

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

DISSERTATION

Der Einfluss von verschiedenen HDL-Isoformen auf die fluss-  
abhängige Gefäßmodulation menschlicher Koronarien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Isabelle Moutongo Missala

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2 - 4
Abkürzungen	4 - 5
Abstrakt	6 - 7
<b>1 Einleitung</b>	<b>8 - 26</b>
1.1 Die Wandschichten humaner Koronarien	8 - 11
1.1.1 Das Endothel	9
1.1.2 Die Extrazelluläre Matrix	9 - 10
1.1.3 Die glatten Muskelzellen	10 - 10
1.1.3.1 Elektromechanische Kopplung	9 - 10
1.1.3.2. Signaltransduktion in der Muskelzelle	10 - 11
1.2. Regulation des Gefäßtonus	11 - 18
1.2.1 Vasomotorik (flussabhängige Dilatation)	11 – 15
1.2.2. Vasokonstriktion	15
1.2.2.1 Endothelzellabhängige Vasokonstriktion	15 - 16
1.2.2.2 Myogene Vasokonstriktion (Bayliss-Effekt)	16
1.2.2.3 Neurogene Vasokonstriktion	16
1.2.3 Zyklische Nukleotide cAMP und cGMP und ihr Einfluß auf die Vasomotorik	16 – 18
1.3. Lipoproteine – HDL	18 - 22
1.3.1. HDL Allgemein	18 - 21
1.3.2. HDL und Arteriosklerose	21
1.3.3. HDL und Gefäßmodulation	21 - 22
1.4. Apolipoprotein E	23 – 25
1.5 Ziel der Arbeit (Arbeitshypothese)	25 - 26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>26 – 33</b>
2.1 Methoden	26
2.1.1 Explantation und Präparation der Koronararterien	26
2.1.2  Feinpräparation und Äquilibrierung der Koronararterien	26
2.2 Lösungen und Substanzen	26 - 27
2.2.1  Krebs-Lösung, Carbogen Gemisch	26
2.2.2 Lipoproteinlösungen	26 - 27
2.2.3 Apo E- Genotypisierung	27
2.3 Meßmethoden	27 - 28
2.3.1 Messung des Tonus	27 - 28
2.3.2 Versuchsdurchführung	28
2.3.3 Stress-relaxation	28

2.4 Intrazelluläre Membranpotentialableitung	28 - 30
2.4.1 Mikroelektroden	28 - 29
2.4.2 Einstische	29 - 30
2.4.3 Versuchsdurchführung	30
2.5. Bestimmung der zyklischen Nukleotide	30 - 32
2.5.1 Gewebsaufschluß	30
2.5.2 Bestimmung der Konzentration von cAMP	30 - 31
2.5.2 Bestimmung der Konzentration von cGMP	31 - 32
2.5.3 Auswertung	32
2.6 Auswertung und Statistik	32 - 33
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>33 - 48</b>
3.1. Kraft und Membranpotentialveränderung	33 - 41
3.1.1 Kontrollversuche	33 - 35
3.1.2 Gepooltes HDL	35 - 36
3.1.3 Homozygotes Apo E0/E0 HDL	36 - 38
3.1.3 Homozygotes Apo E4/E4 HDL	38 - 39
3.1.4 Flußabhängige Dilatation unter dem Einfluß von gepooltem HDL, HDL Apo E0/0 und HDL Apo E4/4	39 - 41
3.2 Elektromechanische Kopplung	41 - 42
3.3 Bestimmung der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP	42 - 47
3.3.1 Bestimmung der Nukleotide in Krebslösung	42 - 43
3.3.2 Bestimmung der Nukleotide in gepooltem HDL	43 - 44
3.3.3 Bestimmung der Nukleotide in HDL Apo E0/0	44 - 45
3.3.4 Bestimmung der Nukleotide in HDL Apo E4/4	45 - 46
3.3.5 Bestimmung der Nukleotide in Abhängigkeit der verschiedenen HDL-Isoformen	46 - 47
3.4. Chemomechanische Kopplung	48
<b>4 Diskussion</b>	<b>49 - 58</b>
4.1 Wirkung von HDL auf die flußabhängige Dilatation, Einleitung	49
4.2. Wirkung auf den Gefäßtonus und das Membranpotential	49 - 52
4.3 Einfluß der Nukleotidfreisetzung cAMP und cGMP	52 - 53
4.4 Einfluß von Apolipoprotein E	53 - 54
4.4.1 Einfluß von Apo E4/E4 auf die flußabhängige Dilatation	54 - 56
4.4.2 Einfluß von Apo E0/E0 auf die flußabhängige Dilatation	56 - 58
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>58 - 60</b>
5.1 Limitationen	58 - 59
5.2 Zusammenfassung	59 - 60
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>60 - 70</b>

**Abkürzungen**

AA	Arachidonsäure
ABCA-1	ATP-Binding Cassette A1
ACh	Acetylcholin
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
Apo E	Apolipoprotein E
Apo A	Apolipoprotein A
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
cG-PK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
ED	Endotheliale Dysfunktion
EDHF	Endothelium-derived-hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived-relaxing-factor
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetraacetat
EE	Eikosatriensäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ET	Endothelin
FC	freies Cholesterol
FDD	flow-dependant-dilatation
GC	Guanylcyclase
GTP	Guanintriphosphat
HDL	High-density Lipoprotein
HL	hepatische Lipase
HLP III	Hyperlipoproteinämie Typ III
HS-PG	Heparansulfat-Proteoglykan
IMT	Intima-Media-Thickness
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat

IRAG	IP3-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat
K <sub>ATP</sub> channels	ATP-abhängige K <sup>+</sup> -Kanäle
K <sub>Ca</sub> channels	Ca <sup>2+</sup> -abhängige K <sup>+</sup> -Kanäle
KCL	Kaliumchlorid
K <sub>dr</sub> channels	delayed-rectifer K <sup>+</sup> -Kanäle
KHK	koronare Herzerkrankung
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LPL	Lipoprotein Lipase
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MZ	Muskelzellen
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Sickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PDE	Phosphodiesterase
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PGI <sub>3</sub>	Prostacyclin-Inositol-Trisphosphat
PKG	Proteinkinase G
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
QCA	quantitative Coronarangiographie
S1P	Sphingosin 1-Phosphat
SNP	Natriumnitropussid
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SR-BI	HDL Scavenger Rezeptor Klasse B, Typ I
TC	Total Cholesterol, Gesamtcholesterin
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
VOC	voltage operated channels

## **Abstrakt**

**Einleitung:** Die Arteriosklerose und ihre Folgen ist eine der häufigsten Todesursachen. Dem HDL-C wird ein anti-atherogener Effekt zugeschrieben. Es besteht eine inverse Beziehung zwischen dem HDL-C Wert und dem kardiovaskulären Risiko (CVR) [16], allerdings besteht lt. Mendelschen Randomisierungsanalysen [128] keine Kausalität zwischen dem HDL-Cholesterol und der Atherosklerosentwicklung. Strukturelle und funktionelle Anteile des HDL scheinen stärker das CVR zu beeinflussen [68]. Die vorliegende Arbeit beobachtet an menschlichen Koronararterien die funktionelle Wirkung unterschiedlicher physiologischer HDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation (FDD), welche in der Frühphase der Atherosklerose von Bedeutung ist. **Methodik:** Die Entwicklung von Tonus und intrazellulärem Membranpotential glatter Gefäßmuskulatur von Koronarien wurde unter steigenden Flussraten (3 – 100 mL/min) gemessen. Die Präparate befanden sich in einer Kontroll-Krebs- bzw. HDL-Lösung mit unterschiedlichen ApoE-Isoformen. Zusätzlich wurde die Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP bestimmt. Die Messungen erfolgten an Präparaten mit intaktem Endothel sowie an de-endothelialisierten Präparaten.

**Ergebnisse:** Unter steigendem Fluß relaxierten Gefäße mit intaktem Endothel in Krebslösung um 16,6%, hingegen in gepoolter HDL-Lösung um 25,8%; de-endothelialisierte Präparate relaxierten weniger (um 12,8% für die Kontrollen bzw. 6,6% für gepooltes HDL). Hingegen kam es unter dem Einfluß von HDLapoE4/E4 unter steigendem Fluß zu einer stärkeren Kontraktion. Für de-endothelialisierte Präparate lag diese maximal bei 22,0%, für intakte Endothelpräparate bei 12,4%. Unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 kam es bei zunehmendem Fluß endothelintakter Präparate zu einer minimalen Relaxation von 0,9% und bei endotheldefizienten Präparaten sogar zu einer leichtgradigen Kontraktion von 2,6%.

Die Ergebnisse spiegelten sich in der Potentialentwicklung und der Konzentration der zyklischen Nukleotide wider.

**Schlussfolgerung:** Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß natives HDL in intakten Gefäßen die FDD endothelvermittelt durch NO-Freisetzung steigert. Bei fehlendem Endothel ist die FDD geringer, sie entsteht durch eine Interaktion des HDL mit der extrazellulären Matrix. Unter dem Einfluß von homozygotem HDLapoE4/E4 und HDLapoE0/E0 wird die FDD aufgehoben mit einer Abnahme der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP. ApoE4 ist bereits ein genetischer Risikofaktor für kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen.

Die aufgezeigten heterogenen Wirkungen des HDL unter dem Einfluß von ApoE auf den Gefäßtonus liefern mögliche Erklärungsansätze für die Pathogenese der Atherosklerose.

## Abstract

**Introduction:** Arteriosclerosis and its consequences is one of the leading causes of death. HDL is reputed to be an anti-atherogenic lipoprotein. There is an inverse relationship between the HDL-C concentration and the cardiovascular risk (CVR) [16], however according to the Mendelian randomization analysis [128] there is no causality between the HDL-C and the development of atherosclerosis. Structural and functional parts of HDL seem to affect the CVR more [68]. Our investigations aimed to depict the influence of different HDL isoforms on flow-dependent-dilatation (FDD) of isolated human coronary artery segments, a mechanism that plays an important role in the early phase of atherosclerosis development. **Methods:** Isometric tension and membrane potential of smooth muscle cells of coronary arteries were recorded under increasing flow rates (3 – 100 mL/min) of Krebs solution and different HDLapoE-isoforms. Additionally the concentrations of cyclic nucleotides were measured. We used coronary artery segments with normal endothelium and removed endothelium.

**Results:** Under increasing flow rates artery segments with intact endothelium relaxed by 16,6% in Krebs solution, while in pooled HDL-solution by 25,8%; artery segments with discontinuous endothelium relaxed less (by 12,8% in Krebs solution and 6,6% in pooled HDL). However under the influence of HDLapoE4 / E4 we observed greater contraction with increasing flow rates (a maximum of 22,0% and 12,4% of artery segments without and with intact endothelium). Under the influence of HDLapoE0/E0 we observed lower relaxation of 0,9% in intact endothelial segments and even a minimal contraction of 2,6% in endothelium-deficient segments. These results are confirmed in the development of membrane potential and concentrations of cyclic nucleotides.

**Conclusion:** Our results show that pooled HDL in intact vessels increases the FDD by NO release mainly mediated by the endothelium. FDD is less in the absence of endothelium, and is caused by an interaction of HDL with the extracellular matrix. FDD is decreased under the influence of homozygous HDLapoE4/E4 and HDLapoE0/E0 with a decrease of the second messengers cAMP and cGMP. ApoE4 is an already well known genetic risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. The heterogeneous effects of HDL in the presence of ApoE on vascular tone shown in our investigation provide possible explanations for the pathogenesis of atherosclerosis.

## 1 Einleitung

Die Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen ist heutzutage die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Allein in Deutschland lag die Anzahl der Sterbefälle durch Herz-Kreislaufkrankungen für das Jahr 2013 bei 354.493 (lt. Statistisches Bundesamt Deutschland Stand 2013). Dies entspricht einem Anteil von knapp 40% an den Sterbefällen aller Krankheiten [121]. Immer mehr entwickelt sich diese Erkrankung zum weltweiten Problem [92].

Eine Veränderung der Endothelzellfunktion mit reduzierter Verfügbarkeit von endothelalem Stickstoffmonoxid (NO), mit pro-inflammatorischer Aktivierung, erhöhter Apoptose der Endothelzellen und pro-thrombotischer Aktivierung tragen wesentlich zur ihrer Entwicklung bei [68]. HDL-C galt bislang als einer der wichtigsten direkten anti-atherogenen Faktoren durch die Modulation der Endothelzellfunktion [29,49,98]. In diesem Zusammenhang ist eine HDL-Beeinflussung der flussabhängigen Dilatation (FDD) entscheidend. Neuere Untersuchungen belegen jedoch heterogene Effekte des HDL am Endothel. So werden dem HDL-C von Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) eher pro-atherogene Eigenschaften (pro-inflammatorisch, nicht endothel-protektiv) zugeschrieben [68].

Ein wichtiger Bestandteil des HDL-C ist das Apolipoprotein E (ApoE), welches in drei koinominat vererbten Allelen vorkommt (E2, E3, E4). Epidemiologische Studienergebnisse zeigen, dass bestimmte ApoE-Allele mit einer höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit für Atherosklerose und neurodegenerative Erkrankungen einhergehen.

Die Zahl der über „Apolipoprotein E, HDL und Arteriosklerose“ publizierten Arbeiten hat seitdem drastisch zugenommen (733 Arbeiten, PubMed Recherche, Stand: October 2015) - noch nicht untersucht worden ist jedoch, wie die unterschiedlichen HDL-ApoE-Isoformen das mechanische, biochemische und elektrophysiologische Verhalten humaner Koronararterien beeinflussen. Mit diesen Fragen befasst sich die vorliegende Arbeit.

### 1.1 Die Wandschichten menschlicher Koronarien

Die Wand der Koronarien besteht aus der **Intima** mit Endothel und Basalmembran, der **Media** mit glatten Gefäßmuskelzellen, welche von elastischen Kollagenfasern und Lamellen umgeben sind und der **Adventitia** mit Bindegewebe, vereinzelt glatten Muskelzellen (MZ) und sympathischen Nervenendigungen. Die Gefäßwanddicke wird dabei vor allem durch das Bindegewebe und die glatten Muskelzellen bestimmt.

### **1.1.1. Das Endothel**

Das Gefäßendothel befindet sich an einer entscheidenden Schnittstelle zwischen Blutgefäßsystem und umliegendem Gewebe. Seine wichtigste Aufgabe ist die Modulation des Gefäßtonus der glatten Muskulatur und damit die Blutdruckregulation.

Zudem reguliert es zelluläre Stoffaustauschprozesse zwischen Gewebe und Blut (Transportfunktion) und bildet eine Barriere für Plasmabestandteile, wie z.B. Thrombin (Schrankenfunktion) und setzt Mediatoren frei, welche Gefäßweite, Blutgerinnung und Entzündungsreaktion steuern [14,52,60]. Die zuletzt genannten drei Prozesse tragen in der Frühphase der Atheroskleroseentstehung zum Entstehen des inflammatorischen Ödems bei. Und nicht zu vergessen, tragen Endothelzellen auch zur Neubildung von Blutgefäßen, der sogenannten Angiogenese, mit bei.

Das Endothel ist eine kontinuierliche Monoschicht von Zellen, welche miteinander durch verschiedene Arten von Zell- zu- Zell-Verbindungen verknüpft sind, den tight junctions, adherens junctions, und gap junctions. Der menschliche Körper besitzt gut  $6 \times 10^{13}$  Endothelzellen und die Kontaktfläche mit dem Blut beträgt  $1000 \text{ m}^2$  [90,101]. Aufgrund dieser großen Fläche und der starken parakrinen Aktivität ist es mit 1,5 kg Gesamtgewicht das größte endokrine Organ des Menschen [8]. Daher führt eine Funktionsstörung des Endothels (endotheliale Dysfunktion) zu schwerwiegenden pathologischen Folgen. Unter steigendem Flußreiz erfolgt eine Übersetzung des Flußreizes vom Endothel an die darunter liegende extrazelluläre Matrix.

### **1.1.2. Die extrazelluläre Matrix**

Unter der Endothelzellschicht befindet sich die sogenannte extrazelluläre Matrix. Zu ihr werden die Basalmembran sowie die Aktin- und Myosinfaserelemente gerechnet. Die Basalmembran als effektivste Schranke für zelluläre Transportmechanismen wird stabilisiert durch Proteoglykane, Laminin-, Fibronectin- und Elastinglykoproteine und Kollagenfasern.

Proteoglykane wirken an der Zell- und Basalmembran als Ionenaustauscher und beeinflussen dadurch das Membranpotential und den transmembranalen Ionentransport [20]. Zusätzlich bewirken sie durch die Einbindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen hohen Druckwiderstand (Gelatinisierung) [20]. Die Proteoglykane der Gefäßwand heißen Perlecan, Syndecan und Versican.

Eine wichtige Aufgabe der extrazellulären Matrix besteht darin, die Festigkeit (Elastizität) der Gefäßwand unter physiologischem Fluß zu gewährleisten. Dabei gilt, je größer die angreifenden Kräfte sind, desto weniger beweglich muß die extrazelluläre Matrix sein. Es gilt das Prinzip der „tensional integrity“, also der Festigkeit unter Zug [129]. Siegel et al. [121] zeigten, dass nach Verlust des Endothels die extrazelluläre Matrix hauptsächlich zur Modulation des

Gefäßtonus beiträgt. Die Proteoglykane der extrazellulären Matrix fungieren dabei als Flußsensoren zur Mechanotransduktion, d.h. Umsetzung des Scherreizes durch die Endothelzellmembran hindurch.

Proteoglykane sind (a) Polyelektrolyte mit starker Negativladung, (b) besitzen viele Bindungsstellen für Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) und können (c) aufgrund ihrer viskoelastischen Eigenschaften eine Konformationsänderung in Abhängigkeit des Blutflusses erfahren.

Die wichtigsten Aufgaben der extrazellulären Matrix von Arterien sind die Erhaltung der Integrität des Endothelzellbundes, die Modulation eines Scherreizes in eine vasomotorische Antwort und die Erhaltung der trophischen Plastizität des Gefäßes unter chronisch veränderten Flußbedingungen.

### **1.1.3. Die glatten Muskelzellen (MZ)**

#### **1.1.3.1 Elektromechanische Kopplung**

Eine Depolarisation der Membran glatter MZ resultiert in einer Kontraktion (Gefäßverengung). Eine Hyperpolarisation der Membran glatter MZ hingegen resultiert in einer Relaxation (Gefäßweiterung). Man bezeichnet dieses Phänomen auch als elektromechanische Kopplung zwischen Tonus und Membranpotential. Das Ruhemembranpotential der glatten Muskelzelle liegt bei -45 bis -50 mV, es ist ein passives Ionendiffusionspotential und wird im Wesentlichen durch den Kaliumionen In- und Efflux bestimmt. Es lässt sich mittels der Goldman-Gleichung aus den Ionenpermeabilitäten und -konzentrationen ermitteln. Für seine Aufrechterhaltung verantwortlich ist der aktive Ionentransport durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und in geringerem Maße auch durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, welche einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) sowie den Extrazellulärraum bewirkt.

Die intrazelluläre Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist hauptsächlich für den Gefäßtonus verantwortlich. Im Ruhezustand liegt sie bei  $2 \times 10^{-7}$  mol/L und wird durch den stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch L-Typ-Calcium Kanäle (VOCs = voltage operated channels) aufrechterhalten. Im Rahmen der Depolarisation kommt es zur Öffnung dieser spannungsabhängigen VOCs der Plasmamembran und Zellmembran des sarkoplasmatischen Retikulum mit Einstrom von extrazellulärem Calcium entsprechend des elektrochemischen Gradienten in die Zelle mit nachfolgender Tonuszunahme der Muskelzelle. Die Tonusabnahme der glatten Muskelzellen entsteht durch die Repolarisation bzw. Hyperpolarisation. Siegel et al. [115] konnten zeigen, dass die Öffnung von spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen in entscheidendem Ausmaß zur Dilatation beiträgt. Ihre Öffnung und die Diffusion von  $\text{K}^+$ -Ionen von innen nach außen bewirkt ein stark negatives Membranpotential (Hyperpolarisation), welches zu einem Verschluss der VOCs führt. Somit kommt es nicht zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle.

Das Membranpotential hat somit einen entscheidenden Einfluß auf die Kraftentwicklung der glatten Gefäßmuskulatur.

### 1.1.3.2. Signaltransduktion in der Muskelzelle

Kontraktion basiert auf intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung. Im Rahmen der Depolarisation kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen mit Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle. Es bildet sich ein Calcium-Calmodulin-Komplex mit einer nachfolgenden Kontraktion, bedingt durch: (1) Aktivierung der Myosin-Leitketten-Kinase (MLCK) und (2) Bindung an Caldesmon. Beide Vorgänge sind entscheidend für die Interaktion von Myosin- und Aktin-filamenten mit folglich Zellkontraktion. Für diese Interaktion wird Energie in Form von ATP benötigt.

