoformen auf die Tonusentwicklung und die Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide gibt Tabelle 2. Bei einer isolierten Betrachtung der Präparate mit und ohne Endothel wird eine von der VLDL-Isoform abhängige Einschränkung der Relaxation deutlich.

Die Kontrollpräparate mit Endothel weisen die stärkste flussabhängige Relaxation von 16% auf, die mit dem größten Anstieg intrazellulärer Botenstoffe einhergeht. Demgegenüber steht ein 9%iger Nettokraftverlust der gepoolten VLDL-Präparate. Die Registrierung einer geringeren Relaxation konnte in den Messungen der Änderung der Konzentration zyklischer Nukleotide bestätigt werden. Der Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration der Kontrollen betrug 96%, in den VLDL-Präparaten stieg die Konzentration um 76%, folglich war der Anstieg um 20% eingeschränkt. Zusätzlich fand sich ein stark eingeschränkter Anstieg der cAMP-Konzentration. Während diese flussabhängig in den Kontrollen um 32% anstieg, maßen wir in den gepoolten VLDL-Präparaten eine Zunahme um nur 17%. Somit ist der Anstieg der cAMP-Konzentration um fast die Hälfte reduziert (46%). Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, zeigten die Präparate unter homozygotem Apo E4/E4 eine Kontraktion. Im Einklang mit der mechanischen Registrierung und der Depolarisation der Gefäßmuskulatur konnte nicht nur kein Anstieg, sondern sogar ein Abfall der zyklischen Nukleotide gemessen werden. Dabei nahm im Mittel die cGMP-Konzentration weniger stark ab als die cAMP-Konzentration.

In der Gruppe der deendothelialisierten Präparate zeigten die Kontrollen ebenfalls die stärkste Relaxation in den mechanischen und biochemischen Messungen. Auch nach Entfernung des Endothels relaxierten die Gefäßabschnitte unter Fluss von gepooltem VLDL weniger als die Kontrollen, wie sowohl die Tonusentwicklung als auch die Änderung der Nukleotidkonzentration zeigen (siehe Tabelle 2). Verglichen mit den Kontrollen, maßen wir einen um 80% eingeschränkten Anstieg von cGMP in den gepoolten VLDL-Präparaten. Der cAMP-Anstieg war, wie in den Präparaten mit intaktem Endothel, um die Hälfte reduziert. Die Gesamttonuszunahme von 5% der Apo E4/E4-Präparate ging mit einer 50%igen Reduktion der intrazellulären cGMP-Konzentration einher, während die cAMP-Konzentration nur um 10% abfiel.

Tab. 2 Übersicht der absoluten und relativen Tonusänderung, Änderung der Nukleotidkonzentration und des Verhältnisses der zyklischen Nukleotide zueinander.

		Nukleotidkonzentration [nmol/kg]		Änderung der Nukleotidkonzentration		Tonusänderung	Verhältnis
		Flussunabhängig	Flussabhängig	[nmol/kg]	[%]	[%]	$\frac{\text{rel } \Delta\text{cAMP}}{\text{rel } \Delta\text{cGMP}}$
mit Endothel							
Krebstlösung	cGMP	3,836	7,532	3,696	96,3	-16,1	0,329
	cAMP	182,090	239,830	57,740	31,7		
Gepooltes VLDL	cGMP	14,953	26,425	11,472	76,7	-9,0	0,223
	cAMP	147,856	173,196	25,340	17,1		
Apo E4/E4-VLDL	cGMP	23,016	19,825	-3,191	-13,9	13,0	1,551
	cAMP	295,766	232,190	-63,576	-21,5		
ohne Endothel							
Krebstlösung	cGMP	3,221	4,842	1,622	50,3	-7,9	0,427
	cAMP	159,819	194,213	34,394	21,5		
Gepooltes VLDL	cGMP	14,608	16,091	1,483	10,2	-5,7	0,898
	cAMP	97,386	106,272	8,885	9,1		
Apo E4/E4-VLDL	cGMP	12,464	6,614	-5,850	-46,9	5,0	0,200
	cAMP	134,593	121,981	-12,613	-9,4		

Ergebnisse

In der letzten Spalte der Tabelle wird das Verhältnis der zyklischen Nukleotide zueinander aufgeführt. Das Verhältnis wurde aus der relativen flussabhängigen Änderung der cAMP-Konzentration zur Änderung der cGMP-Konzentration gebildet. Das cAMP/cGMP-Verhältnis der Kontrollen und VLDL-Präparate nimmt nach Entfernung des Endothels zu. Dies ist hauptsächlich auf eine geringere flussabhängige Zunahme der cGMP-Konzentration an deendothelialisierten Präparaten zurückzuführen. Wie beschrieben zeigten die Apo E4/E4-Präparate eine Abnahme der Konzentration der zyklischen Nukleotide. Bildet man das Verhältnis von cAMP zu cGMP, zeigt sich im Gegensatz zu den anderen Präparaten eine Abnahme, von 1,551 auf 0,200. Nach Entfernung des Endothels konnte hier eine stärkere Änderung der cGMP-Konzentration beobachtet werden.

Ein Vergleich von Kontrollen und VLDL-Präparaten mit Endothel zeigt, dass das Verhältnis durch VLDL nicht wesentlich beeinflusst wird. An deendothelialisierten Präparaten hingegen ist der Quotient der VLDL-Präparate wesentlich größer. Dies ist am ehesten auf die geringere Änderung der cGMP-Konzentration zurückzuführen. Das Apo E4/E4-VLDL scheint jedoch einen größeren Einfluss auf die Signalübertragung zu haben.

3.3.2 Korrelation der Konzentration zyklischer Nukleotide mit Tonusänderungen der glatten Gefäßmuskulatur

In den vorgestellten Versuchsreihen wurde die flussabhängige Konzentrationsänderung der sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP und des Tonus der Koronararterien gemessen, welche in einem Diagramm gegeneinander angetragen werden können (Abb. 26). Aufgrund der unterschiedlichen Freisetzung von zyklischen Nukleotiden in Arterienstreifen mit und ohne Endothel werden diese Gruppen getrennt dargestellt.

Die Kurve der Präparate mit intaktem Endothel zeigt einen sigmoiden Verlauf der Konzentrationsänderung von cGMP. Bei einer Tonusabnahme von 0,055 bis 0,090 g zeigt sich eine Linearität des Kurvenverlaufs. In diesem Bereich geht eine starke Änderung der cGMP-Konzentration mit einer relativ geringen Tonusänderung einher. Der Kopplungskoeffizient kann mit 8%/10mg angegeben werden. Nimmt die cGMP-Konzentration um mehr als 85% zu, resultiert eine geringe weitere Zunahme der Konzentration in einer starken Tonusabnahme der Gefäßmuskulatur. Betrachtet man das Verhalten der cGMP-Konzentration unter Kontraktion der glatten Muskulatur, so wird deutlich, dass die Kontraktion zwar mit einer geringen Abnahme des cGMP einhergeht, jedoch nicht wesentlich durch diese beeinflusst wird. Ab einer Nettokraftzunahme von 100 mg

Ergebnisse

nimmt die cGMP-Konzentration nicht erheblich mehr ab. Im Gegensatz zum cGMP ist die gesamte cAMP-Kurve nahezu linear und verläuft flacher. Beispielsweise geht eine Tonusabnahme von 100 mg mit einer 63%igen cGMP-, jedoch nur einer 14%igen cAMP-Zunahme einher.

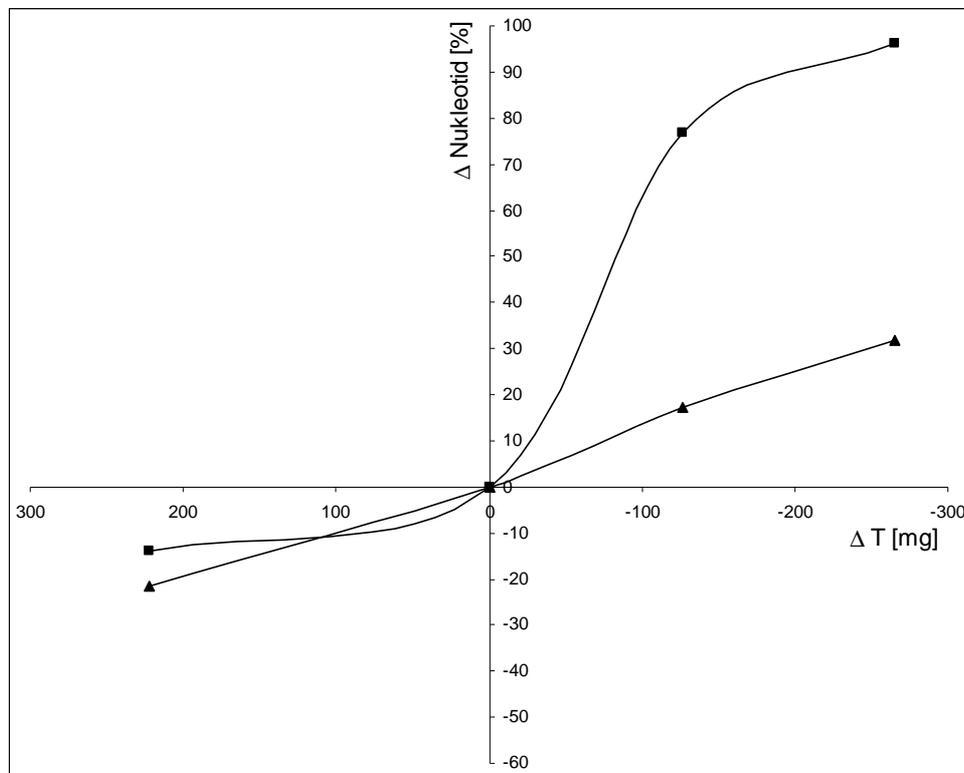


Abb. 26: Korrelation der flussabhängigen Konzentrationsänderung zyklischer Nucleotide (■ cGMP und ▲ cAMP) mit der Tonusänderung von Präparaten mit Endothel.

In Abbildung 27 sind die Kurven für die deendothelialisierten Präparate dargestellt. Der Verlauf der cGMP-Kurve unterscheidet sich im Bereich der Relaxation nicht wesentlich von dem der Präparate mit Endothel. Unter Tonuszunahme verläuft die Kurve jedoch steiler, folglich geht eine Kontraktion mit einer größeren Abnahme der cGMP-Konzentration einher. Bei einer Tonusänderung zwischen -100 und +100 mg ist die Tonusänderung linear proportional zur Änderung der cAMP-Konzentration. Bei weiterer Relaxation ändert sich der Verlauf der Kurve, es ist eine exponentielle Zunahme zu vermuten. Der an Präparaten mit intaktem Endothel gemessene große Unterschied zwischen der cGMP- und cAMP-Konzentrationsänderung bei einer Tonusabnahme von 100 mg ist nach Entfernung des Endothels aufgehoben. Hier zeigt sich eine fast gleich starke Konzentrationsänderung der beiden zyklischen Nucleotide.

Ergebnisse

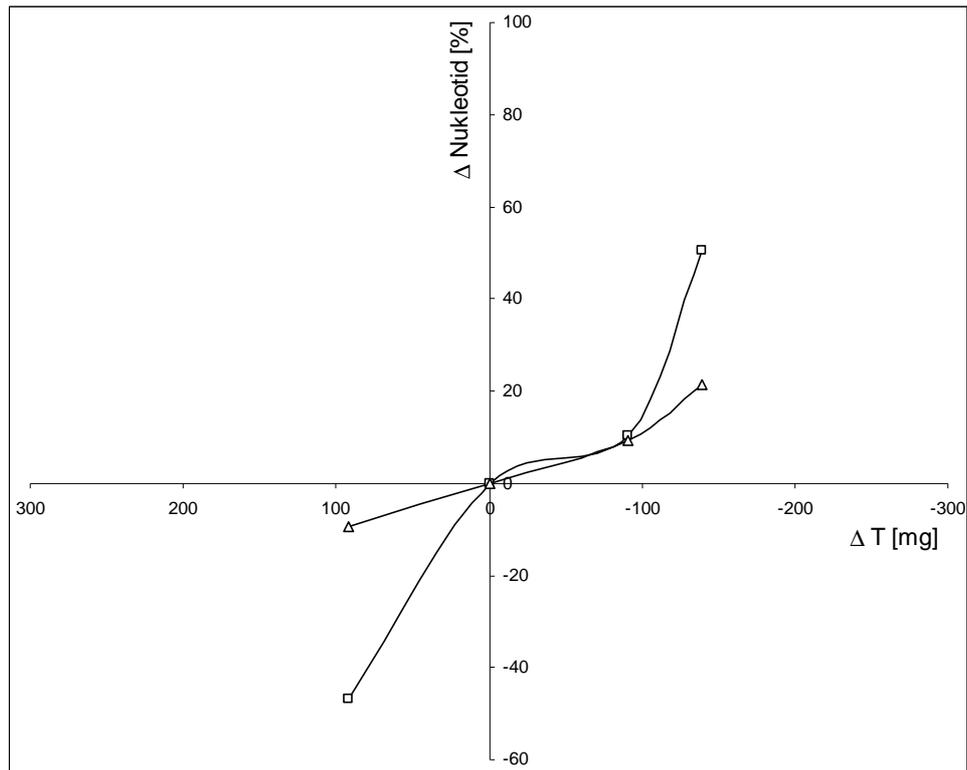


Abb. 27: Korrelation der flussabhängigen Konzentrationsänderung zyklischer Nucleotide (\square cGMP und Δ cAMP) mit der Tonusänderung von Präparaten ohne Endothel.

3.3.3 Stationäre Aktivierungskurve

In den bereits geschilderten Versuchsreihen wurden Membranpotentiale bei unterschiedlichem Tonus der Koronararterien gemessen, die gegeneinander angetragen werden können. Die Gesamtheit dieser Werte wurde als stationäre Aktivierungskurve in Abb. 28 dargestellt. Der nahezu lineare Verlauf der Kurve spricht für eine konstante elektromechanische Kopplung, die hier mit einem Kopplungskoeffizienten von 0,116 g/mV angegeben werden kann.

Ergebnisse

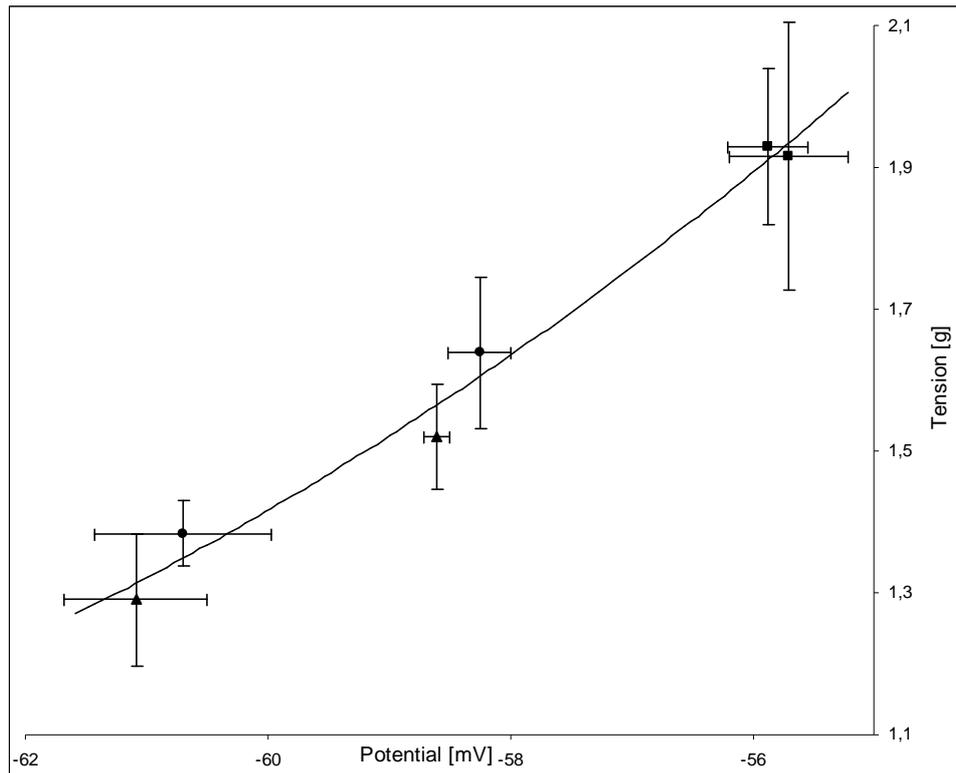


Abb. 28: Stationäre Aktivierungskurve der glatten Muskelzellen von Koronararterien des Menschen. Werte aus Kontrollpräparaten in Krebslösung (●), Präparaten in gepooltem VLDL (▲) und Präparaten in Apo E4/E4-VLDL (■).