Relaxation basiert auf einem Calcium-Efflux aus der Zelle und Transport ins sarkoplasmatische Retikulum. Ein Absinken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt über verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Mechanismen zur Myosin-Inaktivierung. Es erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle mit einem Kaliumefflux und Änderung des Membranpotentials in Richtung Re- oder Hyperpolarisation mit folglich Tonusabnahme.

## 1.2 Regulation des Gefäßtonus

### 1.2.1 Vasomotorik (flussabhängige Dilatation)

Arterien und Arteriolen sind in der Lage unabhängig vom Perfusionsdruck einen annähernd konstanten Fluß im Gefäßsystem aufrechtzuerhalten, indem sie auf eine Druckerhöhung mit Vasokonstriktion (**Bayliss-Effekt**) reagieren und auf eine Druckverminderung mit Vasodilatation (**flussabhängige Dilatation**). Man spricht auch von der sogenannten myogenen Autoregulation.

1902 entdeckte Bayliss diesen nach ihm benannten Effekt der myogenen Antwort im Sinne einer Vasokonstriktion durch zunehmende Flußstärke [10]. Dreißig Jahre später, 1932 entdeckte Schretzenmayr an der menschlichen Femoralarterie, dass Arterien unter zunehmendem Fluß dilatieren (**Schretzenmayr-Effekt**) [112].

Dem Gefäßendothel kommt dabei eine entscheidene Funktion zu, indem es Signale an die glatten Muskelzellen weiterleitet. Am Gefäßendothel sind dabei im Wesentlichen zwei Kräfte wirksam: 1.) die parallel zur Fließrichtung auftretende Scherkraft (tangentielle Scherkraft), welche von der Flußstärke und Viskosität der Flüssigkeit abhängig ist, und 2.) ein pulsabhängiger Zug, eine entlang eines zur Fließrichtung des Blutes senkrechten Vektors auftretende Kraft, welche vom arteriellen Blutdruck abhängt. Die Viskosität des Blutes  $\eta$  ist abhängig von Scherrate  $\gamma$  und Scherkraft  $\tau$ . Es gilt:

$$\eta = \tau / \gamma$$

Die Scherrate ist ein Geschwindigkeitsgradient zwischen Schichten einer sich bewegenden Flüssigkeit. Die Scherkraft (shear stress, Schubspannung) ist die tangential an der Gefäßwand ansetzende Kraft.

In geraden Gefäßabschnitten findet sich laminare Strömung; die höchste Strömungsgeschwindigkeit herrscht in der Gefäßmitte, Schichten nahe der Gefäßwand strömen langsamer wegen des stärkeren Reibungswiderstandes. In verzweigten Gefäßabschnitten herrscht turbulente Strömung. Hier ist der Flußwiderstand höher.

Furchgott et. al [40] beobachteten, dass die erreichte Gefäßdilatation unter Zugabe von Acetylcholin von der Intaktheit des Endothels abhängig ist. Sie entdeckten, dass direkt aus dem Endothel freigesetzte vasodilatatorische Substanzen wie „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF), Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacycline verantwortlich sind für die sogenannte flussabhängige Dilatation (FDD). Die FDD ist ein Produkt der myogenen Autoregulation, der vasoaktiven Wirkung physiologischer Substanzen und einer mechanischen Endothelstimulation (Steigerung der Wandschubspannung/shear stress) mit anschließender Freisetzung von EDRF und/oder Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) [41]. EDRF wurde später als NO identifiziert.

NO wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin unter Einwirkung von Sauerstoff und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) gebildet [97]. Als Abfallprodukt entsteht L-Citrullin. NO diffundiert aus dem Endothel in die glatte Muskelzelle und stimuliert dort die lösliche Guanylatcyclase, welche Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt. Dieses wiederum aktiviert die Proteinkinase G (PKG). cGMP bewirkt über eine Phosphorylierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eine vermehrte Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien der glatten Muskelzelle. Dadurch sinkt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, es kommt zu einer Hyperpolarisation mit nachfolgender Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße [40,41]. NO aktiviert darüberhinaus direkt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels) und ATP-abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels) über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP. Eine weitere wichtige NO-Wirkung ist die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{K}^+$ -Kanäle der glatten Muskulatur. Durch den Kaliumausstrom aus der Zelle kommt es ebenfalls zu einer Hyperpolarisation und Relaxation.

Durch shear stress vermittelt kommt es zu einem biphasischen Aktivierungsmuster der NO-Freisetzung: Der initiale schnelle Anstieg von NO erfolgt flußvermittelt und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängig, unabhängig von der herrschenden Scherkraft [36]. Bei anhalte-

nem Fluß erfolgt die kontinuierliche, basale NO-Freisetzung, welche calciumunabhängig, aber abhängig von der Schubkraft ist. Es ist die sogenannte plateauförmige Produktionsphase. Aufgrund des biphasischen Aktivierungsmusters wird bereits bei kleinen Flußstärken durch eine kontinuierliche basale NO-Freisetzung die über das sympathisch-adrenerge Nervensystem vermittelte Konstriktion aufgehoben. Liegt nun eine schwere Störung der Endothelfunktion vor, auch endotheliale Dysfunktion (ED) genannt, so kann dies zur Entstehung von Atherosklerose und deren kardiovaskulären Folgeerkrankungen führen [4,47]. Der zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismus ist: Durch ED geschieht eine unzureichende NO-Synthese und eine Inaktivierung von NO durch Superoxid-Radikale mit der Folge eines erhöhten Gefäßtonus und einer Gefäßwandhypertrophie, einer Thrombozytose und Monozytenadhäsion am Endothel [8].

Die eNOS, ein  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängiges Enzym ist in den Endothelzellen und kardialen Myozyten in einer speziellen plasmalemalen Signal-Transduktionsdomäne, den sog. Caveolae, lokalisiert. Das Enzym wird durch die Fettsäure Myristat und Palmitat acyliert und greift in Folge direkt an den Caveolae an [134]. Ein Angreifen an den Caveolae erleichtert die enzymatische Aktivierung der eNOS und nachfolgende Rezeptorstimulation.

In ruhenden Zellen ist die Enzymaktivität durch eine bestehende eNOS-Caveolin Komplexbindung gleich Null [35]. Caveolin ist das Baugerüstprotein der Caveolae. Durch Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dissoziiert eNOS von Caveolin ab und wandert ins Zytosol. Durch weitere Agonistenstimulation dissoziiert es zurück zur Zellmembran [82]. Durch Erniedrigung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geht eNOS erneut eine Bindung mit Caveolin ein, so dass der inhibierte Enzymkomplex in den Caveolae wiederhergestellt ist [35]. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass im Blut zirkulierende Substanzen die Signaltransduktionsprozesse in den Caveolae beeinflussen. Im Besonderen bestimmt HDL den Fettstatus in den Caveolae, indem es die Funktion von eNOS in dieser Domäne moduliert und eine direkte enzymatische Aktivierung über den Scavenger Rezeptor Typ B1 (SRB1) und Sphingosine-1-Phosphate (S1P) vermittelt [83,92].

Es kommt zur Phosphorylierung von eNOS durch die Proteinkinase C und Tyrosinkinasen und Aktivierung eines  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Ionenaustauschers [22, 24]. Eine Aktivierung der eNOS kann unabhängig von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung durch die Phosphorylierung von Ser(1177) erfolgen, es resultiert jedoch lediglich ein niedriger NO output. Hingegen geht die Agonist-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der eNOS mit einem high-output an NO einher [37]. Hier wird eNOS durch die Proteinkinase C und Tyrosinkinasen reversibel phosphoryliert. Zu einer eNOS-Aktivierung kommt es durch ff. Stimuli: Scherkraft, ein Abfall des  $\text{pO}_2 < 50 \text{ mmHg}$ ,

ein Abfall des pH-Wertes, mechanische Deformation und Pulsation. eNOS-Agonisten sind ATP, ACh, ADP/ATP, Bradykinin, Oxytocin, Histamin, Adenosin, Thrombin, NA, Serotonin, Lysophosphatidylcholin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Vasopressin, NF- $\beta$ , Substanz P, Östrogen, cAMP und cGMP-Analoga und Wachstumsfaktoren PDGF [4,7,61,89]. Es zeigt sich, dass shear stress und Zellproliferation die wichtigsten Faktoren für die Regulation der eNOS-Genexpression sind [5]. Phosphorylierung und subzelluläre Translokation (von plasmalem Caveolae zum Zytoskelett oder Zytosol) sind in diese Regulation involviert.

PGI<sub>2</sub> entsteht sowohl im Endothel als auch in den Myozyten. Es führt zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase, welche Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt und darüber hinaus eine Abnahme der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und resultierende Relaxation der glatten Muskelzelle bewirkt.

PGI<sub>2</sub> aktiviert K<sub>ATP</sub>-abhängige Kanäle durch eine Erhöhung des cAMP nach Bindung an den Zelloberflächenrezeptor. Beide Substanzen aktivieren zusätzlich delayed-rectifier K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>dR</sub> channels) durch Erhöhung des intrazellulären cAMP [73].

Neben shear stress ist die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der entscheidende Stimulus für die Freisetzung von NO bzw. PGI<sub>2</sub> [55]. Allerdings gibt es noch einen weiteren Faktor, welcher durch eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle zur Vasodilatation führt.

Es ist der sogenannte Endothelium-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF) [15,19,88]. Seiner Freisetzung liegt ff. Mechanismus zugrunde (s. Abb.1): Hormone und Autacoide mit Angriffspunkt am Endothelzellrezeptor oder shear stress führen zu einem G-Protein vermittelten intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und einer Phospholipase C (PLC)-vermittelten Hydrolyse von Inositolbisphosphat (IP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>), welches weiteres Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern freisetzt. Durch den erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Spiegel kommt es zu einer Aktivierung der eNOS mit NO-Produktion und Aktivierung der Phospholipase A2 zur Arachidonsäure (AA)-Freisetzung mit EDHF-Freisetzung. AA wird weiterhin umgewandelt in PGI<sub>2</sub> und Eikosatriensäure (EE). Durch eine Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen vermittelt durch den Ca<sup>2+</sup>-Anstieg oder durch EDHF (autokrine Funktion), kommt es zu einer Hyperpolarisation an der Membran. Die Hyperpolarisation verstärkt den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch einen erhöhten elektrochemischen Gradienten. Es kommt zur Relaxation.

Zwischen NO, PGI<sub>2</sub> und EDHF bestehen sowohl eine negative Feedback Hemmung als auch potente Interaktionen [91].

## Release of Putative EDHF's from Endothelial Cells

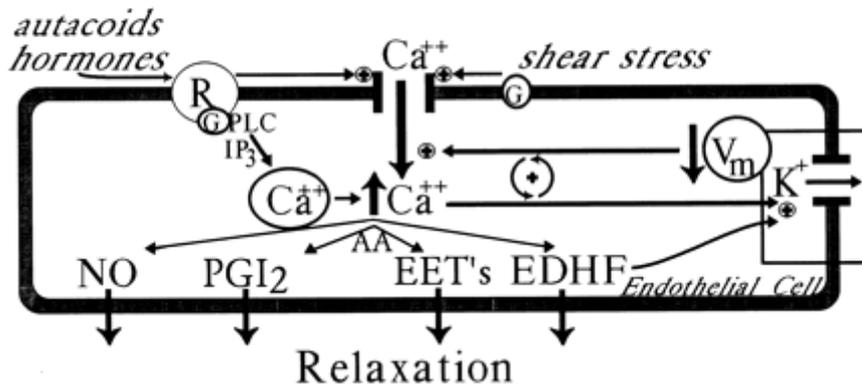


Abb 1: EDHF Freisetzung aus dem Endothel

Quelle: Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. Circulation. 1995 Dec 1;92(11):3337-49. Review.

Hecker postulierte 2000 [55], dass die o.g. Hyperpolarisierung der Membran die entscheidende Komponente für den Gefäßtonus ist und daraus der koronare Blutfluß folgt. In Zustandssituationen wie z.B. Arteriosklerose, Hypercholesterinämie oder Ischämie mit verminderter NO-Synthese und -Aktion wird die EDHF-Freisetzung durch lokale Stimuli (Hormone, Mediatoren, Transmitter) oder pulsierende Dehnung (shear stress) zum Reservemodulator des Gefäßtonus. Dies garantiert die Aufrechterhaltung des myokardialen Blutflusses [55,83,84].

### 1.2.2. Vasokonstriktion

Der Gefäßruhetonus wird vor allem durch die Spontanaktivität vasokonstriktiver glatter Muskelzellen bestimmt. Er wird bestimmt durch die Wechselwirkung sympatho-adrenerger Neurone und den durch lokale Einflüsse resultierenden Basaltonus.

#### 1.2.2.1 Endothelzellabhängige Vasokonstriktion

Von den Endothelzellen produziert werden auch Vasokonstriktoren wie die Substrate der Endothelin (ET)-Peptide [133]. Das aktivste Endothelin ist das Endothelin-1. Takawa beschrieb 1989 [124], dass ET rezeptorvermittelt die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und durch zusätzliche Freisetzung von IP<sub>3</sub> und 1,2-Diacylglycerol (DAG) zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> führt. Zusätzliches Ca<sup>2+</sup> wird aus extrazellulären Speichern mobilisiert [124] mit nachfolgender Vasokonstriktion. 1990 postulierte Miyauchi, dass ET über eine Aktivierung spezieller spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu einer Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms und somit Vasokonstriktion führt [86].

Shear stress und bestimmte Mediatoren wie Thrombin, Epinephrin, Angiotensin II, Wachstumsfaktoren, Zytokine and freie Radikale erhöhen die ET-1 Sekretion.

Hingegen hemmen Mediatoren wie NO, cGMP, atriales natriuretisches Peptid (ANP) und Prostazyklin die ET-1 Freisetzung [80]. Auch im Rahmen diverser Krankheitsbilder, die mit

einem Endothelschaden einhergehen, wie z.B. Arteriosklerose, pulmonale Hypertension, das akute Nierenversagen, der kardiogene Schock oder die subarachnoidale Blutung, wird ET vermehrt freigesetzt [65].

### **1.2.2.2 Myogene Vasokonstriktion (Bayliss-Effekt)**

Blutgefäße antworten auf eine transmurale Druckerhöhung mit einer Vasokonstriktion, dieser Effekt wurde 1902 von Bayliss entdeckt und nach ihm benannt (s. Kapitel 1.2.1 Vasomotorik, flussabhängige Dilatation).

### **1.2.2.3 Neurogene Vasokonstriktion**

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin regulieren den Gefäßtonus durch eine Bindung an adrenerge Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen. Sie werden direkt aus postganglionären sympathischen Nervenendigungen im Bereich der Media und Adventitia freigesetzt bzw. erreichen ihren Wirkort über die Blutbahn. Noradrenalin bewirkt über eine Interaktion mit  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren an der Plasmamembran glatter Muskelzellen eine schnelle, transiente Depolarisation und damit Zunahme des Muskeltonus (Vasokonstriktion). Adrenalin kann sowohl über  $\alpha$ -Rezeptoren in analoger Weise wirken, oder aber über  $\beta$ -Rezeptoren eine Hyperpolarisation und damit Vasodilatation bewirken. Weitere vasokonstriktorisch wirkende Substanzen sind ATP und Neuropeptid Y. Für die Blutdruckregulation ist im Wesentlichen der Sympathikus verantwortlich. Der Parasympathikus hat eher eine Wirkung auf die Herzfrequenz als auf den Blutdruck.

### **1.2.3 Zyklische Nukleotide cAMP und cGMP und ihr Einfluß auf die Vasomotorik**

cAMP und cGMP sind Derivate des ATP und GTP (s. Abb. 2). Die Synthese beider Nukleotide erfolgt intrazellulär unter Pyrophosphatabspaltung durch die Einwirkung spezifischer Cyclasen, nämlich der Adenylatcyclase und Guanylatcyclase, welche zuvor durch G-Proteine oder NO aktiviert worden sind [76]. Durch beide Nukleotide kommt es zu einer Aktivierung spezifischer Proteinkinasen mit Phosphorylierungsmechanismen, welche zu einem Absinken der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Hyperpolarisation der Zelle und Dilatation führen. Durch Phosphorylierungsmechanismen werden biologische Prozesse in Gang gesetzt, aufgrund derer sich Änderungen von Ionenflüssen, Membrandurchlässigkeiten, Myokardkontraktibilität und –metabolismus ergeben können. Die Phosphorylierung sarkolemmgebundener Calciumkanäle wirkt sich beispielsweise auf die Kanalfunktion (Offenwahrscheinlichkeit) und damit auf den kontraktile Zustand der Herzmuskulatur aus. cAMP und cGMP dienen somit

als wichtige intrazelluläre Signalmoleküle (second messengers) und haben weiterhin entscheidende Funktionen in der Regulation des Zellstoffwechsels, des Wachstums und der Differenzierung [76].

Die Phosphodiesterasen PDEs bewirken den Abbau von cAMP und cGMP. Durch eine Inhibition dieser Enzyme können hingegen der cAMP- und cGMP-Spiegel angehoben werden und die nachgeschalteten Effekte gesteigert werden. Ein alleiniger Anstieg von intrazellulärem cAMP wirkt positiv inotrop. Ein gleichzeitiger Anstieg von cAMP und cGMP reduziert den positiv inotropen Effekt von cAMP allein. Dabei wirken cAMP und cGMP synergistisch, gefäßerweiternd [120].

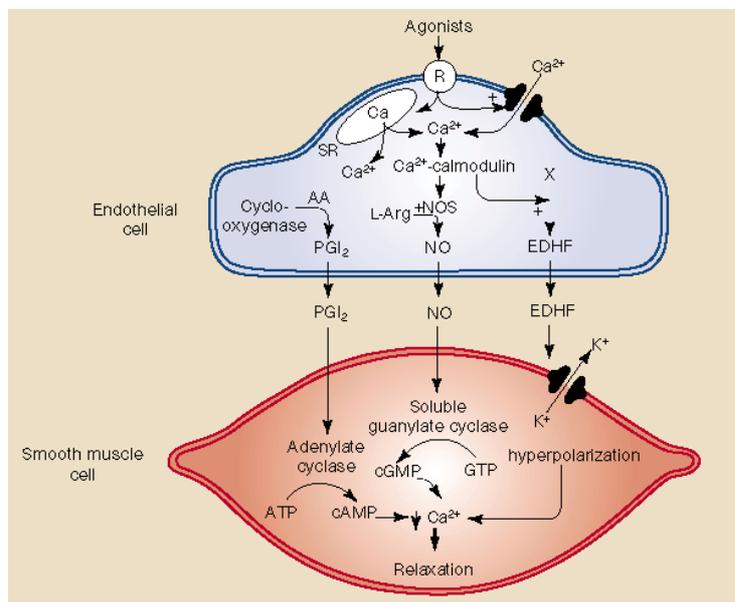


Abb 2:  
Einfluß der zyklischen Nukelotide auf die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur

PGI<sub>2</sub> aktiviert die Adenylatcyclase mit cAMP Produktion, NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclase mit Produktion von cGMP. EDHF führt zu einer Öffnung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle in glatten Gefäßmuskelzellen mit der Folge einer Hyperpolarisation. cAMP und cGMP führen beide zu einem Absinken des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> mit der Folge einer Relaxation.

Quelle: Vanhoutte PM, Vascular biology: Old-timer makes a comeback, Nature 396, 213-216(19 November 1998)

Calcium ist für die Kontraktion glatter Muskulatur essentiell. Es vermittelt an Calmodulin gebunden die Deblockade des Caldesmon am Aktinfilament. Durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) vermittelt kommt es zu einer Myosinphosphorylierung mit einem Ineinanderschieben von Myosin- und Aktinfilamenten und damit verbundener Verkürzung der Muskelfaser zur Muskelkonstriktion. Die MLCK muß allerdings vorher eine Bindung mit Ca<sup>2+</sup>-beladenem Calmodulin eingehen. Zur Erschlaffung der Muskelfaser kommt es durch die Proteinkinase-A-(PKA)-vermittelte Phosphorylierung der MLCK, die dadurch unempfindlich gegenüber dem Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex wird. Dies erfolgt ohne eine Erniedrigung des zytosmatischen Ca<sup>2+</sup>[66].

Die intrazellulären Botenstoffe cAMP und cGMP beeinflussen die Gefäßmuskulatur in vierfacher, spezifischer Weise:

(1) Sie aktivieren die cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Proteinkinasen A und C mit konsekutiven Phosphorylierungsvorgängen, welche zu einem Absinken des intrazellulären Calcium

führen. Es kommt zu einer Hyperpolarisation und Relaxation [131].