4. Diskussion

4.1 Wirkung von VLDL auf die flussabhängige Dilatation

Endothelzellen sind kontinuierlich den zirkulierenden sowie den bereits subendothelial akkumulierten Lipoproteinen ausgesetzt. Die Beziehung der Lipoproteinklassen zur Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen ist wissenschaftlich fundiert und gab Anstoß zur weiteren Untersuchung der Interaktion von Lipoproteinen mit Endothelzellen. Die Wechselwirkung ist von besonderem Interesse, da schon vor der Entwicklung von Atheromen eine Änderung der endothelialen Funktion beobachtet werden konnte, diese also in der frühen Entstehung von Atherosklerose relevant sein könnte. Viele dieser Veränderungen gehen auf eine adäquate Reaktion des Endothels auf Verletzungen zurück, die eine Verlagerung des Gleichgewichts endothelabhängiger Vasodilatation und Vasokonstriktion beinhaltet. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung der Wirkung von physiologischen Konzentrationen von VLDL auf die, im Wesentlichen durch eine intakte Endothelschicht beeinflusste, flussabhängige Dilatation von Arterien.

4.1.1 Auswirkung auf die Tonusentwicklung

Zahlreiche Studien haben sich mit der Rolle von Triglyzeriden in der Pathogenese der Atherosklerose beschäftigt. Dabei zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Hypertriglyzeridämie und Atherosklerose bzw. der zugrunde liegenden Pathologie der endothelialen Dysfunktion und herabgesetzter flussabhängiger Dilatation [6, 76]. Möchte man einen Vergleich mit dem weitaus bekannteren Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen, der Hypercholesterinämie anstellen, trifft man auf eine unter Experten gängige Meinung. Hiernach induzieren LDLs vor allem Änderungen in der Permeabilität der Endothelzellen, der Zelladhäsion und der Sekretion der vasorelaxierenden Substanzen NO und PGI₂ [4], während VLDLs hauptsächlich das fibrinolytische System durch Steigerung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI-1) [8] beeinflussen.

Lewis et al. [59] konnten 1997 jedoch zeigen, dass die Inhibition der endothel- bzw. NO-abhängigen Dilatation nicht spezifisch für LDL ist, sondern auch durch VLDL hervorgerufen werden kann. Dieser Effekt konnte indes unter pathologisch erhöhten Serumspiegeln gemessen werden. Auch Doi et al. [26] untersuchten den Effekt einer Hypertriglyzeridämie auf die endothelabhängige Dilatation, fanden jedoch keine Beeinträchtigung der Vasorelaxation durch VLDL, sondern allein durch Remnants der Lipoproteine. Durch intrakoronare Messung des Gefäßdurchmessers und der Flussgeschwindigkeit fanden Kugiyama et al. [51] eine Korrelation von

Diskussion

VLDL-Remnants mit herabgesetzter endothelabhängiger Vasorelaxation unabhängig von anderen koronaren Risikofaktoren. Im Gegensatz zu den eben genannten Veröffentlichungen wurde in dieser Arbeit der Effekt noch physiologischer VLDL-Konzentrationen (30 mg/dL) auf die Dilatation von Koronararterien des Menschen untersucht. Um einen unverfälschten Eindruck der Wirkung von VLDL zu erhalten wurde auf die, in den zitierten Studien praktizierte, vorherige Kontraktion der Gefäßabschnitte mit tonussteigernden Substanzen (Kaliumchlorid, Phenylephrine, Noradrenalin) verzichtet, da hierdurch bereits Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Zur Erzeugung eines Ausgangstonus nutzten wir die physiologische Reaktion der Gefäße auf mechanische Dehnung, die dem Blutdruck entsprach. Somit konnte eine pharmakologische Beeinflussung der Signaltransduktion konsequent vermieden werden. Ein weiterer Unterschied bestand in der Erfassung der Reaktion auf verschiedene Flussgeschwindigkeiten.

In der Literatur wird eine Abnahme der endothelabhängigen Relaxation unter hoher Triglyzeridkonzentration beschrieben [118]. Diese wurde in der Regel unter Verwendung von verschiedenen, endothelabhängigen Relaxantien (Acetylcholin) getestet und gegenüber einer endothelunabhängigen Relaxation, hervorgerufen durch NO, abgegrenzt [58]. Die Reaktion der Gefäßmuskulatur wurde dabei größtenteils *in vivo* durch intraarterielle Applikation der Substanzen am Unterarm, oder im Tiermodell [111], getestet. Die begrenzte Aussagekraft der Messungen *in vivo* liegt hier sicherlich in der weniger exakten Bestimmung der Tonusentwicklung der glatten Muskulatur, während Ergebnisse der Tierversuche nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Die Verwendung von explantierten humanen Koronararterien ist den Messungen *in vivo* durch die direkte Registrierung der Kraftentwicklung überlegen. Verglichen mit Versuchen, in denen Tierarterien Verwendung fanden, kann eine Aussage von hoher klinischer Relevanz getroffen werden. Hinzu kommt, dass die Gefäße vom Menschen kontinuierlich den zirkulierenden Lipoproteinen ausgesetzt waren und vermutlich den Zustand lebenslanger intrazellulärer und subintimaler Lipidakkumulation widerspiegeln.

Unter Applikation von physiologischen VLDL-Konzentrationen zeigten die Koronararterien eine eingeschränkte flussabhängige Dilatation. Diese war vor allem bei niedrigen Flussgeschwindigkeiten von 5-20 mL/min deutlich herabgesetzt. Wie der Vergleich mit Experimenten an Gefäßabschnitten ohne Endothel zeigt, ist die Einschränkung der flussabhängigen Dilatation hauptsächlich endothelabhängig. Es konnte kein signifikanter Unterschied der flussabhängigen Dilatation unter Krebslösung und VLDL an deendothelialisierten Präparaten gemessen werden. Diese Feststellung deckt sich mit Studien, in denen eine herabgesetzte flussabhängige Dilatation der

Arteria brachialis nach postprandial erhöhten VLDL-Konzentrationen gezeigt wurde [3, 79, 115]. Auch nach Applikation von triglyzeridreicher Lipidinfusion konnte eine Einschränkung der flussabhängigen Dilatation (FDD) gesehen werden [61]. Gudmundsson et al. [34] konnten in einer ähnlich konzipierten Studie jedoch keinen Einfluss einer transienten postprandialen Hypertriglyzeridämie auf die FDD finden. Die Messungen *in vivo* erlauben allein keine Aussage über die Einschränkung bei einzelnen Flussgeschwindigkeiten, da hier nur eine einmalige, einfache Änderung der Flussgeschwindigkeit mittels Stauung und anschließendem Öffnen der angelegten Manschette stattfand. Zudem wurde der Blutfluss durch das plötzliche Lösen der Stauung auf nicht physiologische Geschwindigkeiten bis zu 700 mL/min gesteigert [115]. Die im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit mögliche, genaue Regulierung der Flussgeschwindigkeit erlaubt eine differenziertere Aussage über die Einschränkung der flussabhängigen Dilatation.

4.1.2 Auswirkung auf die Freisetzung von sekundären Botenstoffen

Wie bereits erläutert, ist eine der Endothelfunktionen die Regulation des Kontraktionszustandes der angrenzenden glatten Gefäßmuskelzellen. In der Einleitung wird die Rolle der Botenstoffe cGMP und cAMP in der FDD beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Messung der Kraft-Potentialentwicklung der Arterienstreifen durch die nachfolgende Bestimmung dieser Botenstoffe ergänzt. Wie beschrieben, spielen Triglyzeride eine wichtige Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose, wobei die Frage des Beitrags zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion noch nicht ausreichend geklärt ist. Die Messung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide sollte klären, inwieweit VLDLs die intrazelluläre Signalübertragung beeinflussen.

Bei der Bestimmung der cGMP-Konzentration konnten zwei aufschlussreiche Beobachtungen gemacht werden:

1. Die Präparate, die einem konstant niedrigen Fluss von gepooltem VLDL ausgesetzt waren, zeigten einen höheren cGMP-Spiegel als die Kontrollpräparate. Folglich ist eine negative Beeinflussung der basalen Freisetzung von cGMP, bzw. des Vorläufers NO, durch VLDL unwahrscheinlich.
2. Der auf den Flussreiz folgende Anstieg von cGMP fällt, trotz der höheren basalen cGMP-Konzentration, geringer aus. Nach Erhöhung der Flussstärke konnte an Kontrollpräparaten eine fast 100%ige Zunahme der intrazellulären cGMP-Konzentration registriert werden, während diese in den VLDL-Präparaten nur um ca. 75% stieg. Demzufolge scheint die optimale Übersetzung des Flussreizes auf die glatte Muskulatur blockiert zu sein.

Diskussion

Der Effekt von VLDL auf die NO-Produktion der glatten Gefäßmuskulatur wurde von Takahashi et al. [110] untersucht. Es zeigte sich, dass in Interleukin-1 β stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen die NO-Akkumulation durch β -VLDL gesteigert wird. Diese Daten entsprechen der von uns gezeigten, gegenüber den Kontrollen, höheren basalen cGMP-Konzentration der VLDL-Präparate. Die Anreicherung von NO in den Gefäßmuskelzellen wird von Takahashi et al. auf eine erhöhte Expression der löslichen NO-Synthase (iNOS), ein in der Intima und Media von atherosklerotischen Arterien vorkommendes Enzym [10], zurückgeführt. Unter physiologischen Bedingungen wird die NO-Produktion des Gefäßsystems von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) reguliert. Obgleich die Funktion der iNOS in atherosklerotischen Gefäßen noch nicht geklärt ist, weisen Daten sowohl auf eine günstige, als auch auf eine schädliche, Wirkung von NO in atherosklerotischen Prozessen hin. Sata et al. [91] demonstrierten eine biphasische Regulierung der Apoptose durch NO. Niedrige NO-Konzentrationen unterdrücken die Apoptose von Endothelzellen. Hohe Konzentrationen jedoch supprimieren den protektiven Mechanismus und üben einen pro-apoptotischen und zytotoxischen Effekt auf die Zellen aus. Auch Behr-Roussel et al. [9] weisen auf eine Beschleunigung von atherosklerotischer Plaquebildung durch hohe, von der iNOS produzierte, NO-Konzentrationen hin. Die von uns gemessenen, hohen basalen cGMP-Spiegel in normalen Gefäßen könnten somit im Sinne einer bereits unter physiologischen Bedingungen herrschenden pro-atherosklerotischen Wirkung von VLDL interpretiert werden.

Minami et al. [69] analysierten die Wirkung von triglyzeridreichen Lipoproteinen auf die endotheliale NO-Produktion. Sie konnten eine Unterdrückung der Endothelin-3 (ET-3) stimulierten NO-Freisetzung in Endothelzellen durch triglyzeridreiche Lipoproteine, die Probanden nach einer triglyzeridsteigernden Mahlzeit entnommen wurden, zeigen. Dabei inhibierten die Triglyzeride den ET-3-induzierten Kalziumanstieg in Zellkultur. Da die eNOS ein Ca-CAM-abhängiges Enzym ist, implizieren die Daten eine Inhibierung der eNOS durch Triglyzeride mittels eines Absenkens der $[Ca^{2+}]_i$. Die von uns durchgeführten Versuche zeigten jedoch eine erhöhte basale cGMP-Konzentration. Laut Minami et al. könnten die in den VLDL enthaltenen Triglyzeride die eNOS inhibieren, was zu einem herabgesetzten cGMP-Spiegel führen würde. Folglich scheint eine Inhibierung der eNOS durch physiologische VLDL-Konzentrationen unwahrscheinlich.

Eine weitere Erklärung der gesteigerten basalen cGMP-Konzentration könnte in der höheren Viskosität der VLDL-Lösung gegenüber der für die Kontrollversuche benutzten Krebslösung liegen. Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.1.1) beschrieben, ist der am Gefäßendothel angreifende shear-stress proportional zur Viskosität der vorbeiströmenden Flüssigkeit. Folglich tritt bereits

Diskussion

unter gleich bleibendem Fluss ein größerer shear-stress auf, welcher zu einer erhöhten Synthese von NO und cGMP führt. Gegen die These, die höhere Viskosität sei der einzige Auslöser des gesteigerten basalen NO-Spiegels, spricht, dass *in vivo* Messungen, bei denen die Viskosität des vorbeiströmenden Blutes stets annähernd gleich bleibt, einen Einfluss von VLDL bzw. Triglyzeriden auf die NOS-Aktivität zeigten [51].

Untersuchungen zur flussabhängigen NO-Synthese wurden *in vivo* von Kugiyama et al. [52] durchgeführt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Reaktion von epikardialen Koronararterien auf intrakoronare Infusion von L-NMMA, einem Inhibitor der NO-Synthase, mit steigendem Spiegel von VLDL-Remnants abfiel. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Anstieg der VLDL-Remnants mit einer Abnahme der NO-Bioaktivität einhergeht, welche zu einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen Dilatation in humanen Koronararterien führt. Als zugrunde liegender Mechanismus werden dabei in der arteriellen Intima oxidativ modifizierte Remnants vermutet, die zu einer erhöhten Ansprechbarkeit des Endothels für oxidativen Stress führen. Diese Hypothese wird von der, an Patienten mit erhöhten Spiegeln an VLDL-Remnants beobachteten, verbesserten koronaren vasomotorischen Funktion nach Applikation des Antioxidans Vitamin C gestützt [51]. Demzufolge könnte auch für VLDL eine Abnahme der NO-Bioaktivität für die eingeschränkte FDD ursächlich sein. In den hier vorgestellten Versuchen wurde eine Oxidation der Lipoproteine jedoch streng vermieden.

In der Einleitung wird die Rolle von endothelialen Heparansulfat-Proteoglykanen als Flussensoren beschrieben. Siegel et al. [98].konnten zusätzlich zeigen, dass es zu einer Interaktion von HS-PG und Lipoproteinen kommt. Der HS-PG-Rezeptor bindet die Lipoproteine über Domänen in Apolipoproteinen, die reich an basischen Aminosäuren sind. Mithilfe der Ellipsometrie konnte gezeigt werden, dass arteriosklerotische Nanoplaques, die allererste Stufe der arteriosklerotischen Plaquebildung, aus einem Komplex aus Kalzium, Lipoprotein-Partikeln und dem HS-PG-Rezeptor bestehen. Die Bindung von Lipoproteinen an HS-PG führt zu einer Konformationsänderung des Flusssensors, die eine Änderung der Polarisierung des Endothels und der Zellmembranen des glatten Gefäßmuskels nach sich zieht. Für LDL konnte in ellipsometrischen Messungen eine verstärkte Bildung von arteriosklerotischen Nanoplaques gesehen werden. Letztendlich zeigten Präparate die, wie in dieser Arbeit für VLDL beschrieben, einem steigenden Fluss von LDL ausgesetzt waren eine Depolarisation der Zellmembran, eine Vasokonstriktion und einen Abfall des cGMP-Spiegels in Gefäßmuskulatur humaner Koronararterien [100]. Eine Erklärung für die von uns gemessene geringere Vasorelaxation und den auch geringeren flussabhängigen

Anstieg von zyklischen Nukleotiden könnte die Bindung von VLDL an den Flusssensor HS-PG sein. Über Aminosäuresequenzen in Apolipoprotein E kann VLDL an den Flussrezeptor binden und behindert möglicherweise die Signaltransduktion. Unabhängig von einer direkten Wirkung der VLDL auf die NO-Synthase, würde somit die Konzentration der sekundären Botenstoffe durch eine Blockierung des Sensors weniger ansteigen und die flussabhängige Vasodilatation herabgesetzt sein.