## (2) Calcium-(De)sensitivierung

cGMP (und in geringem Maße auch cAMP) führt über Proteinkinaseaktivierung, im speziellen der cGMP Proteinkinase Typ I (cGKI) zu einer Phosphorylierung und damit Hemmung der Rho-Kinase-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Dieser Prozeß wird auch als Calcium-Desensitivierung [130] bezeichnet. cAMP führt über eine Proteinkinaseaktivierung zu einer Phosphorylierung der Myosinleichtkettenkinase mit ausbleibender  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Aktivierung.

(3) Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cG-PKI) relaxiert glatte Muskelzellen möglicherweise durch eine Phosphorylierung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-assoziierten cGMP-Kinase-Substrats (IRAG). IRAG vermindert eine hormon-induzierte  $\text{IP}_3$ -abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Die cGMP abhängige Relaxation und die hormonrezeptorgetriggerte Kontraktion der glatten Muskulatur ist abhängig von einer Interaktion der cG-PKI-IRAG mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor [43].

(4) Natriumnitroprussid (SNP) als NO Donor stimuliert die Aktivität der löslichen GC und erhöht dadurch den cGMP-Spiegel. SNP stimuliert ebenfalls konzentrationsabhängig die Phosphorylierung der GC. Eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes führte zu einer erhöhten konzentrationsabhängigen GC-Phosphorylierung. Eine erhöhte GC-Phosphorylierung führte zu einer gehemmten SNP-vermittelten Aktivität der löslichen GC und cGMP-Bildung. Es besteht also ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen der Hemmung der löslichen GC-Aktivität und der Proteinkinase-abhängigen Phosphorylierung und damit cGMP-Bildung [89].

## 1.3. Lipoproteine – HDL

### 1.3.1. HDL Allgemein

Lipoproteine fungieren als Transportvehikel der Lipide im menschlichen Körper. Ihr innerer Bereich besteht aus einem lipophilen Kern, aufgebaut aus Triacylglyceriden, Cholesterinestern (CE) und fettlöslichen Vitaminen. Ihre äußere „Schale“ hingegen besteht aus Cholesterin, hydrophilen Phospholipiden und Apolipoproteinen. Die Apolipoproteine tragen zum Transport der Lipide im Blut und zu ihrer Strukturgebung bei und treten in Wechselwirkung mit den Rezeptoren und Enzymen des Lipidstoffwechsels.

Man unterscheidet fünf Lipoproteine hinsichtlich ihrer Größe, Dichte und den Apolipoproteinen: Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL.

High-density lipoprotein (HDL) ist ein triacalglycerin-armes und Cholesterin- und Phospholipid-reiches Lipoprotein hoher Dichte; diese liegt zwischen 1,063 und 1,210 g/mL. Der Durchmesser eines HDL-Partikels variiert zwischen 5 und 12 nm. Ein HDL-Teilchen ist wie in Abb.3 aufgebaut. Die Zusammensetzung der Bestandteile des HDL in Massenprozent ist ff: 40-55% Protein, 3-4% Cholesterin, 12% Cholesterinester, 3-5% Triglyceride, 22% Phospholipide [119]. Die Zusammensetzung der Apolipoproteine des HDL in Prozent beträgt wie folgt: Apo A-1 63%, Apo A-2 17%, Apo B 4%, Apo C 10%, Apo D 3% und Apo E 3%.

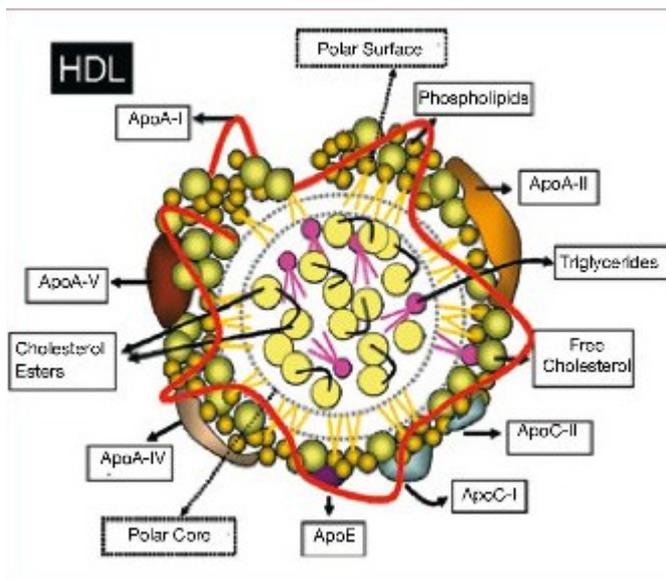


Abb 3: HDL-Aufbau

Aus:  
Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. Rev Esp Cardiol. 2009 Oct;62(10):1161-78. Review

Die HDL-Biogenese und der Katabolismus ist etwas komplex (s. Abb. 4):

(1) Das ATP-Binding Cassette Transporter Protein A1 (ABCA-1), ein zelluläres Lipidtransportmolekül mit Hauptlokalisation in Brustgewebe, Leber, Nebenniere und Testes vermittelt in der Leber den Transfer von zellulären Phospholipiden (PL) und freiem Cholesterin (FC) zu extrazellulärem, lipid-armen Apolipoprotein A-1. Desweiteren binden PL und FC von Plasmamembranen an Apo A-1 [121].

(2) Im Plasma erfolgt die Umformung zu diskoidalem HDL.

(3) Das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert diskoidales HDL zu sphärischem HDL ( $\alpha$ -HDL) = reifes HDL. Das im Rahmen dieser Reaktion gebildete Lyso-phosphatidylcholin diffundiert ab, und es wird sogenanntes HDL3 gebildet. In die dadurch entstehenden Lücken kann weiteres Cholesterin eingelagert werden, wodurch sich HDL1 und 2 bilden [78].

Die klinische Bedeutung der unterschiedlichen HDL-Subfraktionen ist unklar. Einige Studien zeigten, dass die HDL2 Subfraktion und Apo-A1 bessere Prädiktoren koronarer Atherosklerose sind als das Gesamt-HDL oder HDL3 [110]. Im Gegensatz dazu haben die Physicians Health Study und andere Studien die gleichen Assoziationen für Gesamt-HDL und HDL3 mit KHK wie für HDL2 und ApoA1 gezeigt. Der Mechanismus ist der reverse Cholesteroltransport. Andere Studien zeigten, dass kleine HDL-Partikel mit einem geringeren KHK-Risiko assoziiert sind. Zusammenfassend besteht eine Inkonsistenz der Daten.

(4) Der Scavenger Rezeptor Klasse B, Typ I (SRBI) vermittelt die selektive Aufnahme der HDL2-Cholesterinester und Lipide vom Plasma in die Leber. Dieser Mechanismus wird auch als „direkter reverser Cholesteroltransport“ bezeichnet (RCT). Es bleibt lipidarmes ApoA1 zurück, welches glomerulär filtrierte und via Endozytose in den proximalen Tubulus sezerniert wird. Von dort beginnt die HDL-Formation aufs Neue [138].

SR-BI ist ein 82 kDa Membranglykoprotein mit einer extrazellulären und zwei transmembranalen Bindungsdomänen. Es ist in der Leber lokalisiert, in steroidhormonbildenden Organen, im Gehirn, Darm, im Makrophagen, endothelialen Zellen und Astrozyten. SR-BI ist an die Caveolae assoziiert und [38] bindet unterschiedliche Liganden wie HDL, Apo A1 und ApoE, VLDL und LDL. Es ist bekannt als erster identifizierter HDL-Rezeptor. SRBI vermittelt die Bindung der CE an Gallensäuren mit biliärer Exkretion.

(5) Ein Teil der CE und Phospholipide wird durch die hepatische Lipase (HL) und endotheliale Lipase und Lipoprotein-Lipase (LPL) aus dem HDL hydrolysiert. Das Cholesterinester-Transfer-Protein (CETP) vermittelt die Bindung des veresterten HDL-Cholesterols an Apo-B-reiches VLDL und die Umformung in LDL. Dieses wird über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen. Dieser Vorgang ist der so genannte „indirekte, reverse Cholesterintransport“.

Zusätzlich kann HDL wie auch andere Lipoproteine an Heparansulfat-Proteoglykane binden, und zwar über positiv geladene Aminosäurereste seiner Apolipoproteine. Die Bindung verhindert ein Andocken des LDL und die Proteoglykan/LDL-Komplexformation.



- HDL aktiviert durch Bindung an den „Scavenger Rezeptor-BI“ die NO-Synthase und stimuliert somit die NO-Synthase und -Freisetzung. Es folgt die Vasodilatation [14, 83,84]. Dieser Prozeß ist vom Vorhandensein des Apo A-I, nicht jedoch Apo A-II, abhängig [137,144].
- HDL induziert die Vasodilatation über eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung und eine Akt-vermittelte Phosphorylierung der eNOS [92] sowie über eine Erhöhung der intrazellulären Ceramid-Konzentration [74].
- HDL schützt vor einer LDL Oxidation und erhöht die antioxidierende Kapazität des Plasmas [92].
- Die HDL-und Lysophospholipid-vermittelte Sphingosylphosphorylcholin(SPC)-Sphingosine-1-Phosphat (S1P)-, und Lysosulfatid (LSF)-Vasodilatation erfolgt über dessen Bindung an den S1P3-Rezeptor [92].
- HDL trägt zur Synthese von gefäßrelaxierenden Prostanoiden, im speziellen Prostaglandin  $E_2$  und/oder  $I_2$ , in Anwesenheit der Arachidonsäure bei [38].

Für HDL existieren geschlechtsspezifische Unterschiede, am ehesten bedingt durch eine Interaktion geschlechtsspezifischer Hormone mit dem Partikel, und damit Einflußnahme auf die HDL-Effekte am Gefäßsystem.

In epidemiologischen Studien konnte ein reduziertes Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen bei prämenopausalen Frauen im Vergleich zu Männern gezeigt werden [48]. Kürzlich entdeckte man, dass weibliches HDL gegenüber dem männlichen HDL einen stärker vasodilatatorischen Effekt besitzt; verantwortlich dafür ist das HDL-assoziierte Estradiol, welches in der Lage ist, die eNOS zu stimulieren und eine Vasodilatation zu bewirken [48,92].

Viele Studien [68,94,104,105] konnten in den letzten Jahren zeigen, dass die Wirkungen von HDL auf das Gefäßsystem hochgradig heterogen sind und die vasoprotektiven Eigenschaften des HDL verändert sind bei Patienten mit manifesten kardiovaskulären Erkrankungen oder einem erhöhten kardiovaskulären Risiko. Die genauen Mechanismen dieser „Dysfunktionalität des HDL“ sind Gegenstand aktueller Forschung.

Akute oder chronische Entzündung kann zu grundlegenden Veränderungen der HDL-Funktionalität dahingehend führen, dass es zu einem pro-inflammatorischen Partikel wird. Durch den Wegfall seiner Endothel-protectiven Funktion führen die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren zu einer pathologisch veränderten Endothelzellfunktion in den Arterien mit Folgeerkrankungen. Aus einem anti-atherogenen Partikel kann somit ein pro-atherosklerotisches Agens werden [105].

#### **4. Apolipoprotein E**

Das Apolipoprotein E ist ein 34,2 kDa schweres Protein, welches eine 22 kDa N-terminale Rezeptorbindungsdomäne und eine 10 kDa C-terminale Lipidbindungsdomäne besitzt [108]. Lokalisiert ist es auf dem Chromosom 19 (19q13.2) [37]. Es ist ein Proteinbestandteil vieler Lipoproteine, wie z.B. der Chylomikronen, der VLDL- und HDL-Partikel. Es fungiert als Ligand des gewebes- und leberspezifischen LDL-Rezeptors und des leberspezifischen ApoE-Rezeptors und spielt somit eine wesentliche Rolle im Lipoproteinmetabolismus [37].

Das Apolipoprotein trägt im Wesentlichen zur Cholesterol-Plasma Homöostase bei, indem es die hepatische Aufnahme der Lipoproteinremnants erleichtert. Für die Lipoprotein-Clearance ist im Plasma eine bestimmte Höhe der ApoE-Konzentration erforderlich. Eine Überexpression kann zum Auftreten von bestimmten Erkrankungen führen [29].

Apolipoprotein E wird in der Leber, den Makrophagen, Monozyten, Astrogliazellen und im peripheren und zentralen Nervensystem gebildet. Es gelangt ins Plasma überwiegend gebunden an Lipoproteine. Es ist ein multifunktionelles Protein mit Wirkungen im Bereich der zerebralen Funktionen [69], im Bereich der Nervenregeneration [54], der Immunantwort [62], der Zellproliferation [58], der Homöostase [103], der Steroidgenese [102] und in Situationen oxidativen Stresses [85]. Es ist stark assoziiert mit Erkrankungen des kardio- und neurovaskulären Systems (M. Alzheimer) [100,123], mit der Cholelithiasis [126], mit dem kolorektalen Karzinom [64] und hat einen Einfluß auf das Verhalten der Plasmalipide [31]. Interessanterweise sind viele Effekte des Apo-E geschlechtsspezifisch.

Polymorphismen innerhalb des humanen ApoE-Gens führen zu drei vorkommenden Isoformen, E2, E3 und E4. Diese unterscheiden sich lediglich in einer Aminosäuresequenz [51]. Ausgehend von den 3 Isoformen existieren 6 Phänotypen: E3/E3, E3/4, E2/3, E4/4, E2/4 und E2/E2. Ihre Verteilung ist bevölkerungsspezifisch unterschiedlich. Bei den Kaukasiern kommen die drei Isoformen e2, e3 und e4 mit der Häufigkeit 7%, 78% und 14% vor [25].

Man geht davon aus, dass apoE2 eine geringere LDL-Rezeptorbindungsaffinität besitzt, welche zu einer verzögerten Clearance der apoE2-tragenden Lipoproteine im Plasma führt. Somit haben Träger des E2-Allels in der Regel niedrigere TC und LDL-C-Werte. Homozygote Träger des apoE2 können unter bestimmten Bedingungen eine Dyslipoproteinämie Typ III mit hohen VLDL-Cholesterinwerten entwickeln.

Apo E4 besitzt eine höhere Rezeptoraffinität als E3, es wird somit schneller degradiert. Es kommt zum gesteigerten Katabolismus der E4-tragenden Partikel mit einer Down-Regulation

der LDL-Rezeptoren. Träger dieses Allels haben höhere Werte von TC und LDL-C [25]. Das ApoE4-Allel ist mit Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen assoziiert [26].

Dallongeville zeigte in der EARS II-Studie, dass die Häufigkeit des E4-Allels höher war in europäischen Populationen mit einem hohen KHK-Risiko, jedoch niedriger in Populationen mit geringerem Risiko [26,27]. Davignon et al. berichteten ebenfalls über einen Zusammenhang zwischen ApoE4-Allel und einer erhöhten KHK-Häufigkeit [25,33]. Stengard et al. konnten in einer großen, longitudinalen finnischen Studie eine enge Beziehung zwischen KHK-Mortalität und ApoE4-Allel aufzeigen [122]. Doch nicht nur in Finnland, sondern in Gesamteuropa existiert ein Gefälle mit höherem ApoE4-Allelvorkommen und höherer KHK-Prävalenz z.B. in Nordeuropa und geringerem ApoE4-Vorkommen und niedrigerer KHK-Prävalenz z.B. in Südeuropa [25,45].

Der höhere LDL-C Spiegel bei ApoE4-Trägern wurde viele Jahre für die Pro-Atherogenität verantwortlich gemacht. Inzwischen geht man jedoch davon aus, dass E4 ein KHK-Risikofaktor unabhängig vom LDL-C ist.

Das ApoE4-Allel ist zusätzlich mit Demenz, insbesondere den „late-onset“ Formen des Morbus Alzheimer (AD) assoziiert. Dies liegt am ehesten an einer Beeinflussung des Gefäßtonus durch ApoE. Die vaskuläre Hypothese der Alzheimer-Demenz begründet sich auf der Annahme, dass pathologische Gefäßveränderungen zur reduzierten zerebralen Durchblutung führen, welche zu bleibenden Funktionsausfällen des hypoperfundierten Gewebes führen. Für die Pathogenese der AD sind in diesem Zusammenhang mikrovaskuläre Infarkte und eine Gefäßwandverkalkung beschrieben worden [6]. Laut Aliev et al. führt NO-abhängiger oxidativer Stress mit mitochondrialen und DNA-Schädigungen zur AD-Entwicklung [3].

Eine erhöhte Expression des E3-Allels ist mit der Hypertriglyceridämie assoziiert.

Der Apo E3/2-Genotyp ist mit einem erhöhten Carotidenatheroskleroserisiko assoziiert [28].

Die seltene Form der familiären Hyperlipoproteinämie des ApoE-Defektes wurde erstmals 1981 durch Ghiselli & Schaefer beschrieben [46]. Bei den erkrankten Individuen konnte kein ApoE im Plasma gefunden werden. Dies war mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert wie Dyslipidämie, Arteriosklerose, M. Alzheimer und einer erhöhten Mortalität [87]. In der Literatur beschrieben wird eine familiäre Form des ApoE-Defizites, welche bei den Betroffenen mit einer Trias aus frühzeitiger kardiovaskulärer Erkrankung, dem Vorhandensein von Xanthomen und einer Hyperlipoproteinämie Typ III (HLP) einhergeht. Das Vererbungsmodell war autosomal rezessiv [111]. Das Fehlen von ApoE im Mausmodell (Knockout-Mäuse) führte auch verstärkt zu Hypercholesterinämie und Arteriosklerose [16,99]. Eine „Re-Expression“ dieses Proteins bei den Mäusen konnte das Erkrankungsmaß nachhaltig posi-

tiv beeinflussen. Dabei war die leberspezifische Expression von ApoE bei diesen Mäusen ausreichend für eine hochgradige Atheroskleroseprävention [51,65].

ApoE spielt synergistisch zum HDL eine schützende Schlüsselrolle im Prozess der Arteriosklerose [23] durch drei relevante Mechanismen: Erstens, indem es wie o.g. zur Plasma-Cholesterolemie beiträgt. Zweitens erleichtert es zusammen mit Apo A-I den Cholesterolefflux aus der Makrophagen-Schaumzelle in die arteriosklerotische Läsion. Zudem kann ApoE anti-inflammatorisch wirken, indem es direkt die Immun- und Entzündungsreaktion im Rahmen der Atherosklerose modifiziert. Und viertens wirkt ApoE anti-oxidativ [26].

Die anti-, aber auch pro-atherogene Wirkung des ApoE wird vor allem durch seine Isoform beeinflusst.

Apo E befindet sich im Plasma als Komponente des diskoidalen HDL, es ist inkorporiert ins HDL als sogenanntes „spherical HDL“ bzw. „HDL-E“ [108]. In dieser Form trägt es im Wesentlichen zur Cholesterolemie bei, indem es die hepatische Aufnahme der Lipoproteinremnants bewirkt. Im Tierexperiment mit Wild-Typ-Mäusen konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass HDL-gebundenes ApoE den SR-BI-Rezeptor aktivieren kann. Hierbei war die Amino-terminale Region von ApoE entscheidend sowohl für die Rezeptor-Bindung als auch für den Cholesterolemie-Efflux [18]. ApoE kann zudem die LCAT aktivieren.

### **1.5 Ziel der Arbeit (Arbeitshypothese)**

Diese Arbeit untersucht die Wirkung der unterschiedlichen HDL-ApoE-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation menschlicher Koronararterien. Es wurde die mechanische, biochemische und elektrophysiologische Gefäßantwort für Präparate mit intaktem Endothel und von de-endothelialisierten Präparaten registriert. Epidemiologischen Studien zufolge ist ein hoher LDL-C- und ein niedriger HDL-C-Plasmaspiegel mit einem höheren Atheroskleroserisiko behaftet [9]. HDL gilt klassisch als atheroprotektives, LDL hingegen als ein pro-atherogenes Lipoprotein. Neuere Untersuchungen weisen jedoch eher auf heterogene HDL-Effekte hin [68], insbesondere im Rahmen akuter oder chronischer Entzündungsreaktionen, wie z.B. bei der Atherosklerose. HDL wirkt dann eher pro-inflammatorisch. Gegenstand aktueller Forschung ist die Untersuchung dieses dysfunktionalen HDL. Ein wichtiger Bestandteil des HDL ist das Apo E. Beide wirken direkt am Endothel und mediatorvermittelt vasodilatatorisch [92].

Träger des ApoE4-Allels weisen allerdings laborchemisch höhere TC- und LDL-C-Werte auf und haben ein höheres Atheroskleroserisiko. Eine Abschwächung der HDL-vermittelten FDD unter dem Einfluß bestimmter ApoE-Isoformen ist Ziel der Untersuchung. Die vorliegende Dissertation stellt somit die Hypothese einer anti-atherogenen, endothelprotektiven HDL-

Funktionalität durch neue Erkenntnisse des Zusammenspieles zwischen bestimmten Apolipoprotein-E-Isoformen und HDL in der Gefäßmodulation auf den Prüfstand.