Erstmals konnten wir neben der Korrelation der Potential- mit der Tonusentwicklung, der elektromechanischen Kopplung, in glatten Muskelzellen eine Korrelation der flussabhängigen Konzentrationsänderung sekundärer Botenstoffe mit der Tonusänderung darstellen (siehe Abb. 26 und 27). Unter der Annahme, dass einer definierten prozentualen Zunahme der sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP dieselbe Änderung des Kontraktionszustandes folgt, wurden die Kurven aus den erhaltenen Messwerten unterschiedlich behandelte Präparate erstellt. Analog zur Kurve der elektromechanischen Kopplung [97] ergaben sich auch hier sigmoide Kopplungskurven zwischen Tonus und der Konzentration sekundärer Botenstoffe. Dies veranschaulicht, unabhängig vom Angriffspunkt der Lipoproteine in der Signaltransduktion, den Einfluss von VLDL auf den Kontraktionszustand der Gefäße. Die gemessene geringere Konzentrationsänderung der sekundären Botenstoffe unter VLDL resultiert in einer geringeren Vasodilatation.

4.2 Wirkung von Apo E4 auf die flussabhängige Dilatation

Studien über die molekulare Struktur und biologische Aktivität von Apo E liefern Hinweise auf die funktionellen Unterschiede der Apo E-Isoformen. Der Austausch einer einzigen Aminosäure im Apo E verändert die gesamte Konformation des Moleküls. Speziell Apo E4-Arginin 61 scheint so ausgerichtet zu sein, dass es eine Interaktion mit dem Carboxylterminus der Glutaminsäure 255 vermittelt. Wahrscheinlich führt dies zu einer einzigartigen Interaktion der Domänen, der einmaligen Konformation und den einzigartigen Funktionen, die Apo E4 von Apo E3 und Apo E2 unterscheidet. Diese strukturelle Abweichung beeinflusst den Lipoproteinmetabolismus und führt zu tief greifenden Veränderungen des isoformspezifischen Effekts von Apo E im kardiovaskulären und Nervensystem. Daraus begründet sich nicht nur die signifikante Assoziation von Apo E4 mit der Alzheimer-Demenz (AD), sondern auch die in umfassenden Studien festgestellte Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen. Bisher ist der Mechanismus über den Apo E4 zur Entwicklung der AD und kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt weitgehend ungeklärt. Ein gemeinsamer Faktor in der Pathogenese der beiden Erkrankungen könnte die pathologische Veränderung von Gefäßen in der jeweiligen Region sein. Hierbei fällt vor allem den athe-

rosklerotischen Ablagerungen sowie dessen Vorläufer, der herabgesetzten flussabhängigen Dilatation, eine bedeutende Rolle zu. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Apo E4-haltigem VLDL auf die flussabhängige Dilatation untersucht.

4.2.1 Apo E4 und vaskuläre Pathologie

Eine Hypothese zur Pathogenese der Alzheimer-Demenz erklärt die Entstehung mit vaskulären Veränderungen. Da die AD ursprünglich von der vaskulären Demenz abgegrenzt wurde, wird dies jedoch kontrovers diskutiert. Die vaskuläre Hypothese der Alzheimer-Demenz gründet sich auf epidemiologische und biologische Evidenzen, nach denen die Alzheimer-Demenz und das Krankheitsbild der Atherosklerose/KHK die gleichen Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Apo E4-Genotyp teilen [102]. Diese Risikofaktoren bedingen in Kombination mit der voranschreitenden Gefäßalterung das Unterschreiten eines kritischen Schwellenwertes der zerebralen Gewebepfusion („critically attained threshold of cerebral hypoperfusion“, CATCH), in deren Folge es zu irreversiblen Funktionsausfällen des unterversorgten Gewebes kommt [23]. CATCH initiiert nach diesem Modell einen progressiven Strukturumbau und Degenerationsprozess von Hirnkapillaren. Eine entsprechende mikrovaskuläre Pathologie mit luminaler Verformung und Gefäßwandverdickung sind für Alzheimer-Patienten beschrieben worden [15, 46]. Laut de la Torre et al. [24]. gehen die vaskulären Veränderungen mit einer Störung der endothelialen NO-Homöostase einher, hierauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Arterienstreifen, die homozygotem Apo E4/E4-VLDL ausgesetzt waren, mit steigendem Fluss kontrahieren und das Membranpotential depolarisiert. Sowohl gegenüber Kontrollpräparaten, als auch gepoolten, d. h. mit unterschiedlichen Apo E-Isoformen besetzten, VLDL-Präparaten konnte ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Die Vasorelaxation auf Flussreiz wurde von physiologischen Konzentrationen Apo E4/E4-VLDL nicht nur eingeschränkt, sondern komplett unterbunden. Die kurzzeitige Tonusabnahme bei geringem Fluss von 5 mL/min ist wahrscheinlich auf ein zu kurzes Einwirken der Lösung zurückzuführen, in der diese noch nicht an die Rezeptoren bzw. die Membran diffundiert ist. Insgesamt wurde eine kontrahierende Wirkung von Apo E4/E4-VLDL auf die glatte Muskulatur von Arterien nachgewiesen. Wie in vielen Studien gezeigt wurde, trägt die Einschränkung der flussabhängigen Dilatation eindeutig zur Entstehung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen bei bzw. geht der Ausbildung von makroskopisch sichtbaren Läsionen voraus [20]. Folglich liefern unsere Daten einen weiteren Hinweis für die Assoziation von Apo E4 mit der Athe-

rosklerose. Es kann jedoch keine Aussage über die Einschränkung der FDD von Apo E4-Trägern *in vivo* gemacht werden. Dennoch implizieren die Ergebnisse, dass die Abnahme der FDD unter Apo E4 ein weiterer Mechanismus der Apo E4-induzierten Atheroskleroseentstehung ist. Inwieweit dieser Prozess an Gehirnarterien abläuft und ob dies zur Pathogenese der AD beiträgt ist auf der Grundlage dieser Daten nur schwer abzuschätzen.

Die Annahme, dass Apo E4 über eine negative Beeinflussung der FDD die Entstehung bzw. das Voranschreiten einer AD begünstigt, wird von Untersuchungen des Blutflusses und Metabolismus im Gehirn von AD-Patienten und Apo E4-Trägern gestützt. Untersuchungen mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) an Alzheimer-Patienten zeigten einen herabgesetzten Metabolismus und Blutfluss im parietalen und temporalen Cortex [88]. Parallel dazu konnte an Apo E4-Trägern eine Hypoperfusion in denselben Hirnarealen gemessen werden [86]. Scarmeas et al. [93] bewiesen, dass bereits in jungen Jahren eine Apo E-abhängige Regulierung des zerebralen Blutflusses besteht. Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass der Besitz eines Apo E4-Allels nicht gleichbedeutend mit der Entwicklung einer frühen AD ist. So wird ein signifikanter Anteil der Apo E4-heterozygoten Individuen in ihrem Leben keine AD entwickeln. Es wird diskutiert, dass Apo E4 das Entstehen einer AD fördert anstatt sie zu verursachen [68]. In der Rotterdam-Studie, einer großen prospektiven Kohortenstudie, wurde die Assoziation von Apo E, Alzheimer-Demenz und Atherosklerose untersucht. Die Untersuchungsergebnisse deuten auf eine Interaktion hin, die in einer steigenden Prävalenz von AD und Atherosklerose bei Apo E4-Trägern besteht [39, 102]. Die Erkenntnisse einer Studie von Prince et al. [83] weisen darauf hin, dass Apo E4 das Risiko einer AD unabhängig vom Effekt auf den Lipidmetabolismus und die Atherogenese steigert.

Folglich besteht laut gängiger Expertenmeinung ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Apolipoprotein E4 und dem Risiko einer Atheroskleroseentstehung, sowie der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz. Es existieren bisher jedoch nicht ausreichend Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob Apo E4 die beiden Prozesse über ein zumindest teilweise identisches Eingreifen in Stoffwechselprozesse und Gefäßstrukturen beeinflusst.