## **2 Material und Methoden**

Die Versuche erfolgten *in vitro* an isolierten humanen Segmenten des Ramus interventricularis anterior oder Ramus circumflexus der Arteria coronaria sinistra oder der Arteria coronaria dextra.

### **2.1 Methoden**

#### **2.1.1 Explantation und Präparation der Koronararterien**

Die menschlichen Koronararterien stammten von herztransplantierten Patienten aus dem Deutschen Herzzentrum. Das positive Votum der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin liegt im Deutschen Herzzentrum Berlin pauschal vor. Der größte Teil der Präparate stammte von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und schwerer KHK. Es erfolgte kein Ausschluß von Patienten aus der Studie aufgrund bestimmter Vorerkrankungen, Alter, Geschlecht und Vormedikation. Im Anschluß an die Explantation des Empfängerherzens erfolgte die sofortige Präparation und Entnahme eines 8-10 cm langen Gefäßsegmentes der A. coronaria. Währenddessen befanden sich die Präparate in gekühlter, isotoner NaCl-Lösung. Die Präparate wurden anschließend lichtgeschützt, in gekühlter Krebs-Lösung sofort ins Labor gebracht.

#### **2.1.2 Feinpräparation und Äquilibrierung der Koronararterien**

Im Labor erfolgte die Feinpräparation des Koronararteriensegmentes in erwärmter, mit Sauerstoff angereicherter Krebslösung. Nach Entfernung des perivaskulären Bindegewebes wurde das Gefäßstück in 18 ca. 0,5 cm lange Einzelstücke geschnitten. Diese wurden anschließend für zwei Stunden in carbogenisierter Krebs-Lösung äquilibriert. Gefäßabschnitte, die stark atherosklerotisch oder mit Stents versehen waren oder direkt aus dem Bereich einer Gefäßabzweigung stammten, wurden nicht verwendet.

### **2.2 Lösungen und Substanzen**

#### **2.2.1 Krebs-Lösung, Carbogen-Gemisch**

Krebs-Lösung (Konzentrationen in mmol/L): Na<sup>+</sup> 151,16, K<sup>+</sup> 4,69, Ca<sup>2+</sup> 2,52, Mg<sup>2+</sup> 1,1, Cl<sup>-</sup> 143,42, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 16,31, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,38, Glucose 7,77; Carbogen – Gemisch: O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%

#### **2.2.2 Lipoproteinlösungen**

Verwendet wurden Blutproben von gesunden menschlichen Spendern, welche keine, die Lipidkonzentration im Blut beeinflussenden, Medikamente oder antioxidative Vitamine ein-

nahmen und 10 Tage lang gefastet hatten [75a]. Diese wurden in Reagenzien mit EDTA (1 mg EDTA/mL Blut) für 2 Stunden im Halbdunkeln versetzt. Anschließend wurde durch Zentrifugierung (2500 U/ 6 min) Plasma gewonnen, welches vorsichtig abpipettiert wurde. In einem weiteren Schritt konnten die einzelnen Lipoprotein-Fractionen isoliert werden mit Hilfe der Optima™ TLX Ultrazentrifuge mit Rotor TLA-120.2 der Firma Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA bei einer Geschwindigkeit von 120 000 rpm (625000 x g) und bei einer Temperatur von 18°C.

Die Dichtemedien wurden zuvor mit Argon entgast und gereinigt, um die vollständige Deoxygenierung sicherzustellen. Eine unterschiedliche Zentrifugationsdauer und verschieden dichte Medien waren für die Isolation der einzelnen Lipoproteine notwendig, und zwar wie folgt: 260 min und 1,21 kg/L für HDL, 150 min und 1,063 kg/L für LDL und 30 min und 1,006 kg/L für VLDL. Der Überstand, bestehend aus mit Lipoproteinen angereicherter Flüssigkeit, wurde mit feinen Pipetten aspiriert. Zur Verhinderung einer Oxidation erfolgte ein Abfüllen in kleine Glasröhrchen unter kontinuierlicher Stickstoffbegasung. Zuletzt durchliefen die Lipoproteinfraktionen eine Gelfiltration zur Entfernung von Kupferionen und EDTA. Für die Verdünnung verwendeten wir entgaste Krebslösung mit einem pH-Wert von 7,35. Entsprechend den physiologischen Blutkonzentrationen wurde die Endkonzentration der Lipoproteine wie folgt gewählt: HDL 50 mg/dL, LDL 100 mg/dL, IDL 10 mg/dL, VLDL 30 mg/dL.

### **2.2.3 Apo E-Genotypisierung**

Es erfolgte eine Genotypisierung der Probanden mittels Erzeugung eines Amplifikates und anschließender Schmelzpunktanalyse. Für die Versuche mit gepooltem HDL wurden die Proben unterschiedlicher Individuen verwendet. Für die Versuche mit HDLapoE4/E4 und HDLapoE0/E0 wurden die Proben jeweils eines genotypisierten Patienten verwendet.

## **2.3 Meßmethoden**

### **2.3.1 Messung des Tonus**

Die verwendeten Lösungen wurden über einen Wärmeaustauschkreislauf direkt in die Meßkammer geleitet [68a,72a]. Über ein ca. 5 cm vor der Meßkammer liegendes Schraubventil wurde die Flußrate stufenweise manuell eingestellt. Nach Neueinstellung der Flußrate erfolgte eine Kontrolle mit Hilfe eines Messzylinders und einer Stoppuhr. Alle zehn Minuten wurde die Flußrate von 3, 5, 20 ,40 auf 100 mL/min erhöht.

Für die Flussmessung wurden die Präparate mit der Endothelseite nach oben mit zwei Plexiglas-Schraubklemmen in der Meßkammer fixiert. Die eine Seite des Gefäßstückes war direkt

mit der Meßkammer, die andere Seite mit dem Meßarm eines induktiven Kraftaufnehmers verbunden. Der Meßweg des Kraftaufnehmers betrug weniger als 100 µm, so dass die Messung bei einer maximal möglichen Verkürzung des Gefäßabschnittes um etwa 1% der Gesamtlänge nahezu isometrisch erfolgte. Der Gefäßtonus in g (1g entspricht 9,81 mN) konnte als Signal dieses isometrischen Kraftmessers direkt auf einem digitalen Messverstärker (KWS 522.C; CMS 32, KS2C, Hottinger Baldwin, Darmstadt) abgelesen werden. Zusätzlich wurden alle Daten elektronisch aufgezeichnet. Vor Versuchsbeginn wurde der Kraftmesser mit Gewichten von 1-10 g geeicht.

### **2.3.2 Versuchsdurchführung**

Die Präparate wurden jeweils vor Versuchsbeginn longitudinal aufgeschnitten. Dadurch entstanden Präparate von 10-15 mm Breite und 5 mm Länge. Die Kontrollversuche an Präparaten mit und ohne Endothel wurden in Krebslösung durchgeführt. Bei den Versuchen ohne Endothel wurde dieses vorsichtig mit einem im 20-30° Winkel aufgesetzten Skalpell abgeschabt [111a]. Anschließend wurden die Präparate unter einem konstanten Fluß von 3 mL/min mit dem Endothel obenliegend in der Meßkammer eingespannt. Die eine Seite des Präparates war über eine Plexiglasschraubklemme direkt mit der Meßkammer, die andere Seite mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden. Zu Versuchsbeginn erfolgte 5 Minuten lang eine Vorspannung der Präparate stufenweise (um 0,4 g) auf 2,000 g. Für weitere 5 Minuten wurde der Tonus konstant bei 2 g gehalten und die Messung begann. Alle fünf Minuten wurden Gefäßtonus oder Membranpotential gemessen. Alle zehn Minuten wurden die Flußraten von 3, 5, 20, 40 auf 100 mL/min erhöht. Die Versuchsdauer pro Segment betrug 60 min. Am Versuchsende wurden die Präparate bei einem maximalen Fluß von 100 mL/min ausgespannt und in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) für die Bestimmung von cAMP und cGMP eingefroren.

### **2.3.3 Stress-Relaxation**

Der Tonus des Gefäßabschnittes ändert sich bei allen Versuchen, auch unabhängig vom Fluß, aufgrund der sogenannten stress-relaxation. Um die FDD unabhängig von der stress-relaxation messen zu können, erfolgte zu jedem Versuch ein Kontrollversuch mit einem konstanten Fluß von 3 mL/min unter gleichen Bedingungen. Durch die Subtraktion vom Gesamteffekt erhielten wir die „korrigierten Kurven“.

## **2.4 Intrazelluläre Membranpotentialableitung**

### **2.4.1 Mikroelektroden**

Das intrazelluläre Membranpotential wurde mit Hilfe von Glasmikroelektroden, die mit

3 molarer KCl-Lösung gefüllt waren, bestimmt. Die Glaselektroden (Pyrex Brand K 2916, Corning Glass: Außendurchmesser 3 mm, Innendurchmesser 1,8 mm) wurden mit einem Horizontalpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Indianapolis, USA) bei 6,8 A Heizstrom (Spannungsregler: Standard Electronic Productions, New York) in 2 min hergestellt. Zunächst wurden die Elektroden lichtmikroskopisch auf ihre Größe und Durchgängigkeit der Spitzenöffnung geprüft. Es wurden nur solche mit einem Durchmesser  $< 1 \mu\text{m}$  verwendet. Ihr Widerstand sollte zwischen 60 -100 M $\Omega$  betragen. Höhere Widerstände weisen auf eine zu enge oder verschlossene Elektrodenspitze hin [63]. Während des Versuches wurden die Tip-Potentiale stets kontrolliert, sie lagen zwischen -40 und -120 mV. Als indifferente Elektrode diente eine Agar-Brücke, die mit 3 molarer KCl-Lösung gefüllt war. Sie verband die Meßkammer mit einem Gefäß mit 3 molarer KCl-Lösung, das durch eine Ag/AgCl/Platin-Elektrode mit einem Meßverstärker verbunden war.

Ein großer Faraday-Käfig stellte eine Abschirmung des gesamten Versuches sicher. Zwei Potentialfolger (Difference Voltage Follower/IV Converter Typ D 6903, H. Ehrler & Peper, Neckargemünd) sorgten dafür, dass die Mikroelektroden und die Verbindungen zum Differenzverstärker zusätzlich abgeschirmt waren. Das Membranpotential wurde zehnfach verstärkt über ein Großbildoszilloskop angezeigt, welches auch die Kraftentwicklung anzeigte. Über ein Vierstrahloszilloskop (Typ 565, Tektronix, Beaverton, USA) konnte neben Spannungs- und Kraftsignal auch eine Zeiteichung abgebildet werden. Ein AD-DA-Wandler (DT2821, Data Translation, Malboro, Massachusetts, USA) leitete die drei Signale schließlich einem PC (80486 DX2-66, 8MB, Highscreen, Vobis, Aachen) zu. Sie konnten unter WinAD-DA 1.31 (Mikrotaurus Software, Berlin) in Echtzeit aufgezeichnet werden.

#### **2.4.2 Einstiche**

Die Meßelektroden wurden unter Sichtkontrolle mittels eines Mikromanipulators (S20-21R, Leitz, Wetzlar) senkrecht an die luminale Seite des Gefäßes herangeführt. Der Einstich erfolgte durch Klopfen an den Antivibrationstisch, so dass die Elektrodenspitze Endothel und Basalmembran durchstechen konnte. Die Unterscheidung zwischen echten Einstichen in die Gefäßmuskulatur und Verbiegungsartefakten geschah nach mehreren Kriterien:

- Der Potentialsprung auf den Endwert musste sofort nach dem Durchdringen der Basalmembran erfolgen.
- Ein- und Ausstich sollten gleich schnell erfolgen.
- Das Hintergrundrauschen der Elektroden durfte sich während der Prozedur nicht ändern.

- Die Tip-Potentiale vor und nach dem Einstich durften sich nicht unterscheiden.
- Das Potential musste sich, wenn möglich, deutlich vom Endothelzellpotential von -20 bis -40 mV unterscheiden.

An jedem Gefäßstreifen wurden bei jedem Flußwert mindestens 10, in Einzelfällen bis zu 40 Einstiche durchgeführt. Dazwischen wurde die Position der Elektrode in kleinen Schritten verändert, um einen möglichst repräsentativen Wert für das Gesamtpräparat zu erhalten. Bei der Auswertung wurden nur die Potentialmessungen berücksichtigt, die den oben genannten Kriterien genügten. Im Einzelfall gelang die kontinuierliche Messung des Membranpotentials an einer Zelle über den gesamten Versuchsverlauf vermittelt durch einen einzigen, stehenden Einstich. Da kontinuierlich Kraft- und Membranpotentialentwicklung gemessen wurden, kann man annehmen, daß die Potentialmessung an den Zellen erfolgte, die auch zur Kraftentwicklung beitragen. Außerdem sind die glatten Gefäßmuskelzellen über gap junctions elektrisch gekoppelt.

### **2.4.3 Versuchsdurchführung**

Die Membranpotentialmessung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Tonusmessung. Jeweils 10 Minuten nach Start einer Flussrate erfolgten die Potentialableitungen. Zuerst erfolgte eine Ableitung des Membranpotentials in Krebslösung nachdem die Präparate eingespannt worden sind. Danach wurde in der jeweiligen Versuchslösung gemessen.

## **2.5 Bestimmung der zyklischen Nukleotide**

### **2.5.1 Gewebsaufschluß**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden in auf ca. 80°C vorgekühlte 2 ml Polypropylengefäße eingewogen und dann wiederum in flüssigem Stickstoff bis zum Aufschluß gelagert. Durch dreimaliges manuelles Homogenisieren in 2 mL Glas-Potter-Homogenisatoren in jeweils 0,2 mL 6% iger Trichloressigsäure erfolgte der Aufschluß. In den Polypropylengefäßen wurden die Homogenisate gesammelt. Durch eine Zentrifugation bei 23000 g/15 min wurden präzipitierte Teile des Homogenisates sedimentiert und der Überstand abgetrennt. Anschließend wurde die Trichloressigsäure in den Überstand durch viermaliges Ausschütteln mit je 1mL 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 und cGMP erfolgte mit Hilfe der Biotrak

ELISA Reagenzien der Firma Amersham Pharmacia Biotech in der Regel ohne Acetylierung. Das Prinzip ist eine kompetitive Bindung des freien cAMP der Probe mit einem cAMP-Peroxidase-Konjugat um immobilisiertes cAMP-spezifisches Antiserum. In 11 mL Testpuffer wurden das cAMP-Peroxidase-Konjugat und das Antiserum gelöst. Vor der Verwendung wurde das Antiserum mit einem Testpuffer 1:2 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 fünfmal mit Waschpuffer (Testpuffer plus 0,05% Tween 20) gewaschen und die Platten sorgfältig getrocknet. Die Menge des gebundenen Peroxidase-Konjugates wurde über die Umsetzung von 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durch die Peroxidase in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 von 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 abgeschlos-

sen. 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 wurden 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reagens versetzt und, wie bereits beschrieben, für einen variablen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte nach Zugabe von 100 µL von 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 = (Gesamtvolumen/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 Tonusentwicklung wurden die Messwerte von menschlichen Koronarien aus insgesamt 11 Herztransplantationen zusammengefasst. Es wurde der arithmetische Mittelwert ± SEM angegeben. Zu jedem Versuch in HDL-Lösung wurde ein Kontrollversuch unter gleichen Flußbedingungen durchgeführt. In der graphischen Darstellung wurde die Standardkontrollkurve mit der jeweiligen HDLapoE-Kurve verglichen. Die Ergebnisse der HDL-Versuche stammen von 11 Patienten. Die Potentialwerte und Konzentration von cAMP und cGMP sind ebenfalls als Mittelwert ± 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.

In der Auswertung wurden jeweils die gemessenen Tonuswerte identischer Flußstärken zusammengefasst als Mittelwert. Dieser Mittelwert wurde für einen Fluß von 3 mL/min mit den flußunabhängigen Messwerten zusammengefasst; ein gemeinsamer Mittelwert wurde berechnet. Auf diesen gemeinsamen Mittelwert wurden dann die flußabhängigen und flußunabhängigen Mittelwerte bezogen und erneut berechnet. So konnte trotz unterschiedlicher Basaltonus eine Vergleichbarkeit der Nettokraftentwicklung gewährleistet werden. Die Tonusveränderung im Rahmen einer Meßreihe wurde als Differenz angegeben nach der Gleichung:

$$T[f] = t[f] - t[\text{basal}]$$

$t[f]$  = Messwert bei Fluß  $f$ ,  $T[f]$  = Tonusveränderung,  $t[\text{basal}]$  = Basaltonus = Fluß 3 mL/min

In einem nächsten Schritt wurde die Tonusveränderung als Relaxation in % berechnet nach folgender Formel:

$$100 - \text{Summe } (t[f] * 100 / t[\text{basal}])$$

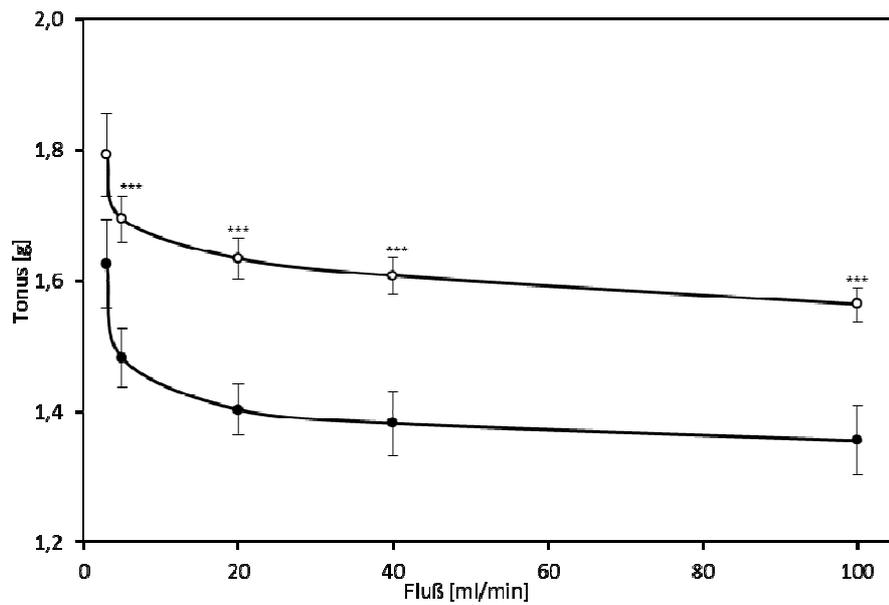
Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der entsprechenden Anzahl von Präparaten (n). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2003, SPSS für Windows, Origin.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Kraft und Membranpotentialveränderung

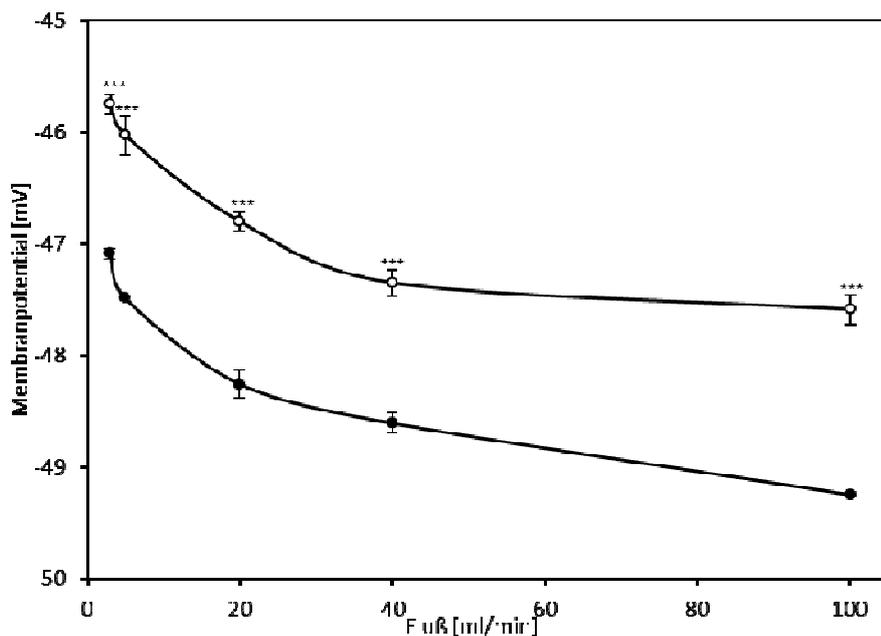
#### 3.1.1 Kontrollversuche

Unser Ziel war es, die Wirkung von HDL im Vergleich zu Krebslösung auf die flußabhängige Dilatation zu untersuchen. Für die Versuche in Krebslösung (Kontrollversuche) zeigte sich unter zunehmendem Fluß bis 100 mL/min eine zunehmende Dilatation (flußabhängige Dilatation), welche für die Koronarien mit intaktem Endothel größer war als für die deendothelialisierten Präparate. Nach der beschriebenen Vordehnung auf 2 g stellte sich nach einer Anpassungsphase von 10 Minuten unter einem Fluß von 3 mL/min ein mittlerer Ausgangstonus von  $1,625 \pm 0,068$  g für die intakten Präparate ein, hingegen ein Tonus von  $1,739 \pm 0,062$  g für die deendothelialisierten Präparate (s. Abb. 3.1). Unter einer Flußsteigerung auf 100 mL/min verringerte sich der Gefäßtonus für die Präparate mit Endothel auf  $1,355 \pm 0,053$  g, hingegen für die deendothelialisierten Präparate auf  $1,563 \pm 0,025$  g. Dies entspricht einem Nettokraftverlust von 0,270 g bzw. von 0,230 g (ohne Endothel). Die Gesamttonusabnahme oder Relaxation war stets maximal zwischen 3 und 20 mL/min, sie lag für die Endothelpräparate bei 16,6%, hingegen für die Präparate ohne Endothel bei 12,8%. Die stressrelaxation ist dabei bereits berücksichtigt worden.



**3.1 Tonus von Präparaten mit Endothel (●) und ohne Endothel (○) in Krebslösung, n=34, Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)**

Betrachtet man das Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen in Krebslösung unter zunehmendem Fluß, so sieht man passend zum Tonusverhalten eine zunehmende Hyperpolarisation. In Krebslösung zeigt sich für die Präparate mit Endothel eine Hyperpolarisation von  $-47,1 \pm 0,1$  mV auf  $-49,3 \pm 0,1$  mV, für die de-endothelialisierten Präparate von  $-45,8 \pm 0,0$  mV auf  $-47,6 \pm 0,0$  mV. Die Netto-Hyperpolarisation lag somit bei 2,2 mV bzw. 1,8 mV (ohne Endothel) (s. Abb. 3.2).

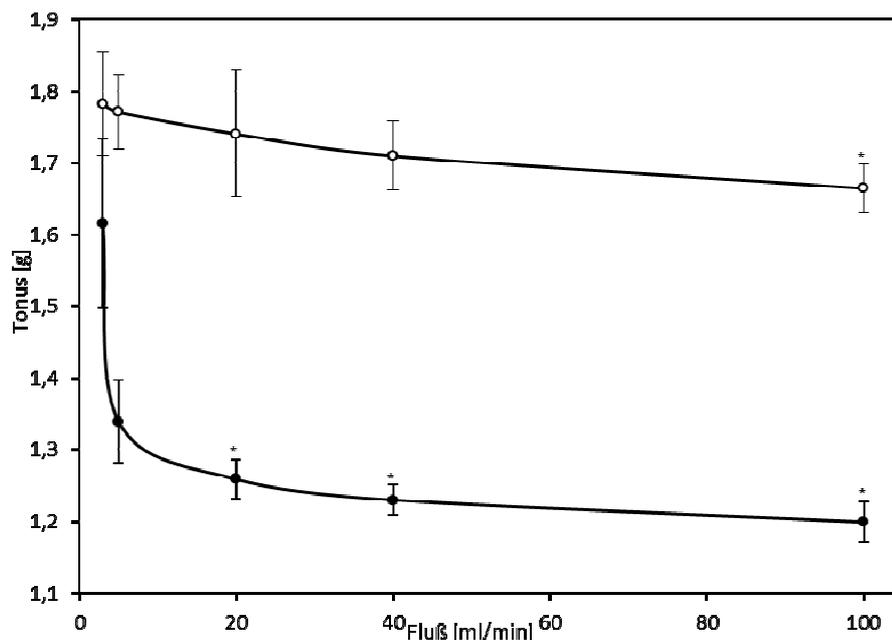


**3.2 Membranpotential von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) in Krebslösung, n=8 Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)**

Zusammenfassend zeigt sich für die Koronarien mit intaktem Endothel eine höhere flussabhängige Dilatation und eine stärkere Hyperpolarisation des Membranpotentials im Vergleich zu den de-endothelialisierten Koronarabschnitten.

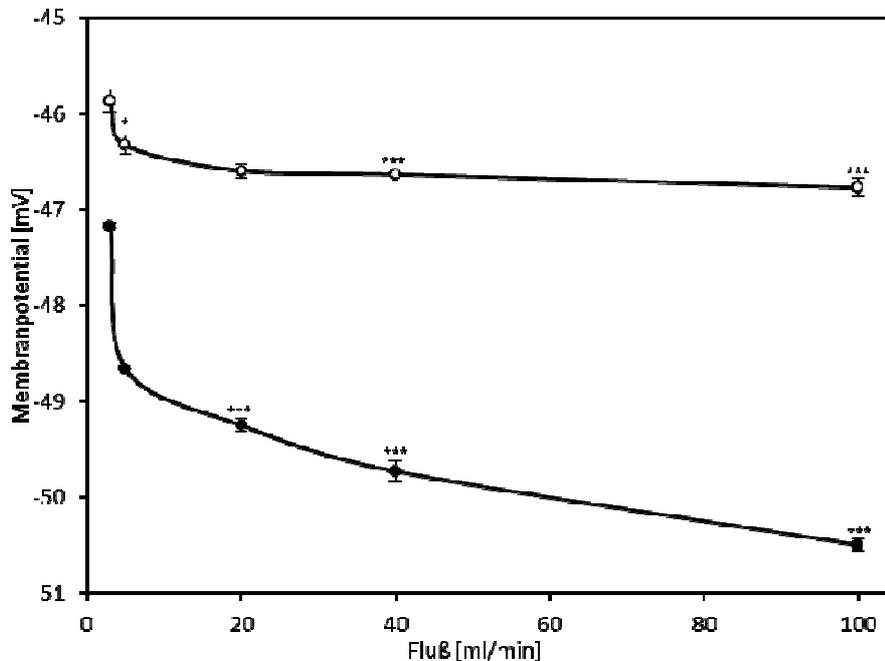
### 3.1.2 Gepooltes HDL

Wie bei den Kontrollversuchen erfolgte eine Vordehnung der Präparate in Krebslösung auf 2 g, dann stellte sich unter dem Einfluß von gepooltem HDL bei einem Fluß von 3 mL/ min nach 10 Minuten Anpassungsphase ein mittlerer Ausgangstonus ein. Unter gepooltem HDL lag dieser für die Präparate mit Endothel bei  $1,615 \pm 0,118$  g, hingegen für die deendothelialisierten Präparate bei  $1,782 \pm 0,072$  g (Abb. 3.3). Unter Flußsteigerung auf 100 mL/min verringerte sich der Gefäßtonus für die Präparate mit Endothel auf  $1,199 \pm 0,028$  g, hingegen für deendothelialisierte Präparate auf  $1,665 \pm 0,034$  g. Der Nettokraftverlust liegt somit für die Endothelpräparate bei 0,416 g und bei 0,117 g für Präparate ohne Endothel. Dies entspricht einer Relaxation von 25,8% bzw. 6,6%. Eine fast 4-fach höhere Relaxation zeigt sich unter dem Einfluß von gepooltem HDL für Koronarien mit intaktem Endothel. Im Vergleich zu den Kontrollversuchen erfuhren die Präparate mit intaktem Endothel unter dem Einfluß von gepooltem HDL eine viel höhere Relaxation (1,5-fach höher), für die de-endothelialisierten Präparate war es genau umgekehrt (0,5-fach höhere Relaxation). Analog zu den Kontrollversuchen ergibt sich bei intaktem Endothel eine höhere flussabhängige Dilatation als bei de-endothelialisierten Präparaten.



3.3. Tonus von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) unter dem Einfluß von gepooltem HDL, n=24  
Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Die Relaxation unter dem Einfluß von nativem HDL fiel zusammen mit einer Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur von  $-47,2 \pm 0,0$  mV auf  $-50,5 \pm 0,1$  mV für Präparate mit intaktem Endothel bzw. von  $-45,9 \pm 0,1$  mV auf  $-46,8 \pm 0,1$  mV für Präparate ohne Endothel. Die Netto-Hyperpolarisation lag damit bei 3,3 mV bzw. bei 0,9 mV für die de-endothelialisierten Präparate.

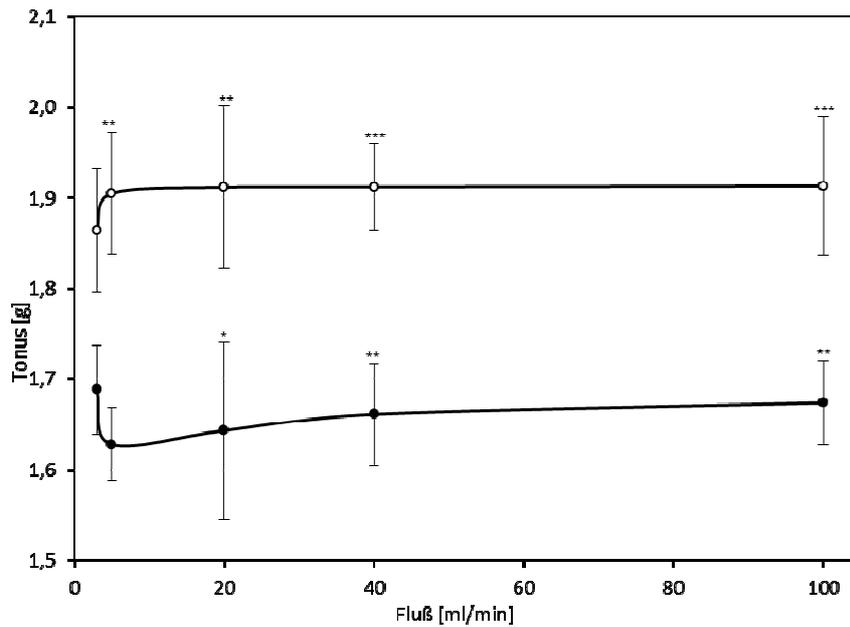


**3.4. Membranpotential von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) in gepooltem HDL, n=8**  
Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.1.3 Homozygotes HDLapoE0/E0

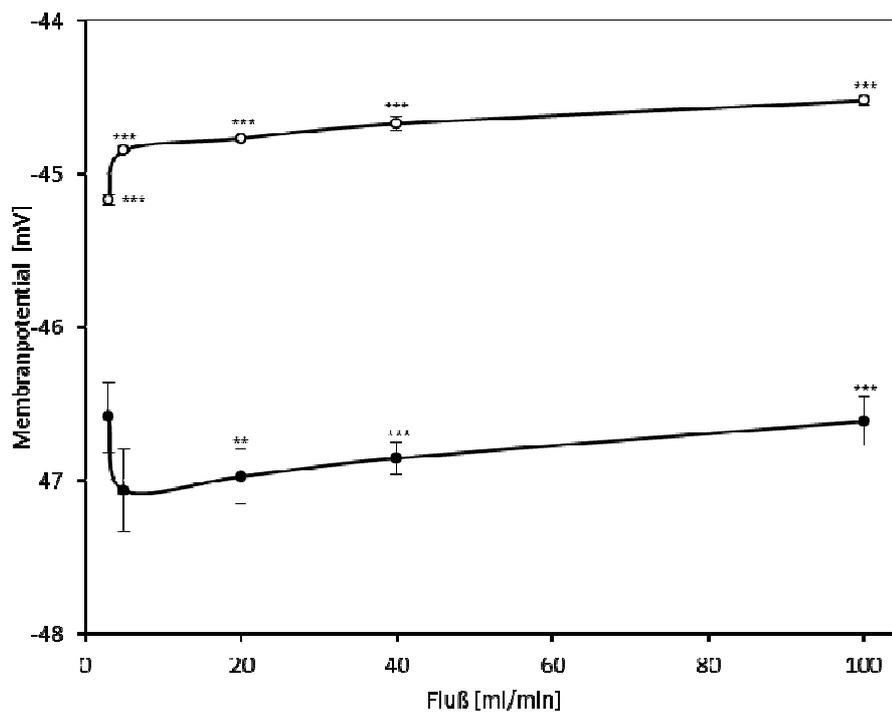
Nach Vordehnung stellte sich unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 ein Ausgangstonus für die Präparate mit Endothel bei  $1,688 \pm 0,049$  g ein, hingegen für die deendothelialisierten Präparate bei  $1,864 \pm 0,068$  g (Abb 3.5). Unter Flußsteigerung auf maximal 100 ml/min verringerte sich der Gefäßtonus für die Präparate mit Endothel auf  $1,673 \pm 0,046$  g, hingegen erhöhte sich der Gefäßtonus für deendothelialisierte Präparate auf  $1,913 \pm 0,077$  g. Der Nettokraftverlust liegt somit für die Endothelpräparate bei 0,015 g; die Nettokraftzunahme liegt für Präparate ohne Endothel bei 0,049 g. Dies entspricht einer minimalen Relaxation von 0,9% bzw. einer Kontraktion von 2,6%. Im Vergleich zu den Kontrollversuchen erfuhren die Präparate mit intaktem Endothel unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 eine viel geringere Relaxation, für die de-endothelialisierten Präparate zeigte sich sogar eine Kontraktion.

Die Relaxation unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 fiel zusammen mit einer schwachen Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen von  $-46,59 \pm 0,23$  mV auf  $-46,62 \pm 0,16$  mV für die Präparate mit intaktem Endothel (s. Abb. 3.6).



**3.5 Tonus von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) in HDLapoE0/E0, n=13**  
 Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Die Kontraktion für die de-endothelialisierten Präparate unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 fiel zusammen mit einer leichtgradigen Depolarisation von  $-45,2 \pm 0,0$  mV auf  $-44,5 \pm 0,0$  mV. Die Netto-Hyperpolarisation lag damit bei 0,03 mV, die Netto-Depolarisation bei 0,6 mV für die Präparate ohne Endothel.

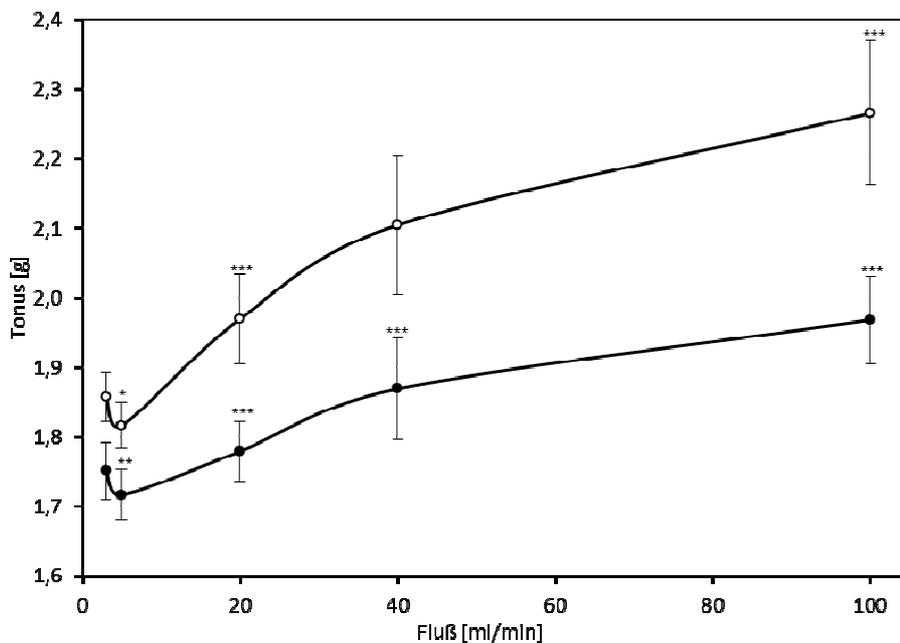


**3.6. Membranpotential von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) in HDLapoE0/E0, n=4**  
 Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.1.3 Homozygotes HDLapoE4/E4

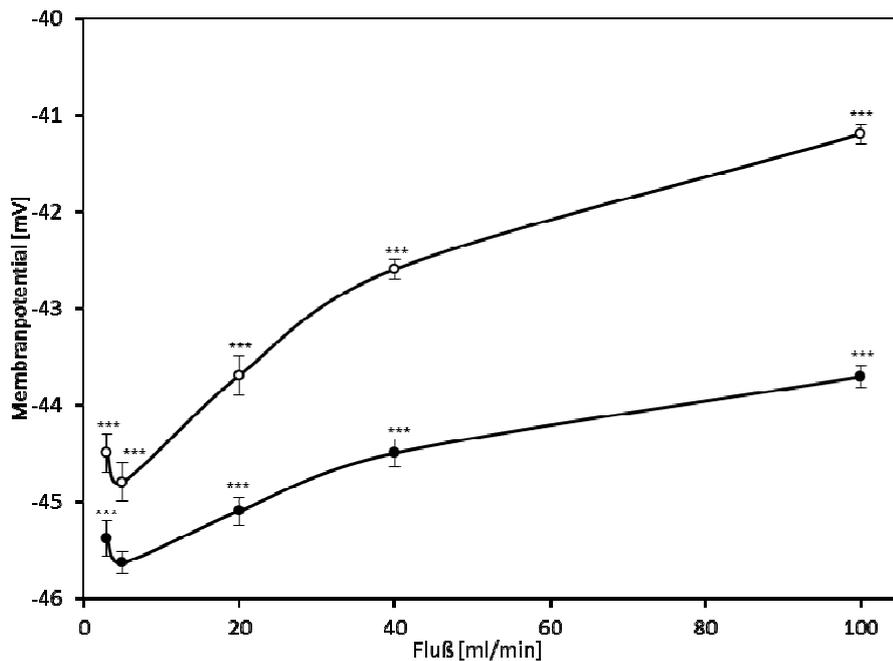
Nach Vordehnung stellte sich unter dem Einfluß von HDLapoE4/E4 ein Ausgangstonus für die Präparate mit Endothel bei  $1,751 \pm 0,041$  g, für Präparate ohne Endothel bei  $1,857 \pm 0,035$  g (Abb. 3.7) ein. Unter einer Flußsteigerung auf 100 mL/min erhöhte sich der Gefäßtonus sowohl für die Präparate mit Endothel auf  $1,968 \pm 0,063$  g als auch für die deendothelialisierten Präparate auf  $2,266 \pm 0,104$  g. Die Gesamttonuszunahme liegt somit für die Endothelpräparate bei 0,217 g, für die de-endothelialisierten Präparate bei 0,409g. Dies entspricht einer Kontraktion von 12,4% bzw. 22,0%.

In Abweichung zu den Versuchen in Krebslösung und gepooltem HDL erfuhren die Präparate mit und ohne Endothel unter dem Einfluß von HDLapoE4/4 eine Kontraktion. Diese war erwartungsgemäß stärker für die de-endothelialisierten Präparate.



3.7. Tonus von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) in HDLapoE4/E4, n=15  
Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

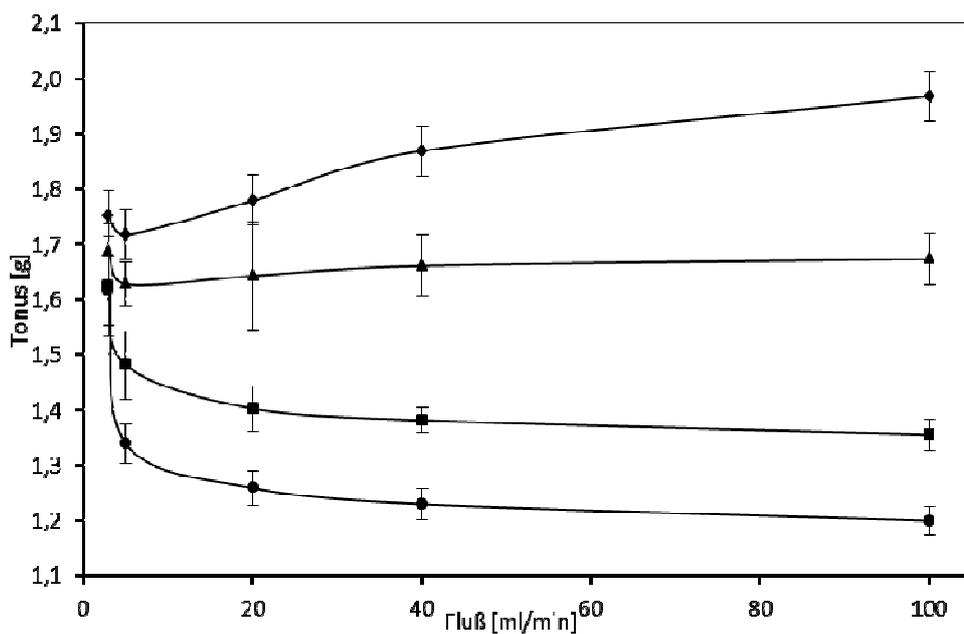
Der Kontraktion unter dem Einfluß von HDLapoE4/E4 ging eine Depolarisation der glatten Muskelzellen von  $-45,4 \pm 0,2$  mV auf  $-43,7 \pm 0,1$  mV für Präparate mit intaktem Endothel, und eine Depolarisation von  $-44,5 \pm 0,2$  mV auf  $-41,2 \pm 0,1$  mV (s. Abb. 3.8) für Präparate ohne Endothel voraus. Die Netto-Depolarisation lag damit bei 1,7 mV bzw. bei 3,3 mV (ohne Endothel).