4.2.2 Apo E4 und NO-Produktion

McCarty et al. [65] befassten sich mit der Fragestellung, ob eine effiziente zerebrovaskuläre NO-Produktion protektiv auf die Entstehung einer AD wirken kann. Von zerebrovaskulären Endothelzellen produziertes NO hat das Potential, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass das

Diskussion

Gefäßendothel, aufgrund des disproportional großen Sauerstoffbedarfs der Gehirnzellen, ein im Gehirn vielfach vorkommendes Gewebe ist, einen generellen Einfluss auf die Gehirnfunktion auszuüben. Dabei wirkt NO einerseits direkt auf die Gehirnzellen und andererseits fördert es die effiziente Durchblutung durch NO-vermittelte Vasodilatation. So konnte gezeigt werden, dass der Nitratspiegel im Liquor von AD-Patienten signifikant niedriger ist, was als Hinweis auf eine geringere zerebrale NO-Produktion gedeutet wurde [53]. In postmortalen Untersuchungen des temporalen Kortex von AD-Patienten wurde eine um 50% reduzierte Konzentration der löslichen Guanylatzyklase gefunden [13]. Interessanterweise konnte *in vitro* ein zytotoxischer Effekt von β -Amyloid auf Endothelzellen nachgewiesen werden, der auf eine stimulierte Superoxid-Produktion zurückzuführen ist, welches spontan mit NO reagiert, folglich den NO-Spiegel reduziert [104]. Diese Erkenntnisse bewogen Stamler et al. [104] zu der Frage, ob ein Defizit an endotheliale NO zum klinischen Syndrom der AD beiträgt. Die Pathogenese der AD zieht daher möglicherweise die Suppression der vaskulären NO-Produktion nach sich.

De la Torre et al. [24] postulieren hingegen, dass eine verminderte NO-Produktion durch die eNOS in Gehirngefäßen von AD-Patienten ursächlich an der Pathogenese beteiligt ist. Wird durch das Zusammenspiel von Gefäßalterung und vaskulären Risikofaktoren der kritische Schwellenwert der Gewebepfusion chronisch unterschritten, prädisponiert dieser Zustand zu kapillären Veränderungen, die ihrerseits die basale NO-Freisetzung der Endothelzellen beeinflussen. Bedeutend ist, dass NO normalerweise kontinuierlich von Endothelzellen produziert wird, die einem pulsatilen Fluss ausgesetzt sind. Die gestörte NO-Homöostase löst eine Verschiebung des Gleichgewichts im mikrovaskulären Milieu aus, die in Veränderungen der Form und Struktur der Endothelzellen resultiert. Der Endothelzellschaden führt zu weiteren strukturellen Veränderungen im kapillären Gefäßbett, die eine gestörte Hämodynamik und somit eine reduzierte Bereitstellung von energiereichen Substraten nach sich ziehen. Letztendlich führt die chronische Unterversorgung der Gehirnzellen zu den beschriebenen charakteristischen biochemischen und strukturellen Veränderungen der Hirngefäße von Alzheimer-Patienten, klinisch bemerkbar am kognitiven Abbau. Dabei erlaubt insbesondere der Abfall des basalen NO-Spiegels, dass die proinflammatorischen Effekte von Amyloid- β hervortreten, ein zusätzlicher Trigger der Erkrankung.

Anstelle der direkten Messung von NO wurde in unserer Arbeitsgruppe die Messung von zyklischen Nukleotiden durchgeführt. Diese Botenstoffe spiegeln die Freisetzung von NO aus shear-stress ausgesetzten Endothelzellen wieder. Die vorgestellten Daten zeigen eine höhere basale

Diskussion

cGMP- und cAMP-Konzentration, im Vergleich zu Präparaten, die einem gleich bleibenden Fluss ausgesetzt waren. Wird der Fluss stufenweise gesteigert, resultiert eine Abnahme der Konzentration zyklischer Nukleotide, im Gegensatz zu den gleichbehandelten Kontrollen (siehe Tabelle 2). Die höhere basale Konzentration ist möglicherweise auf eine höhere Viskosität der Lipidlösung zurückzuführen, verglichen mit der für die Kontrollversuche verwendeten Krebslösung. Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, ist am Gefäßendothel angreifender shear-stress proportional zur Viskosität und Menge der vorbeiströmenden Flüssigkeit. Die Menge der vorbeiströmenden Flüssigkeit wurde im vorgestellten Versuchsaufbau fest definiert. Die unterschiedlichen Viskositäten der verwendeten Lösungen gehen möglicherweise mit ungleich ansetzenden Scherkräften einher, welche sich in der Höhe von basal freigesetztem cGMP und cAMP widerspiegeln. Dennoch zeigen die Messungen nach Steigerung der Flussgeschwindigkeit einen von der Viskosität unabhängigen und auf das Apo E4-VLDL zurückzuführenden Effekt.

Wie von Siegel et al. [99] beschrieben, wird der Flussreiz von auf dem Endothel befindlichen HS-PG übersetzt (siehe Abschnitt 1.1.1). Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, stellt sich die Frage, ob eine Verbindung zwischen dem herabgesetzten NO-Spiegel in Gehirngefäßen von AD-Patienten und dem Bindungsverhalten von Apo E4 an HS-PG besteht. So könnte die Bindung von Apo E4 an HS-PG [64] die Übersetzung des Flussreizes negativ beeinflussen, und somit zu einem herabgesetzten NO-Spiegel in Gehirngefäßen von Alzheimer-Patienten führen. Um eine genauere Aussage hinsichtlich einer Beeinflussung der Pathogenese der AD im Sinne der vaskulären Hypothese durch eine solche Interaktion treffen zu können, sind detaillierte Untersuchungen notwendig.

5. Zusammenfassung

Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation von Koronararterien ist im Hinblick auf die Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen, die zum Krankheitsbild der Koronaren Herzerkrankung führen, als auch an Gehirnarterien, einem pathologischen Korrelat der Alzheimer-Demenz, ein interessantes, bisher unzureichend untersuchtes Phänomen. Die Frage nach einem von der Apo E-Isoform abhängigen Einfluss auf die Dilatation ist von Bedeutung, insbesondere aufgrund der Tatsache, dass die Homozygotie für Apo E4 ein Risikofaktor für beide Krankheitsbilder ist.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die flussabhängige Dilatation, als wesentlicher Regulator der Gefäßweite im arteriellen System, von physiologischen Konzentrationen des VLDL beeinflusst wird. Darüber hinaus haben wir eine unterschiedliche Reaktion der Gefäße auf gepooltes, mit verschiedenen Apo E-Isoformen besetztes, und auf homozygoten Apo E4/E4-VLDL gemessen. Hierzu wurde an unbehandelten intakten humanen Koronararterien in Abhängigkeit von steigenden Flussraten die Kraftentwicklung mit einem induktiven Kraftaufnehmer, das Membranpotential intrazellulär mit Glasmikroelektroden und anschließend die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP bestimmt.

Die dilatative Reaktion glatter Gefäßmuskulatur auf steigende Flussraten von VLDL-Lösung war gegenüber der Reaktion auf Krebslösung im Bereich niedriger Flussraten signifikant eingeschränkt. Bei einer maximalen Flussrate der Krebslösung von 100 mL/min nahm der Tonus der Gefäßstreifen um 16 % ab und die Zellen hyperpolarisierten. Unter VLDL-Lösung wurde eine geringere Tonusabnahme von 9% gemessen, entsprechend auch eine geringere Hyperpolarisation. Die Quantifizierung des Einflusses der Very-Low-Density-Lipoproteine auf die Signaltransduktion zeigte eine um 20% reduzierte cGMP- und um fast 50% reduzierte cAMP-Freisetzung, in Übereinstimmung mit der eingeschränkten Relaxation. Wie der Vergleich mit Experimenten an Gefäßabschnitten ohne Endothel zeigt, ist die Einschränkung der flussabhängigen Dilatation hauptsächlich endothelabhängig. Es wurde kein signifikanter Unterschied der flussabhängigen Dilatation unter Krebslösung versus VLDL an deendothelialisierten Präparaten gemessen.

Bekanntermaßen geht die Atherosklerose mit einer endothelialen Dysfunktion einher. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass bereits in intakten Gefäßen die physiologische Relaxation glatter Gefäßmuskulatur auf Flussreiz durch VLDL negativ beeinflusst wird. Dabei

Zusammenfassung

scheint die Abnahme der Vasodilatation unter physiologischen VLDL-Konzentrationen auf eine Bindung an Flusssensoren, und folglich auf die Blockade der optimalen Übersetzung des Flussreizes mittels Bildung von sekundären Botenstoffen, zurückzugehen.

In weiteren Untersuchungen wurde unter homozygotem Apo E4/E4-VLDL eine komplette Aufhebung der flussabhängigen Dilatation beobachtet. Bei steigenden Flussraten kam es zu einer signifikanten Tonuszunahme der glatten Gefäßmuskulatur und zur Depolarisation ihrer Zellmembranen. Dabei lag der Tonus der Arterienstreifen bei maximaler Flussrate um 13 % über dem Ausgangstonus. Gleichzeitig wurde eine Konzentrationsabnahme der Botenstoffe cGMP und cAMP bestimmt. Insgesamt konnten wir eine kontrahierende Wirkung von Apo E4 auf die glatte Muskulatur von Arterien nachweisen.