3.8 Potential von Gefäßen mit (●) und ohne Endothel (○) in HDLapoE4/E4, n=6  
 Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.1.4 Flußabhängige Dilatation unter dem Einfluß von gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4

Im Vergleich der Kurven für die Präparate mit intaktem Endothel (s. Abb. 3.9) zeigt sich unter dem Einfluß von Krebslösung und gepooltem HDL ein vergleichbarer Basaltonus.

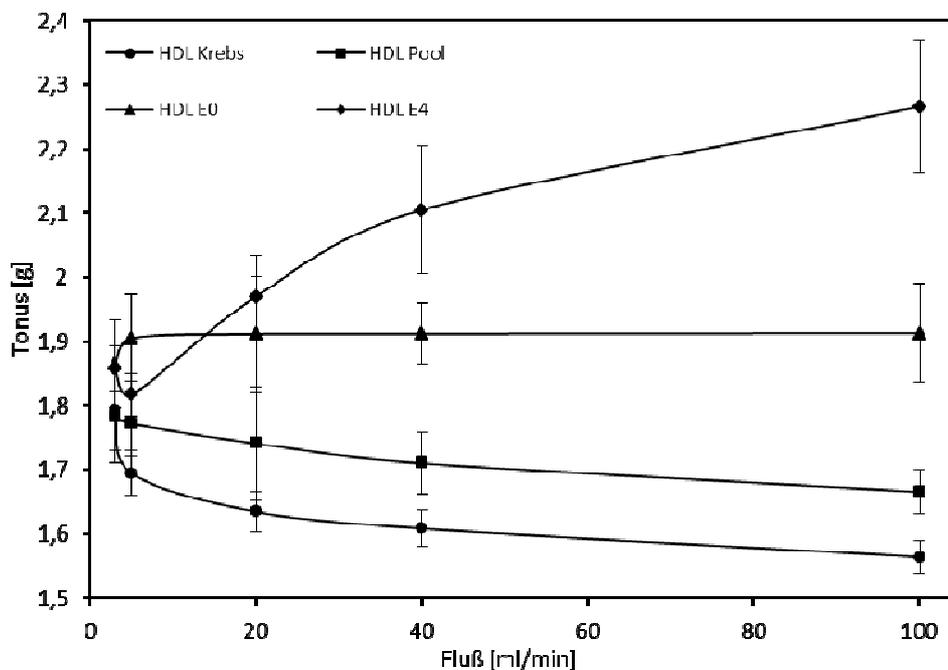


3.9. Tonusentwicklung von Präparaten mit intaktem Endothel unter dem Einfluß von Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/4

Der Ausgangstonus unter dem Einfluß von HDLapoE4/E4 ist viel höher, jedoch statistisch nicht signifikant. Ab einer Flußsteigerung von 5 mL/min ergab sich Signifikanz ( $p < 0,003$ ). Unter steigendem Fluß relaxieren die Präparate in Krebslösung und gepooltem HDL um 16,6% bzw. 25,8%. Hingegen relaxieren die Präparate in HDLapoE0/E0 nur geringgradig um 0,9%. Unter dem Einfluß von HDLapoE4/4 kam es jedoch zu einer Kontraktion um 12,4%. Vergleicht man die Unterschiede der Relaxation unter dem Einfluß von Krebslösung, gepooltem HDL und HDLapoE0/E0 für die Präparate mit Endothel, so ergibt sich statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

Im Vergleich der Kurven für die Präparate ohne Endothel (s. Abb. 3.10) zeigt sich unter dem Einfluß von Krebslösung und gepooltem HDL ebenfalls ein vergleichbarer Basaltonus. Der Ausgangstonus unter HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 ist deutlich höher, wobei hier der Ausgangstonus unter HDLapoE0/E0 am größten ist. Der Unterschied der Wandspannungen ergab statistische Signifikanz ab einem Fluß von 20 mL/min ( $p < 0,01$ ).

Bei steigendem Fluß relaxieren die Präparate in Krebslösung und gepooltem HDL um 12,8% bzw. 6,6%. Abweichend zu den Präparaten mit Endothel ist die Relaxation in Krebslösung stärker als in gepooltem HDL. Hingegen kontrahieren die Präparate in HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 ohne den Endotheleinfluß bei steigenden Flußraten um 2,6% bzw. 22%.



**3.10. Tonusentwicklung von Präparaten ohne Endothel unter dem Einfluß von Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapo E4/4**

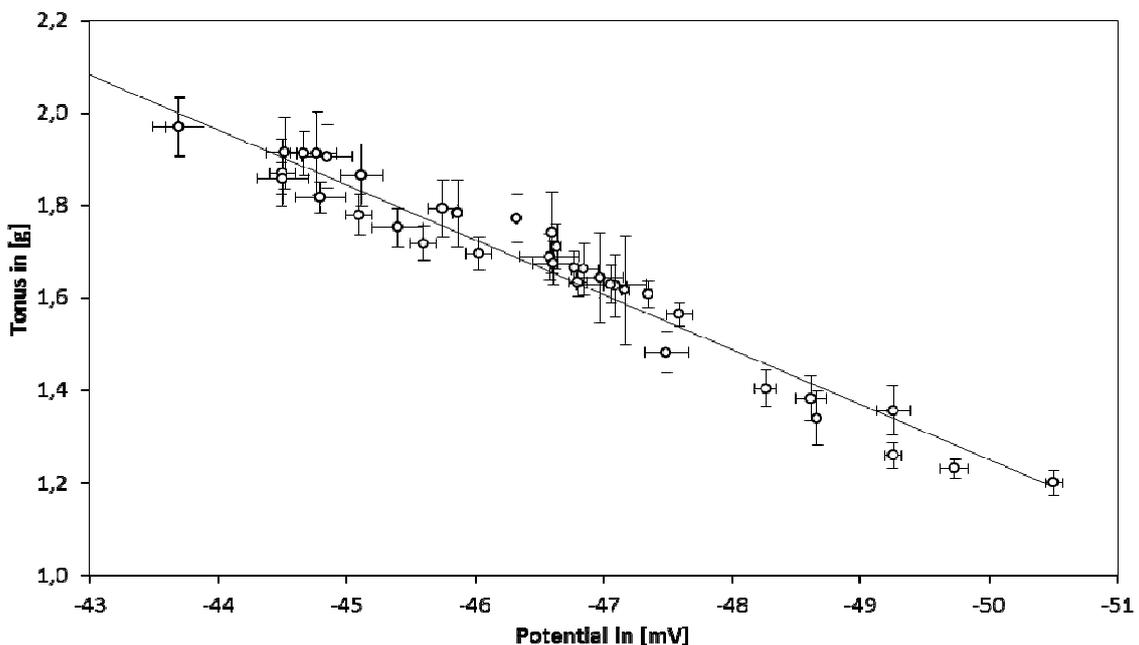
Die Kontraktion unter HDLapoE4/E4 für de-endothelialisierte Präparate ist spiegelbildlich zur Relaxation unter gepooltem HDL für Präparate mit intaktem Endothel.

Gepooltes HDL und HDLapoE4/E4 scheinen genau gegensätzliche Effekte auf die flussabhängige Dilatation zu haben. HDLapoE0/E0 besitzt nur marginale Effekte in Richtung Relaxation bei intaktem Endothel und Kontraktion bei dysfunktionalem Endothel.

Vergleicht man die Unterschiede der Relaxation unter dem Einfluß von Krebslösung und gepooltem HDL für Präparate mit Endothel, so ergibt sich eine hohe statistische Signifikanz ( $p < 0,01$ ). Vergleicht man die Unterschiede der Kontraktion unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 für Präparate ohne Endothel, so ergibt sich hohe statistische Signifikanz ( $p < 0,01$ )

### 3.2 Elektromechanische Kopplung

Um eine bessere Übersicht über den Zusammenhang zwischen Potential- und Tonusentwicklung für alle Kurven zu haben wurde die elektromechanische Kopplungskurve erstellt (s. Abb. 3.11).



3.11 Elektromechanische Kopplungskurve für Präparate mit und ohne Endothel unter dem Einfluß von Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4

Man sieht bei zunehmender Depolarisation einen Tonusanstieg (Kontraktion) bzw. bei zunehmender Hyperpolarisation einen Tonusabfall (Relaxation). Im Membranpotentialbereich von -50,5 mV bis -41,2 mV, welches einem Tonus von 1,2 g bis 2,3 g entspricht, bewegen sich die meisten glatten Muskelzellen unter dem Einfluß von Krebs, nativem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4. Der Einfluß von HDLapoE4/E4 führt zu einer stärkeren Depolari-

sation (Kontraktion), der Einfluß von gepooltem HDL zu einer stärkeren Hyperpolarisation (Relaxation). Im gesamten Potentialbereich zeigte sich eine annähernd lineare Beziehung zwischen Kraft und Potential entsprechend einer elektromechanischen Kopplung. Der Kopplungskoeffizient lag bei 8 mV/g.

### 3.3 Bestimmung der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP

Die Bestimmung der Konzentration von cAMP und cGMP erfolgt mit Hilfe der Biotrak ELISA Reagenzien der Firma Amersham Pharmacia Biotech Biosciences, und zwar an den gleichen Präparaten wie für die Tonusmessung. Die Gefäßabschnitte wurden bei einem Fluß von 100 mL/min (nach Abschluß der Tonusmessung) ausgespannt und in N<sub>2</sub> eingefroren. In einem weiteren Schritt erfolgte dann die ELISA-Bestimmung. Pro Präparat wurden die Nukleotidkonzentrationen zweimalig bestimmt und dann als Mittelwert  $\pm$  SEM zusammengefasst.

#### 3.3.1 Bestimmung der Nukleotide in Krebslösung

In Krebslösung zeigte sich bei einem maximalen Fluß von 100 mL/min (s. Abb. 3.12. und 3.13) für die Präparate mit intaktem Endothel eine mittlere cGMP-Konzentration von  $48,8 \pm 2,9$  nmol/kg (n=8) und eine cAMP-Konzentration von  $157,3 \pm 4,1$  nmol/kg (n=28).

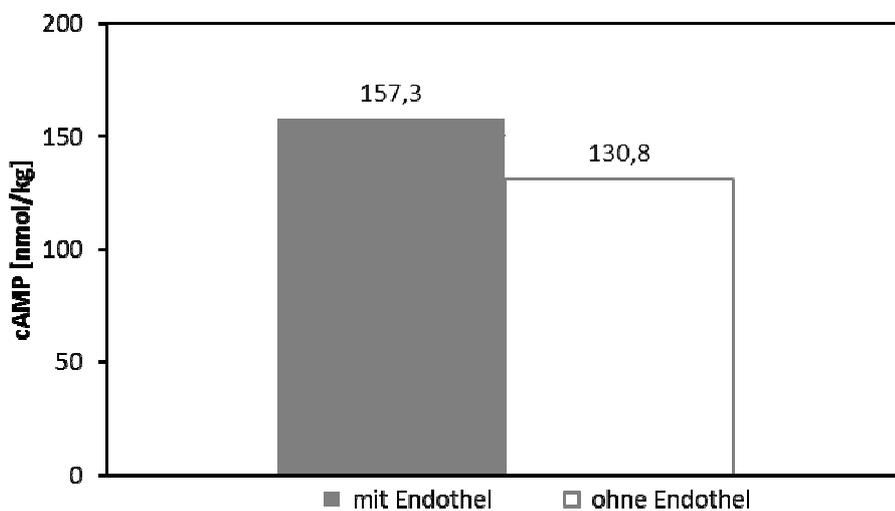


Abb 3.12 cAMP-Konzentration der Präparate in Krebslösung mit und ohne Endothel

Für die de-endothelialisierten Präparate ergab sich in Krebslösung bei 100mL/min Fluß eine geringere mittlere cAMP-Konzentration von  $130,8 \pm 2,8$  nmol/kg (n=24) und eine cGMP-Konzentration von  $30,9 \pm 1,7$  nmol/kg (n=4).

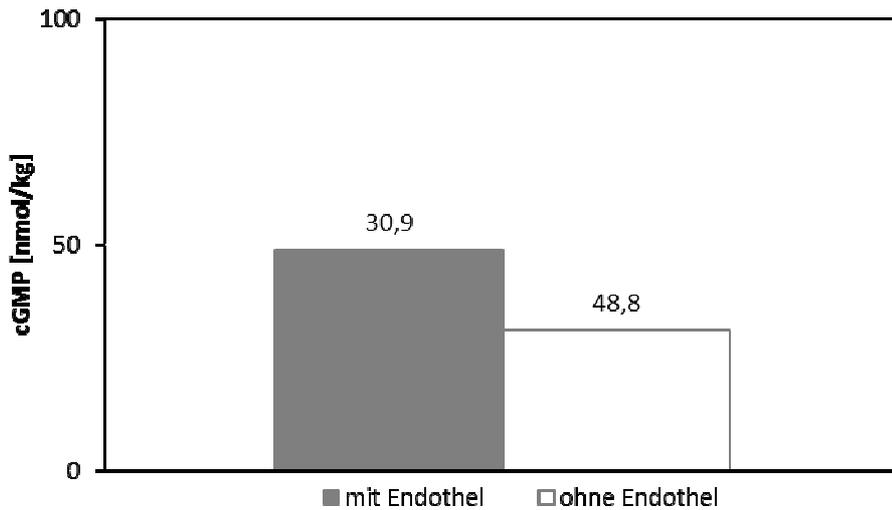


Abb 3.13 cGMP-Konzentration der Präparate in Krebslösung mit und ohne Endothel

### 3.3.2 Bestimmung der Nukleotide in gepooltem HDL

In gepooltem HDL zeigte sich für die Präparate mit intaktem Endothel bei 100 mL/min Fluß (s. Abb. 3.14. und 3.15) eine mittlere cGMP-Konzentration von  $87,3 \pm 1,7$  nmol/kg (n=46) und eine cAMP-Konzentration von  $238,2 \pm 4,6$  nmol/kg (n=12). Wie die Tonusmessungen gezeigt haben relaxieren die Präparate mit Endothel unter den Einfluß von gepooltem HDL maximal, d.h. stärker als in Krebslösung. Die dabei bestimmten Nukleotidkonzentrationen liegen über den Kontrollversuchskonzentrationen

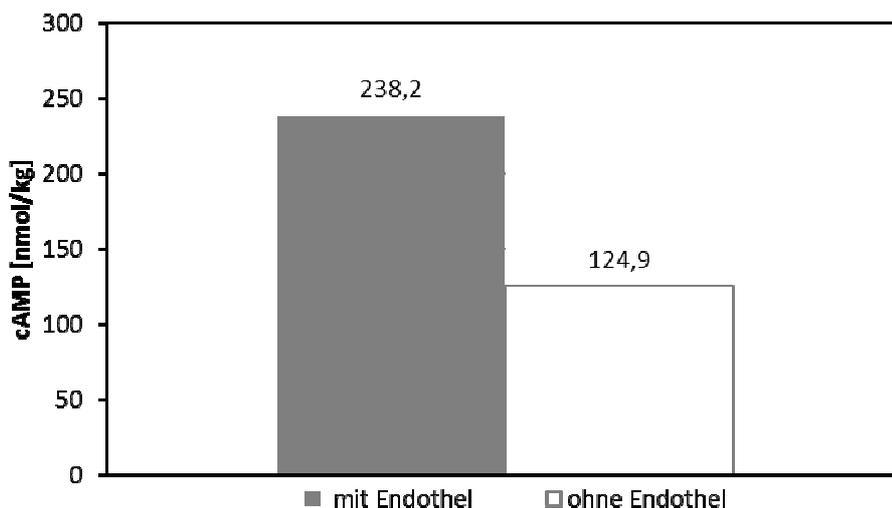


Abb 3.14 cAMP-Konzentration der Präparate in gepooltem HDL mit und ohne Endothel

Für die de-endothelialisierten Präparate zeigte sich in gepooltem HDL bei 100 mL/ min Fluß eine geringere mittlere cGMP-Konzentration von  $27,3 \pm 1,5$  nmol/kg (n=30) und ebenfalls

eine geringere cAMP-Konzentration von  $124,9 \pm 3,4$  nmol/kg (n=20). Analog zu den Tonusmessungen relaxieren die Präparate ohne Endothel schwächer.

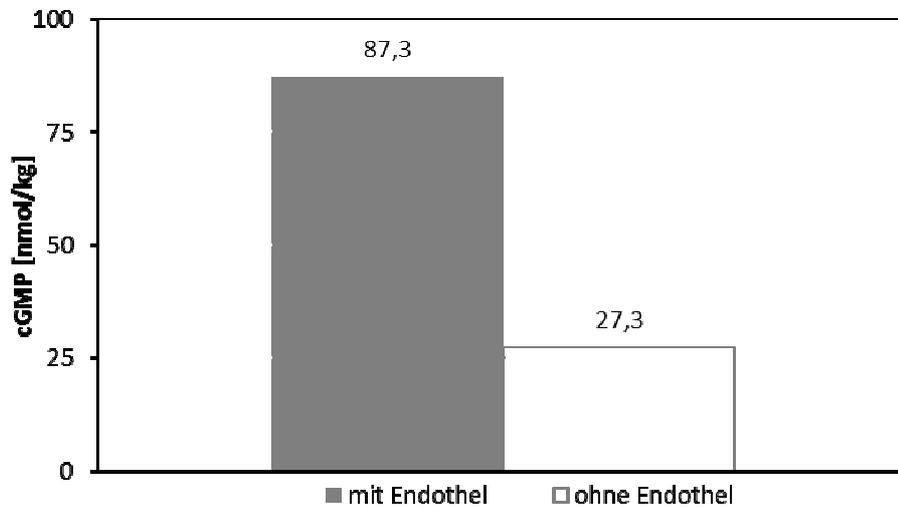


Abb 3.15 cGMP-Konzentration der Präparate in gepooltem HDL mit und ohne Endothel

### 3.3.3 Bestimmung der Nukleotide in HDLapoE0/E0

In HDLapoE0/E0 zeigte sich für die Präparate mit intaktem Endothel bei 100 mL/min Fluß (s. Abb. 3.16. und 3.17) eine mittlere cGMP-Konzentration von  $26,7 \pm 1,5$  nmol/kg (n=20) und eine cAMP-Konzentration von  $124,8 \pm 8,2$  nmol/kg (n=8). Analog zur gemessenen geringgradigen Relaxation zeigen sich geringe Nukleotidkonzentrationen. Für die de-endothelialisierten Präparate ergab sich unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 bei 100 mL/min Fluß eine mittlere cGMP-Konzentration von  $17,0 \pm 1,8$  nmol/kg (n=8) und eine cAMP-Konzentration von  $114,6 \pm 5,7$  nmol/kg (n=6).

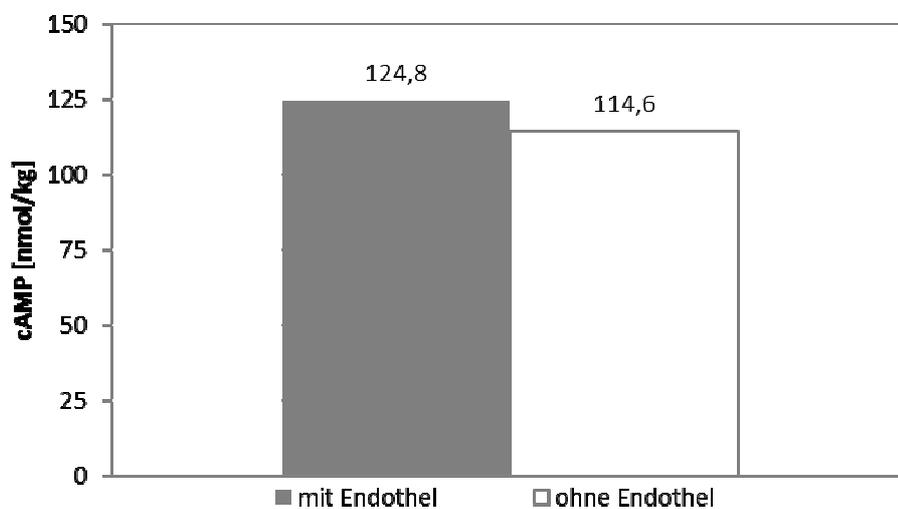


Abb 3.16 cAMP-Konzentration der Präparate in HDLapoE0/E0 mit und ohne Endothel

Bei hohen Flußraten unter HDLapoE0/E0 zeigten die Präparate eine leichtgradige Kontraktion, diese spiegelt sich in den Nukleotidkonzentrationen wider.