Laut gängiger Meinung ist Apolipoprotein E4 ein molekulargenetischer Risikofaktor für Atheroskleroseentstehung sowie Entwicklung einer Alzheimer-Demenz. Diese Assoziation ist auf pathophysiologischer Ebene bisher unzureichend untersucht. Die in dieser Arbeit erstmals gemessene Einschränkung der flussabhängigen Dilatation mit gleichzeitiger Abnahme der sekundären Botenstoffe in der Gefäßmuskulatur von Apo E4/E4-VLDL-ausgesetzten Koronararterien könnte ein weiterer Mechanismus sein, über den der Apo E4-Genotyp an der Entstehung dieser Erkrankungen beteiligt ist.

Literaturverzeichnis

- [1] Nahezu jeder zweite Gestorbene erlag 2003 einer Herz-Kreislauf-erkrankung. Statistisches Bundesamt Pressestelle, 2005 (abgerufen 20.11.2006 von www.destatis.de/presse/deutsch/pm2005/p0600092.htm)
- [2] Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, et al.: The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273: 32950-6
- [3] Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, et al.: The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001; 154: 475-83
- [4] Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M: Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature* 1987; 327: 237-9
- [5] Assmann G, Schmitz G, Menzel HJ, Schulte H: Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia. *Clin Chem* 1984; 30: 641-3
- [6] Austin MA: Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 2-14
- [7] Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R: Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996; 78: 750-8
- [8] Banfi C, Mussoni L, Ris P, et al.: Very low density lipoprotein-mediated signal transduction and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured HepG2 cells. *Circ Res* 1999; 85: 208-17
- [9] Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S, et al.: Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2000; 102: 1033-8
- [10] Behr D, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ: Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long-term cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 142: 335-44
- [11] Bevan JA, Joyce EH, Wellman GC: Flow-dependent dilation in a resistance artery still occurs after endothelium removal. *Circ Res* 1988; 63: 980-5
- [12] Blacker D, Haines JL, Rodes L, et al.: ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology* 1997; 48: 139-47

Literaturverzeichnis

- [13] Bonkale WL, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF: Reduced nitric oxide responsive soluble guanylyl cyclase activity in the superior temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1995; 187: 5-8
- [14] Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V: Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med* 1999; 245: 315-27
- [15] Buee L, Hof PR, Bouras C, et al.: Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 87: 469-80
- [16] Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP: Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000; 184: 409-20
- [17] Cedazo-Minguez A, Cowburn RF: Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 254-66
- [18] Cole GM, Ard MD: Influence of lipoproteins on microglial degradation of Alzheimer's amyloid beta-protein. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 316-24
- [19] Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, et al.: Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994; 7: 180-4
- [20] Cox DA, Vita JA, Treasure CB, et al.: Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989; 80: 458-65
- [21] Dallongeville J: Apolipoprotein E: proprietes physiologiques, polymorphisme et atherosclerose. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1993; 5: 707-17
- [22] Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L: Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 115-43
- [23] de la Torre JC: Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease? *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 98: 1-8
- [24] de la Torre JC, Stefano GB: Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 34: 119-36
- [25] Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J: Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest* 1991; 88: 1490-501
- [26] Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, et al.: Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis* 1998; 137: 341-9

Literaturverzeichnis

- [27] Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, et al.: Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993; 71: 160-5
- [28] Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL: Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 1985; 227: 1477-9
- [29] Frisoni GB, Manfredi M, Geroldi C, et al.: The prevalence of apoE-epsilon4 in Alzheimer's disease is age dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 103-6
- [30]
- [31] Furukawa K, Tawada Y, Shigekawa M: Regulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 8058-65
- [32] Gilbert EK, Weaver BA, Rembold CM: Depolarization decreases the [Ca²⁺]_i sensitivity of myosin light-chain kinase in arterial smooth muscle: comparison of aequorin and fura 2 [Ca²⁺]_i estimates. *Faseb J* 1991; 5: 2593-9
- [33] Ginsberg HN: Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27: 503-19
- [34] Gudmundsson GS, Sinkey CA, Chenard CA, Stumbo PJ, Haynes WG: Resistance vessel endothelial function in healthy humans during transient postprandial hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 2000; 85: 381-5
- [35] Haas C, Cazorla P, Miguel CD, Valdivieso F, Vazquez J: Apolipoprotein E forms stable complexes with recombinant Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein. *Biochem J* 1997; 325 (Pt 1): 169-75
- [36] Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-53
- [37] Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA: Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 2003; 60: 1119-22
- [38] Herz J, Hamann U, Rogne S, et al.: Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 1988; 7: 4119-27
- [39] Hofman A, Ott A, Breteler MM, et al.: Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 1997; 349: 151-4
- [40] Holzmann S: Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *J Cyclic Nucleotide Res* 1982; 8: 409-19

Literaturverzeichnis

- [41] Huang A, Sun D, Koller A: Shear stress-induced release of prostaglandin H(2) in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35: 925-30
- [42] Ignarro LJ, Burke TM, Wood KS, Wolin MS, Kadowitz PJ: Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228: 682-90
- [43] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G: Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 181-9
- [44] Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, et al.: Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 1125-9
- [45] Innerarity TL, Mahley RW: Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* 1978; 17: 1440-7
- [46] Jellinger KA: Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm* 2002; 109: 813-36
- [47] Jiang H, Colbran JL, Francis SH, Corbin JD: Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem* 1992; 267: 1015-9
- [48] Jiang H, Shabb JB, Corbin JD: Cross-activation: overriding cAMP/cGMP selectivities of protein kinases in tissues. *Biochem Cell Biol* 1992; 70: 1283-9
- [49] Jones KA, Wong GY, Jankowski CJ, Akao M, Warner DO: cGMP modulation of Ca²⁺ sensitivity in airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: L35-40
- [50] Khromov AS, Wang H, Choudhury N, et al.: Smooth muscle of telokin-deficient mice exhibits increased sensitivity to Ca²⁺ and decreased cGMP-induced relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2440-5
- [51] Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, et al.: Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 1998; 97: 2519-26
- [52] Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD: Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 160-2
- [53] Kuiper MA, Visser JJ, Bergmans PL, Scheltens P, Wolters EC: Decreased cerebrospinal fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy patients. *J Neurol Sci* 1994; 121: 46-9

Literaturverzeichnis

- [54] Kuo L, Davis MJ, Chilian WM: Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 1990; 259: H1063-70
- [55] Landgraf W, Hullin R, Gobel C, Hofmann F: Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem* 1986; 154: 113-7
- [56] Launer LJ: Demonstrating the case that AD is a vascular disease: epidemiologic evidence. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 61-77
- [57] Leonhardt W, Pietzsch J, Nitzsche S: Very-fast ultracentrifugation of human plasma lipoproteins: influence of the centrifugal field on lipoprotein composition. *Clin Chim Acta* 1994; 224: 21-32
- [58] Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP: Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine is impaired in hypertriglyceridemic humans with normal levels of plasma LDL cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 805-12
- [59] Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP: Non-specific inhibition by human lipoproteins of endothelium dependent relaxation in rat aorta may be attributed to lipoprotein phospholipids. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 590-6
- [60] Lincoln TM, Cornwell TL: Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 1991; 28: 129-37
- [61] Lundman P, Tornvall P, Nilsson L, Pernow J: A triglyceride-rich fat emulsion and free fatty acids but not very low density lipoproteins impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis* 2001; 159: 35-41
- [62] MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, et al.: Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest* 2007; 117: 153-64
- [63] Mahley RW, Huang Y: Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 207-17
- [64] Malmsten M, Kassner U, Winkler K, et al.: An ellipsometry-based Alzheimer plaque mimic: Effect of beta-amyloid, lipoprotein identity and apolipoprotein E isoform. *J Colloid Interface Sci* 2004; 276: 503-6
- [65] McCarty MF: Vascular nitric oxide may lessen Alzheimer's risk. *Med Hypotheses* 1998; 51: 465-76
- [66] McDowell I: Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Ageing (Milano)* 2001; 13: 143-62