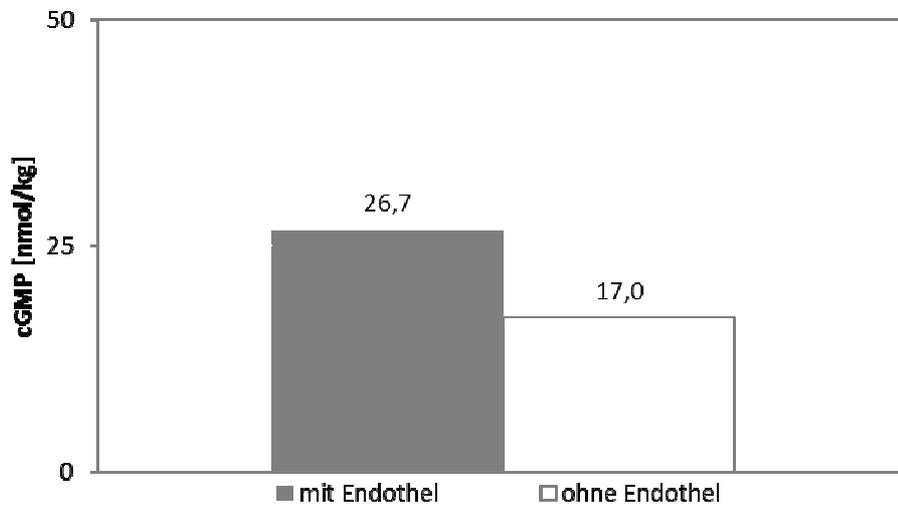


Abb 3.17 cGMP-Konzentration der Präparate in HDLapoE0/E0 mit und ohne Endothel

### 3.3.4 Bestimmung der Nukleotide in HDLapoE4/E4

In HDLapoE4/E4 zeigte sich für die Präparate mit intaktem Endothel bei 100 mL/min Fluß (s. Abb.3.18. und 3.19) eine mittlere cGMP-Konzentration von  $15,7 \pm 1,0$  nmol/kg (n=10) und eine cAMP-Konzentration von  $112,6 \pm 4,5$  nmol/kg (n=12). Wie die Tonusmessung gezeigt hat, kontrahierten die Präparate in HDLapoE4/E4 bei maximalem Fluß.

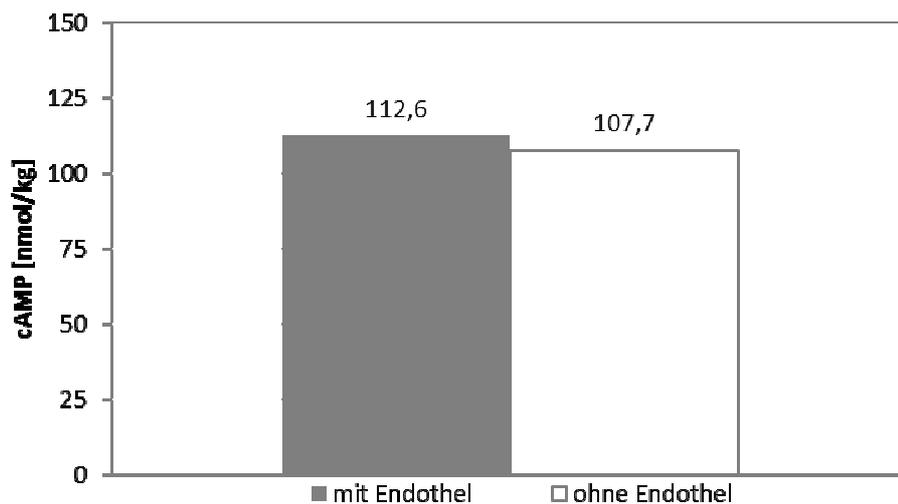


Abb 3.18 cAMP-Konzentration der Präparate in HDLapoE4/E4 mit und ohne Endothel

Für die de-endothelialisierten Präparate zeigte sich in HDLapoE4/E4 bei 100 mL/min Fluß eine mittlere cGMP-Konzentration von  $11,9 \pm 0,8$  nmol/kg (n=6) und eine cAMP-

Konzentration von  $107,7 \pm 2,9$  nmol/kg (n=6). Auch hier fanden wir in der Tonusmessung eine starke Kontraktion, entsprechend wurden niedrige Nukleotidkonzentrationen gemessen.

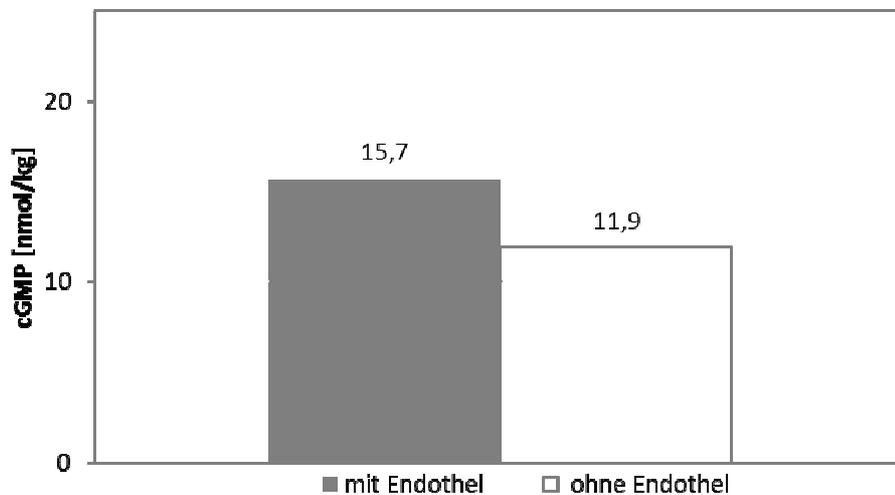


Abb 3.19 cGMP-Konzentration der Präparate in HDLapoE4/E4 mit und ohne Endothel

### 3.3.5 Bestimmung der Nukleotide in Abhängigkeit von den verschiedenen HDL-Isoformen

Analog zu der statistisch signifikanten Relaxation der Präparate mit intaktem Endothel unter dem Einfluß von nativem HDL ergab sich eine maximale cAMP- und cGMP-Konzentration (s. Abb. 3.20 und 3.21).

Im Vergleich zur reinen Krebslösung lagen die Konzentrationen für cGMP (s. Abb. 3.21) um 38,6 nmol/kg (44,2%) und für cAMP (s. Abb. 3.20) um 80,9 nmol/kg (34,0%) höher.

Analog zu der Kontraktion für Präparate mit intaktem Endothel unter dem Einfluß von HDLapoE4/4 zeigte sich eine geringe cAMP- und cGMP-Konzentration. Im Vergleich zur Krebslösung lagen die Konzentrationen für cGMP um 33,1 nmol/kg (67,8%) bzw. für cAMP um 44,7 nmol/kg (28,4%) signifikant niedriger ( $p < 0,0001$ ).

Die Nukleotidkonzentrationen für Präparate mit intaktem Endothel in HDLapoE0/E0 lagen im Vergleich zur Krebslösung für cGMP um 22,1 nmol/kg (45,3%) und für cAMP um 32,5 nmol/kg (20,7%) niedriger. Im Vergleich zu gepooltem HDL lagen die Konzentrationen für cGMP um 60,7 nmol/kg (69,5%) und für cAMP um 113,4 nmol/kg (47,6%) niedriger. Die Konzentrationen der Präparate mit intaktem Endothel lagen stets über denjenigen mit Endothelverlust.

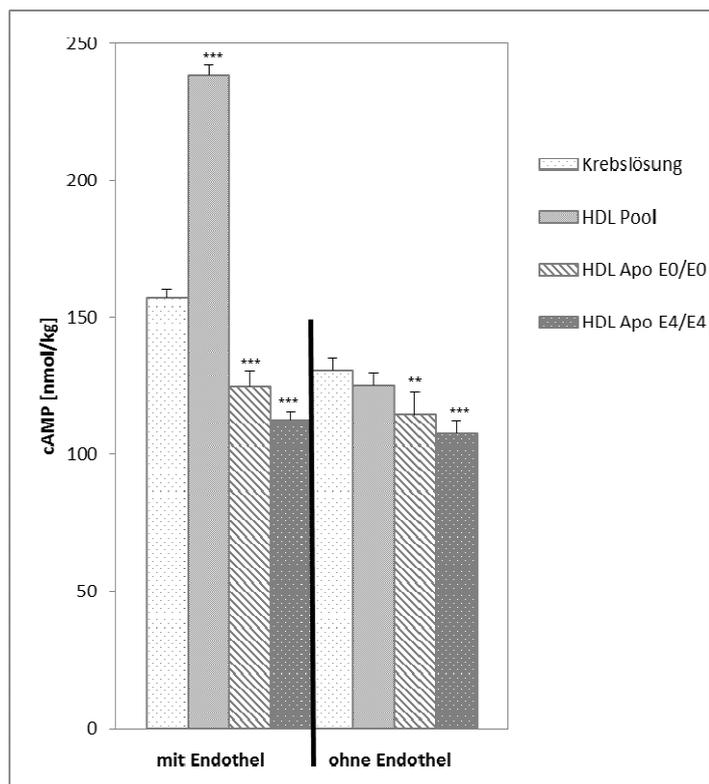


Abb 3.20: cAMP-Konzentrationen der Präparate in Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 mit und ohne Endothel  $\pm$  SEM, n=8, Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

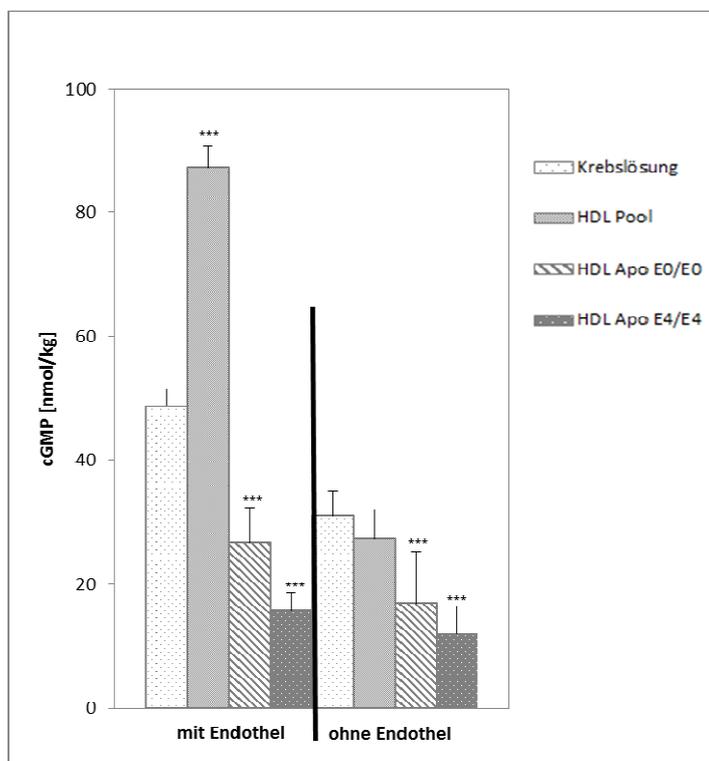


Abb 3.21: cGMP-Konzentrationen der Präparate in Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 mit und ohne Endothel  $\pm$  SEM, n=8, Signifikanz  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.4. Chemomechanische Kopplung

Um eine bessere Übersicht über den Zusammenhang zwischen Nukleotidkonzentration und Tonusentwicklung für alle Kurven zu haben wurden chemomechanische Kopplungskurven erstellt (s.Abb. 3.22 und 3.23). Man sieht bei zunehmender Nukleotidkonzentration einen Tonusabfall und bei abnehmender Nukleotidkonzentration einen Tonusanstieg. Es ergab sich eine exponentielle Beziehung im gemessenen Bereich.

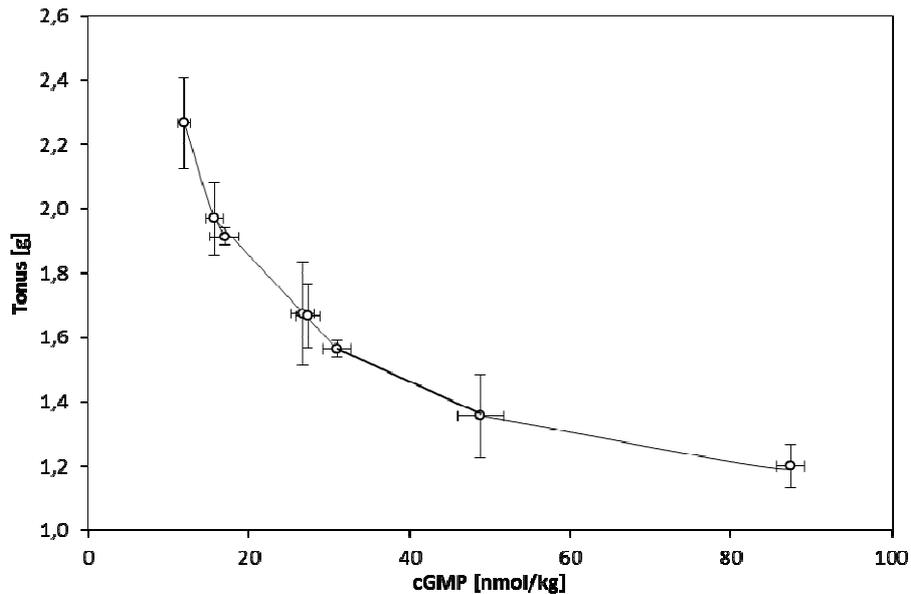


Abb 3.22: Chemomechanische Kopplungskurve von Tonus und cGMP-Konzentration der Präparate in Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 mit und ohne Endothel  $\pm$  SEM, n=8.

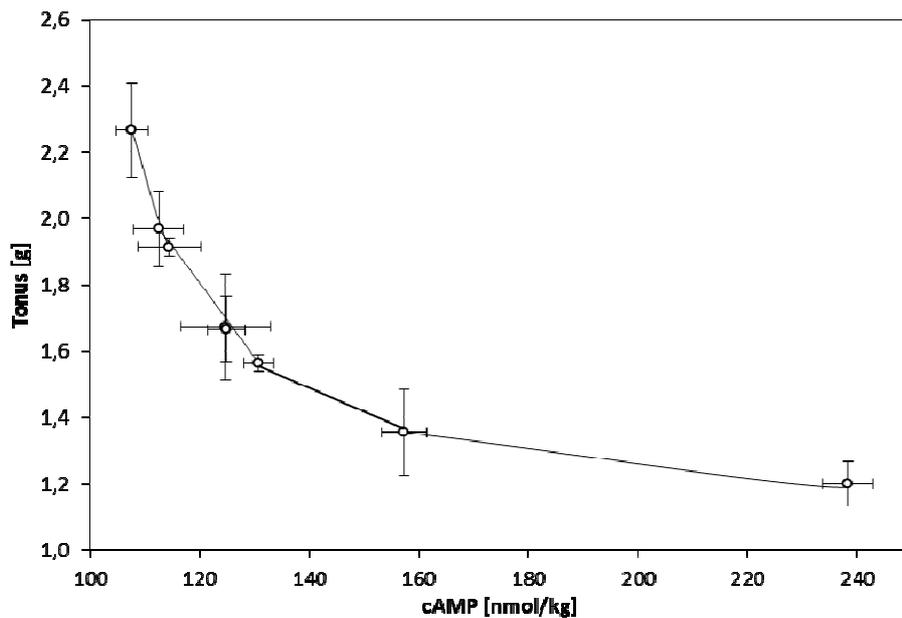


Abb 3.23: Chemomechanische Kopplungskurve von Tonus und cAMP-Konzentration der Präparate in Krebslösung, gepooltem HDL, HDLapoE0/E0 und HDLapoE4/E4 mit und ohne Endothel  $\pm$  SEM, n=8.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Wirkung von HDL auf die flußabhängige Dilatation**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welchen Einfluß die unterschiedlichen HDL-Isoformen auf die flußabhängige Gefäßdilatation (FDD) menschlicher Koronararterien besitzen. Unser klinischer Bezug ist die Pathogenese der Atherosklerose, bei welcher gerade in der frühen Entwicklung eine Wechselwirkung zwischen Lipoproteinen und Endothel mit Imbalance von Vasodilatation und –konstriktion im Sinne einer beeinträchtigten FDD eine zentrale Rolle spielt. Dem HDL-C von Gesunden wird dabei eine anti-atherogene Wirkung zugeschrieben.

### **4.2. Wirkung auf den Gefäßtonus und das Membranpotential**

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich unter dem Einfluß von gepooltem HDL eine maximale flußabhängige Dilatation von fast 30% bezogen auf den Ausgangstonus. Anders formuliert reagieren vermutlich die Endothelzellen der Koronarien unter dem Einfluß von nativem HDL auf die schrittweisen Erhöhungen der Flußstärke mit einer starken Dilatation.

Andere Arbeitsgruppen kamen zu dem gleichen Schluß: Li et al. [75] untersuchten im Jahr 2000 die Veränderungen der Dilatation an der Arteria brachialis mittels Ultraschall während einer reaktiven Hyperämie und nach sublingualer Gabe von Glyceroltrinit in einer Gruppe von KHK-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Die FDD war invers korreliert mit dem Alter, dem Vorliegen einer Hypertension und dem LDL-Spiegel. Eine positive Korrelation ergab sich für die Höhe des HDL-Spiegels. Die Autoren schlußfolgerten, daß HDL die endothelabhängige Dilatation hochgradig steigert.

Drei Jahre später gingen Kuvin et al. [71] der Frage nach, ob bei Patienten mit Atherosklerose der HDL-Spiegel mit der flußabhängigen Dilatation korreliert. Mit einem analogen Meßverfahren bestimmten sie eine mittlere FDD für das gesamte Patientenkollektiv von  $9,9 \pm 5,2\%$ . Individuen mit einem reduzierten HDL-C ( $< 40 \text{ mg/dL}$ ) hatten eine eher niedrige FDD von  $7,4 \pm 3,6\%$ , hingegen hatten Individuen mit einem höheren HDL-C ( $> 40 \text{ mg/dl}$ ) hatten eine erhöhte FDD von  $11 \pm 5,5\%$ . Es zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen FDD und dem HDL-Spiegel. Die Arbeitsgruppe postulierte, daß der HDL-C-Spiegel ein direktes Maß für die FDD ist [71].

Der klinische Bezug zur Atherosklerose ergibt sich wie folgt: Aktuell weiß man, daß der HDL-C-Spiegel invers mit dem Vorhandensein oder der Entwicklung kardiovaskulärer Krankheiten verknüpft ist, wenngleich bislang kein kausaler Zusammenhang mit dem Cholesterole-Anteil im HDL-Partikel (HDL-C) gezeigt werden konnte [29]. Patienten mit frühzeitiger kardiovaskulärer Erkrankung weisen oftmals niedrige HDL-Spiegel auf [44,68]. Basie-

rend auf den Daten der Framingham Heart Study steigt das Herzinfarkttrisiko um 25% für jedes Absinken des HDL-C um 5 mg/dL (0,13 mmol/L) unter geschlechtsspezifische Medianwerte [16]. Die Studiendaten diesbezüglich, ob das HDL-C einen prädiktiven Wert für koronare Ereignisse bei Patienten mit bestehender KHK besitzt, sind allerdings divers [11,127].

Obwohl es eine inverse Beziehung zwischen dem HDL-C Wert und dem kardiovaskulären Risiko gibt, besteht, wie in Mendelschen Randomisierungsanalysen [128] gezeigt werden konnte, keine Kausalität zwischen dem HDL-Cholesterol und einer Atheroskleroseentwicklung. Ein durch genetische Mechanismen erhöhtes HDL-C war nicht mit einem niedrigeren kardiovaskulären Risiko assoziiert. Möglicherweise sind strukturelle und funktionelle Eigenschaften des HDL verursachend [29].

In unserer Arbeit war die gemessene Funktionalität der FDD unter HDL für Präparate mit intaktem Endothel um ein 1,6-faches höher als die FDD in Krebslösung. Diese Beobachtung unterstreicht die direkte Wechselwirkung von HDL-C mit dem Endothel mit einer NO-Freisetzung in der Gefäßtonusmodulation. Die Endothelzellen sind dem HDL-C zweifach ausgesetzt, einerseits im Bereich der luminalen Seite (durch den Kontakt mit im Blut zirkulierendem HDL), andererseits von der subendothelialen Matrix aus [17,68]. HDL und Apo-A1 können an der Lumenseite internalisiert werden und im Bereich der Gefäßintima freigesetzt werden, dies bezeichnet man auch als endotheliale Transzytose. Die HDL-Internalisierung ist dabei abhängig von SR-B1 und ABCG1 [107].

In der Literatur wird eine direkte Steigerung der eNOS-Aktivität durch HDL beschrieben, sowohl in *in vitro*-Studien mit menschlichen Endothelzellen [70] als auch in *in vivo*-Studien im Tiermodell [74].