Literaturverzeichnis

- [67] Meyer-Rath G: Der Einfluß von endothelständigen Proteoglykanen und subendothelialer Matrix auf die flußabhängige Gefäßmodulation isolierter gesunder und arteriosklerotischer Koronararterien des Menschen. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, 2005
- [68] Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, et al.: APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet* 1998; 19: 321-2
- [69] Minami M, Yokokawa K, Kohno M, Yasunari K, Yoshikawa J: Suppression of endothelin-3-induced nitric oxide synthesis by triglyceride in human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1: S467-9
- [70] Morishima-Kawashima M, Oshima N, Ogata H, et al.: Effect of apolipoprotein E allele epsilon4 on the initial phase of amyloid beta-protein accumulation in the human brain. *Am J Pathol* 2000; 157: 2093-9
- [71] Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P: Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 349-56
- [72] Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K: Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 1991; 541: 163-6
- [73] Nishimura J, van Breemen C: Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 929-35
- [74] Oka K, Ishimura-Oka K, Chu MJ, et al.: Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur J Biochem* 1994; 224: 975-82
- [75] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6
- [76] Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, et al.: Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1336-45
- [77] Phillips NR, Waters D, Havel RJ: Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993; 88: 2762-70
- [78] Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH: Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 1987; 262: 14352-60

Literaturverzeichnis

- [79] Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA: Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *Jama* 1997; 278: 1682-6
- [80] Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E: EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 1991; 261: H2016-23
- [81] Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E: Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8: 37-44
- [82] Poirier J: Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924: 81-90
- [83] Prince M, Lovestone S, Cervilla J, et al.: The association between APOE and dementia does not seem to be mediated by vascular factors. *Neurology* 2000; 54: 397-402
- [84] Rader DJ, Hobbs HH: Disorders of Lipoprotein Metabolism. In: Kasper DL, Braunwald E and Fauci AS, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. Mc Graw-Hill 2005: Table 335-1 Major Lipoprotein Classes
- [85] Rall SC, Jr., Weisgraber KH, Mahley RW: Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257: 4171-8
- [86] Reiman EM, Chen K, Alexander GE, et al.: Correlations between apolipoprotein E epsilon4 gene dose and brain-imaging measurements of regional hypometabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8299-302
- [87] Roses AD: Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 1996; 47: 387-400
- [88] Rossor MN, Kennedy AM, Frackowiak RS: Clinical and neuroimaging features of familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 49-56
- [89] Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM: Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H1145-9
- [90] Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al.: The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; 335: 1001-9
- [91] Sata M, Kakoki M, Nagata D, et al.: Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension* 2000; 36: 83-8

Literaturverzeichnis

- [92] Sausbier M, Schubert R, Voigt V, et al.: Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 2000; 87: 825-30
- [93] Scarmeas N, Habeck CG, Hilton J, et al.: APOE related alterations in cerebral activation even at college age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1440-4
- [94] Schretzenmayr A: Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit. *Arch Exp Pathol* 1932; 164: 743-8
- [95] Scuteri A, Bos AJ, Zonderman AB, et al.: Is the apoE4 allele an independent predictor of coronary events? *Am J Med* 2001; 110: 28-32
- [96] Seshadri S, Drachman DA, Lippa CF: Apolipoprotein E epsilon 4 allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease. What physicians know, and what they should know. *Arch Neurol* 1995; 52: 1074-9
- [97] Siegel G: Vascular Smooth Muscle. In: Greger R and Windhorst U, eds. *Comprehensive Human Physiology*. ed. Berlin Heidelberg, Springer Verlag, 1996: 1941-64
- [98] Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Leonhardt W: Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999; 144: 59-67
- [99] Siegel G, Malmsten M, Schmidt A: Flow sensing at the endothelial cell membrane blood interface. *J Membr Sci* 1996; 113: 101-13
- [100] Siegel G, Rodriguez M, Schon T, et al.: Blood flow sensor susceptibility to lipoproteins in early arteriosclerosis and its clinical improvement by statin therapy - a nanoplaque study. *Desalination* 2006; 191: 417-25
- [101] Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, et al.: Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41: 1068-86
- [102] Slooter AJ, van Duijn CM, Bots ML, et al.: Apolipoprotein E genotype, atherosclerosis, and cognitive decline: the Rotterdam Study. *J Neural Transm Suppl* 1998; 53: 17-29
- [103] Smith JD: Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases. *Ann Med* 2000; 32: 118-27
- [104] Stamler JS: Alzheimer's disease. A radical vascular connection. *Nature* 1996; 380: 108-11
- [105] Stampfer MJ: Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J Intern Med* 2006; 260: 211-23

Literaturverzeichnis

- [106] Stengard JH, Weiss KM, Sing CF: An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum Genet* 1998; 103: 234-41
- [107] Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, et al.: Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 265-9
- [108] Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al.: Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1977-81
- [109] Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, et al.: Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science* 1999; 286: 1583-7
- [110] Takahashi M, Takahashi S, Shimpo M, et al.: beta-very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; 162: 307-13
- [111] Takahashi M, Yui Y, Yasumoto H, et al.: Lipoproteins are inhibitors of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Am J Physiol* 1990; 258: H1-8
- [112] Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T: Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 9252-6
- [113] Utermann G, Kindermann I, Kaffarnik H, Steinmetz A: Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet* 1984; 65: 232-6
- [114] Vequaud P, Pourageaud F, Freslon JL: Role of nitric oxide and endothelium in the flow-induced dilation of rat coronary arteries under two precontraction conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 470-6
- [115] Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD: Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997; 79: 350-4
- [116] Walsh MP, Kargacin GJ, Kendrick-Jones J, Lincoln TM: Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 565-73
- [117] Wang Q, Bryowsky J, Minshall RD, Pelligrino DA: Possible obligatory functions of cyclic nucleotides in hypercapnia-induced cerebral vasodilation in adult rats. *Am J Physiol* 1999; 276: H480-7
- [118] Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA: Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91: 567-73

Literaturverzeichnis

- [119] Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW: Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257: 2518-21
- [120] Wilson PW, Myers RH, Larson MG, et al.: Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *Jama* 1994; 272: 1666-71
- [121] Wisniewski T, Castano EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B: Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 1994; 145: 1030-5
- [122] Xu HL, Wolde HM, Gavrilyuk V, Baughman VL, Pelligrino DA: cAMP modulates cGMP-mediated cerebral arteriolar relaxation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H2501-9
- [123] Yamamoto T, Hoshino A, Takahashi S, et al.: The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748: 217-24; discussion 24-5
- [124] Yang J, Clark JW, Bryan RM, Robertson CS: Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H886-97

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

In erster Linie gilt mein herzlicher Dank Herrn Professor Dr. Günter Siegel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion am Institut für Physiologie der Charité Berlin. Mit seinem großen Enthusiasmus und der Begeisterung für das Thema hat er nicht nur erheblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen, sondern verstand es mich zu jeder Zeit und auch nachhaltig für die Wissenschaft zu begeistern. Seine ständige Bereitschaft zur Teilnahme an teilweise nächtlichen Experimenten wird mir besonders in Erinnerung bleiben.

Bei Frau Angela Becker möchte ich mich für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung und der logistischen Planung bedanken. Mit Ihrer großen Routine in der Laborarbeit und Perfektion des Versuchsablaufs hat sie wesentlich zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Für die Kooperation zur Gewinnung der Präparate danke ich Herrn Professor Dr. Roland Hetzer und den Mitarbeitern des Deutschen Herzzentrums Berlin. Vor allem Herrn Dr. Frank Barthel, der zu jeder Zeit bereit war mir für die Entnahme der Arterien zur Seite zu stehen. Gleichmaßen möchte ich mich bei Frau Dr. Ursula Kassner und den Patienten des Stoffwechselzentrums der Charité Berlin für die Bereitstellung der Lipidlösungen bedanken.

Herrn Professor Dr. Karl Winkler und den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie der Universität Freiburg danke ich für Isolierung der Lipoproteine. Für die Hilfe bei der Bestimmung der Konzentration der sekundären Botenstoffe möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Hans-Werner Hofer bedanken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die durch ihre langjährige und unermüdliche Unterstützung die Fertigstellung der Arbeit ermöglicht haben.

Den unbekanntem Organspendern gebührt meine Anerkennung und Dank für die Bereitschaft zur Überlassung ihrer Organe, die diese Arbeit erst ermöglichte.

Erklärung

„Ich, Jana Schlangen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an Koronararterien des Menschen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 19.10.09

Jana Schlangen