Unter dem Einfluß von physiologischen HDL-Konzentrationen zeigten die Koronarien eine erhöhte FDD. Im Vergleich der Ergebnisse von Präparaten mit und ohne Endothel, erwies sich diese gesteigerte FDD vor allem endothelabhängig. Bei den de-endothelialisierten Präparaten konnte ein signifikanter Unterschied der FDD in Krebslösung und HDL gezeigt werden. Die FDD in Krebslösung war höher, was dafür spricht, daß HDL für die FDD intaktes Endothel benötigt. Im Gegenschluß wird die HDL-Funktionalität durch fehlendes oder dysfunktionales Endothel, z.B. im Rahmen chronisch-inflammatorischer Prozesse wie der Atherosklerose, herabgesetzt. Unsere Beobachtungen passen gut zu den Ergebnissen einer kürzlich im International Journal of Cardiology veröffentlichten Untersuchung von O'Neill et. al [94], in welcher endothelprotektive HDL-Effekte bei Patienten mit einer Zahninfektion mit Gesunden verglichen wurden. Dazu wurde die Paraoxonase-Aktivität in Serum, die NO-Bioverfügbarkeit und die Superoxidproduktion in Endothelzellen gemessen. Die Studie zeigt

te, daß bereits kleinste Veränderungen im Rahmen einer systemischen Inflammation die endothel-protectiven Wirkungen des HDL beeinträchtigen können. Die funktionellen HDL-Veränderungen waren unabhängig vom Cholesterolefflux und assoziiert mit einem Remodelling des HDL-Proteoms. Nach Bekämpfung der Inflammation konnten höhere endothel-protective HDL-Effekte gemessen werden.

Die Autoren schlußfolgern, daß die HDL-Dysfunktionalität ein neuer Mechanismus ist, welcher zu einer Verbindung von Inflammation und Atheromprogress führt.

Auch andere Autoren beschreiben heterogene Wirkungen von HDL am Endothel und veränderte Endotheleffekte bei Patienten mit einer KHK oder einem erhöhten KHK-Risiko [68]. Möglicherweise führen post-translationale Modifikationen des Apo-A1 und der Paraoxonase-1 zu Veränderungen des HDL-Proteoms und Lipidoms [94]. Die Akute-Phase-Antwort moduliert das HDL-Proteom und führt zu veränderten HDL-Eigenschaften und inflammatorischen Erkrankungen [104] (s. Kapitel 1.3.3: HDL und Gefäßmodulation).

De-endothelialisierte Gefäßabschnitte zeigten sowohl in Krebslösung als auch unter dem Einfluß von HDL eine starke Abnahme der FDD, nicht jedoch ein gänzlich Verschwinden. Frühere Autoren haben ein völliges Verschwinden der FDD nach Entfernung des Endothels beschrieben [67]. Hingegen werden in neueren Studien verstärkt Endothel-unabhängige Dilatationen beobachtet [34]. Im Tierversuch wurde an den Gehirnarterien des Hasen eine Koexistenz beider Mechanismen, also die endothelabhängige und die endothelunabhängige Relaxation der Gefäße gefunden [42].

Damit stellt sich die Frage, welche Mechanismen unserer beobachteten endothelunabhängigen Dilatation in HDL zugrunde liegen? Sabouni et al. [109] folgerten 1990, dass der koronare Adenosinrezeptor ( $A_2$ ) Relaxationen unabhängig von der Intaktheit des Endothels vermittelt. Siegel et al. [116] zeigten, daß es neben der Wechselwirkung von Endothel und Lipoproteinen zu einer Wechselwirkung zwischen den Lipoproteinen und der extrazellulären Matrix kommt. Eine wesentliche Rolle spielt hier das Heparansulfat-Proteoglykan (HS-PG). Die gleiche Arbeitsgruppe [117,118] fand, daß HDL unter den Lipoproteinen die höchste Affinität zum Proteoglykanrezeptor besitzt. Eine Bindung an HS-PG bewirkt eine Vasodilatation. In der Dissertation von G. Meyer-Rath 2005 [81] wurde gezeigt, daß bei physiologischen Flußraten (20-40 mL/min) die FDD zu 65% vom Endothel, hingegen bei steigendem Fluß (100 mL/min) zu 70% durch die extrazelluläre Matrix bestimmt wird. Bei atherosklerotischen Gefäßen vermittelte bei hohem Fluß das Endothel eine Kontraktion von 43% der maximalen Dilatation eines normalen Gefäßes, es existierte aber auch eine matrixvermittelte FDD von 27%, welche die Konstriktion aufhob.

Durch seine hohe Affinität und Bindung an die Proteoglykane bewirkt HDL nach Siegel et al. [118] eine Feedforward-Feedback-Schleife gegen eine Ablagerung atherogener Lipoproteine wie ApoB100 an der Oberflächenmembran und in subendothelialen Bereichen.

Dadurch verhindert das Lipoprotein die atherosklerotische Nanoplaque-Formation. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und/oder ApoB100 führt zur Beeinträchtigung des Flußsensors HS-PG und zur Nanoplaqueformation. Zusammenfassend besitzt das Proteoglykan eine wichtige Funktion als peripherer Lipoproteinbindungsrezeptor und als Flußsensor, welcher auf elektro- und chemomechanische Reize reagiert. Wir haben diese in unserer Untersuchung in Form des Membranpotentials und der Nukleotidkonzentrationen gemessen.

#### **4.3 Einfluß der Nukleotidfreisetzung cAMP und cGMP**

Die Botenstoffe cAMP und cGMP beeinflussen den Tonus glatter Muskelzellen wie oben bereits dargestellt. Sie spiegeln die NO-Freisetzung aus den Endothelzellen wieder. Die vorliegende Arbeit bedient sich daher durch die Nukleotidmessung einer indirekten NO-Bestimmung. Untersucht werden sollte, wie hoch der cAMP- und cGMP-Spiegel bei der FDD unter dem Einfluß verschiedener HDL-Isoformen ist.

Es zeigte sich in gepooltem HDL beim maximalen Fluß von 100 mL/min für Präparate mit intaktem Endothel eine im Vergleich zu den Kontrollversuchen erhebliche Zunahme beider Nukleotidkonzentrationen. Die Konzentration von cGMP war  $87,3 \pm 1,7$  nmol/kg und von cAMP  $238,2 \pm 4,6$  nmol/kg. Die Konzentrationen waren um 44,2% bzw. 34,0% höher als die ermittelten Konzentrationen in Krebslösung. Demzufolge ist es unter dem Einfluß von HDL zu einer Verstärkung der Signaltransduktion des Flussreizes auf die glatten Muskelzellen gekommen.

Dafür verantwortlich sind die HDL-Effekte auf die NO-Produktion. HDL stimuliert bekanntlich die NO-Produktion über eine eNOS-Aktivierung durch Bindung des Lipoproteins an den SR-B1-Rezeptor [14,83,84]. Ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist das HDL-assoziierte-Sphingosine-1-Phosphate (S1P). HDL ist der Hauptträger von S1P im Plasma und Apolipoprotein M. ApoM ist das S1P bindende Protein des HDL. Eine Komplexbindung an den in den Caveolae lokalisierten S1P<sub>3</sub>-Rezeptor führt zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexbildung, welche den inaktivierten Enzymkomplex eNOS/Caveolin aktiviert. Dies führt zu einer Förderung der NO-Produktion mit Hyperpolarisation und Relaxation [92]. Die gemessenen hohen cGMP-Spiegel können im Sinne einer anti-atherosklerotischen HDL-Wirkung interpretiert werden.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß HDL eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und endotheliale Dysfunktion durch den endothelialen ABCG1-vermittelten Efflux von Cholesterin und 7-Oxysterin verhindert. Dies geschieht durch eine Verhinderung/Abnahme der Interaktion von Caveolin-1 und eNOS, d.h. Formation eines inhibierten Enzymkomplexes [39,125]. Die Ergebnisse passen gut zu unseren Messungen.

Weiterhin ist im Rahmen der Vasodilatation glatter Muskulatur mit Nukleotidanstieg eine Aktivierung der adrenergen Rezeptoren von Bedeutung. So ist eine Aktivierung der  $\beta$ -Rezeptoren mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration verbunden, während eine  $\alpha_2$ -Rezeptor-Aktivierung diese vor allem senkt. Die in unserer Arbeit gezeigte FDD in gepooltem HDL-C wird vor allem über cGMP mit NO Freisetzung und folglich Relaxation vermittelt. Die Ergebnisse stimmen gut mit unseren Messungen überein, eine Zunahme der NO-Bioaktivität unter dem Einfluß von gepooltem HDL könnte für die FDD verantwortlich sein. Bereits in der Einleitung wurde ausgeführt, daß HDL das Lipoprotein mit der höchsten Affinität zum HS-PG-Rezeptor ist. Das Heparansulfat-Proteoglykan erfährt durch die Lipoproteinbindung und durch steigenden Blutfluß eine Konformationsänderung, wodurch zusätzliche  $\text{Na}^+$ -Bindungsstellen freiwerden. Es kommt zum transmembranalen Natriumeinstrom in die Zelle und zur Depolarisation der Zellmembran. Zeitgleich kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx mit Freisetzung von NO und  $\text{PGI}_2$  mit folglich Vasodilatation.

Zusätzlich trägt möglicherweise die höhere Viskosität der Lipidlösung zu einer höheren Nukleotidkonzentration im Vergleich zu den Versuchen in Krebslösung bei. Durch die höhere Viskosität entsteht ein höherer shear stress auf die Gefäßwand mit höherer NO-Freisetzung. Hinsichtlich der basalen Konzentration der zyklischen Nukleotide ließ sich anhand unserer Untersuchungen keine Aussage treffen, da wir eine Messung der Nukleotidkonzentration am Ende des Versuches bei einem Fluß von 100 mL/min vornahmen.

Erstmals konnten wir neben der Darstellung des Zusammenhanges zwischen Potential und Tonus (elektromechanische Kopplung) in den Zellen der glatten Muskulatur einen Zusammenhang zwischen der Veränderung des Tonus und der Konzentration der zyklischen Nukleotide herstellen (chemomechanische Kopplung). Graphisch zeigte sich eine exponentielle Beziehung. Dies veranschaulicht den Einfluß von HDL auf den Relaxationszustand des Gefäßes. Die gemessene große Änderung der Nukleotidkonzentrationen in gepooltem HDL führt zu einer Tonusabnahme (Vasorelaxation).

## **4.4 Einfluß von Apolipoprotein E**

Ein wichtiger Bestandteil von HDL ist das Apolipoprotein E. Das 34 kDa schwere Glykoprotein existiert in drei kodominant vererbten Allelen: E2, E3, E4. Diese drei Isoformen unterscheiden sich strukturell lediglich hinsichtlich einer Aminosäuresequenz, welche jedoch zu erheblichen funktionell relevanten Unterschieden im Lipoproteinmetabolismus führt. Das Apo E4-Allel ist mit kardio- und neurovaskulären Erkrankungen assoziiert. Ein ApoE-Defekt (E0/E0) ist mit Dyslipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen verknüpft.

### **4.4.1 Einfluß von Apo E4/E4 auf die flussabhängige Dilatation**

Unsere Daten zeigen, daß Gefäßpräparate unter dem Einfluß von Apo E4/E4 bei steigendem Fluß kontrahieren und sich ihr Membranpotential in Richtung Depolarisation ändert. Im Vergleich zu den Kontrollpräparaten und den Präparaten in gepooltem HDL zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Bereits der Basaltonus war unter dem Einfluß von ApoE4/4 höher. Die flussabhängige Dilatation wurde durch ApoE4/4 regelhaft unterbunden.

Die chinesische Arbeitsgruppe um Guangda [53] kam zu einem ähnlichen Schluß. Sie zeigte in einer Studie mit 144 chinesischen Typ II Diabetes-Patientinnen im Frühstadium ohne klinisch manifeste Angiopathie, daß die FDD bei Trägerinnen des ApoE4/E4-Allels signifikant niedriger war als bei Trägerinnen des E2/3- oder E2/2-Allels.

In einer schwedischen Studie in den 1996er Jahren [2] wurde die Hautgefäßreaktion auf verschiedene vasodilatierende Substanzen an einer Gruppe von Apo E4 Trägern und einer Gruppe ohne Vorhandensein eines E4-Allels getestet. Bei den E4-Trägern zeigte sich eine verminderte Vasodilatation.

Viele Studien zeigen klar den Zusammenhang zwischen einer verminderten flussabhängigen Dilatation und dem Entstehen einer Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen. Unsere Daten zeigen somit eine Verbindung zwischen dem E4-Allel und der Pathogenese der Atherosklerose auf. In der Rotterdam-Studie wurde herausgearbeitet, daß die zwei Hauptformen von Demenz, Alzheimer-Krankheit und vaskuläre Demenz mit Atherosklerose assoziiert sind. Ferner besteht eine Interaktion zwischen Apolipoprotein E und Atherosklerose in der Ätiologie der Alzheimer Erkrankung besteht [56]. Messungen des zerebralen Blutflusses bei Patienten mit Alzheimer mittels cMRT ergaben einen klaren Zusammenhang zwischen zerebraler Hypoperfusion und der Erkrankung, außerdem einen Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen [106]. Kalmijn et al. [59] wiesen einen synergistischen Effekt von zerebrovaskulärer Erkrankung und ApoE4 auf den kognitiven Abbau bei alten Menschen nach (Risikoerhöhung um den Faktor 4,7 bei Personen mit zerebrovaskulärer Erkrankung, 3,3-faches Risiko bei ApoE4-Trägern, und eine *Odds ratio* von 17,2 bei Personen, die ein Apo E4-Allel hat-

ten und an einer zerebrovaskulären Erkrankung litten). Eine weitere neuropathologische Untersuchung demonstrierte, daß die Pathogenese der AD auf vaskulärer Ebene zu finden ist und mit dem Vorkommen atherosklerotischer Plaques assoziiert ist [135].

Eine finnische Arbeit aus dem Jahr 2007 [50] hat den Zusammenhang zwischen dem ApoE-Polymorphismus und der Intima-Media-Dicke (IMT) von den a. carotides und coronariae untersucht. Mit Hilfe der quantitativen Koronarangiographie und des Farbdopplers wurde bei 91 Patienten das Vorliegen einer Carotis- und Koronarsklerose gezeigt. Zuvor wurden die Patienten ApoE genotypisiert. Es lag vorwiegend der apoE3 (E3/E3) und apoE4 (E4/E4 und E4/E3)-Genotyp vor. Es zeigte sich, dass Apo E4-Träger eine größere Intima-Media-Dicke besaßen und eine schwerere Koronarsklerose aufwiesen als E3-Träger. Somit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Apo E-Polymorphismus und der IMT der Carotiden sowie einer Koronarsklerose nachgewiesen werden [50]. In einer weiteren finnischen Arbeit aus dem Jahr 2000 wurde unter Anwendung gleicher Methoden gemessen, daß die IMT beim E4/E4-Genotyp am höchsten, beim E3/E3-Genotyp mittelhoch und am geringsten beim E3/E2-Genotyp war. Somit ist das E3/E2-Genom ein protektiver Faktor in der Entwicklung einer Carotidensklerose. Auch hier ergab sich eine signifikante Beziehung zwischen gemessener IMT und dem ApoE-Genotyp [57].

In der Literatur findet sich ein weiterer Zusammenhang, und zwar zwischen ApoE4 und Hypertonus. 2004 zeigten Xiaotao et al. [132], daß das Apolipoprotein E4-Allel stark mit der Hypertension und Atherosklerose der a. carotides assoziiert ist. In einer Studie mit 94 Hypertonikern und 102 gesunden Kontrollen trat in der Apo-E-Genotypisierung verstärkt der Apolipoprotein E3/4-Genotyp und das E4-Allel bei den Hypertonikern auf. Bei Patienten mit diesem Genotyp war auch der systolische Blutdruckwert signifikant höher als bei Individuen mit einem E2/3- oder E3/3-Genotyp. Desweiteren wurden erhöhte Spiegel von TC, LDL-C und ApoB bei Hypertonikern mit Apo E4-Allel im Vergleich zu Trägern des Apo E2- oder E3-Allels gemessen. Die Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Carotiden zeigte erhöhte Werte für Träger des E4-Allels im Vergleich zu Trägern des E2- und E3-Allels.

2005 analysierten Bhavani et al. [13] die mögliche Bedeutung des Apo E-Polymorphismus bei der Entstehung der essentiellen Hypertonie anhand einer Fall-Kontroll-Studie. Bei Genotypisierung ergab sich für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eine erhöhte Inzidenz des E4-Allels. Die Träger dieses Allels hatten ein zweifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Hypertonus. Ihre Lipidwerte waren stark erhöht. Insgesamt korrelierten Apo E-Genlocus, Hypertonus und Lipidspiegel stark. Unsere Daten liefern somit wichtige Hinweise für eine Assoziation von ApoE4 mit der Atherosklerose, der AD und dem Hypertonus. In der

Pathophysiologie der drei Erkrankungen geht man von einer krankhaften Gefäßveränderung aus.

#### **4.4.2 Einfluß von Apo E0/E0 auf die flussabhängige Dilatation**

In unseren Messungen kam es unter dem Einfluß von HDLapoE0/E0 für die de-endothelialisierten Präparate bei steigendem Fluß zu einer leichtgradigen Kontraktion. Welche klinische Schlußfolgerung kann man daraus ziehen? Setzt bei Individuen mit einem Apo-E-Defekt (Apo E0/E0) ein vasokonstriktorisches Effekt trotz Vorhandensein von HDL ein? In der Literatur ist eine solche Wirkung bislang nicht beschrieben worden. Mögliche Erklärungen dafür könnten sein:

##### *Hypothese:*

Möglicherweise hat ApoE einen so starken Einfluß auf die HDL-vermittelte FDD über z.B. seine Co-Aktivierung des SR-BI Rezeptors, dass ein genetischer ApoE-Defekt die SR-BI-Aktivierung limitiert.

Welche Publikationen gibt es über die Bedeutung des Apo E für die Aktivierung des SR-BI Rezeptors? Welche Bedeutung hat ein Apo E-Gendefekt für die Gefäßrelaxation?

Chroni et al. [18] untersuchten im Mausmodell die Wechselwirkung von Apo E und SR-BI-Rezeptor. Sie beobachteten, dass nur lipidgebundenes ApoE den SR-BI-vermittelten Cholesterolefflux unterstützt. Die Amino-terminale Region des Apo E ist verantwortlich für die Rezeptorbindung und für den Cholesterolefflux. Die SR-BI-ApoE-Interaktionen tragen zur Cholesterolemie in den Zellen und Geweben bei, welche SR-BI und ApoE exprimieren.

D'Uscio et al. [32] untersuchten im Mausmodell zur menschlichen Arteriosklerose das Entstehen der ED bei Mäusen mit einem Apo-E-Defekt. Sie beobachteten, dass die endothelabhängige Gefäßrelaxation bei diesen Mäusen durch zwei Befunde beeinträchtigt wird. Aus einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen und infolge dessen durch eine reduzierte NO-Synthase-Aktivität (nicht jedoch durch eine verminderte enzymatische Expression) resultiert eine verminderte NO-Biosynthese. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Untersuchungen von Mujyanya-Ludunge et al. [91]. Der Arbeitsgruppe gelang erstmalig eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation und eine reduzierte Bildung atherosklerotischer Plaques in den Carotiden durch einen eNOS-Gentransfer in den Apo E-defizienten Mäusen. Ihr Befund ist bahnbrechend für gentherapeutische Ansätze der Atherosklerose und letztlich damit auch zur „Behandlung“ eines ApoE-Gendefektes.

Die bisher genannten Publikationen beziehen sich allerdings nur auf Beobachtungen im Tier-versuch. Es stellt sich die Frage, ob beim Menschen ein analoger Mechanismus angenommen werden kann? Oemar et al. [95] beobachteten an menschlichen Carotisarterien mit schwerer Atherosklerose eine verminderte eNOS-Protein-Expression und eine verminderte NO-Freisetzung. Hingegen beobachteten andere Arbeitsgruppen [60,96] im Tiermodell keine verminderte eNOS-Expression (als ursächlichen Mechanismus für die reduzierte endothel-abhängige Dilatation) in arteriosklerotischen Aorten. Vielmehr wurde die verstärkte Sauerstoffradikalbildung als ursächlich angesehen.

Diese Diskrepanz mag möglicherweise auf eine unterschiedlich lange Dauer der cholesterol-reichen Diät in den Versuchen und auf die Spezies-spezifische Dauer des arteriosklerotischen Prozesses zurückzuführen sein – im Bereich von Monaten im Tiermodell versus Dekaden beim Patienten. Laursen et al. [72] beobachteten im Mausmodell, dass reaktive Sauerstoffradikale die endothelabhängige Vasorelaxation von ApoE-defizienten Mäusen mit Arteriosklerose beeinflussten, und zwar über zwei Mechanismen: (1) über eine direkte Interaktion mit NO und (2) über eine Interaktion mit Tetrahydrobiopterin. Dieses ist ein wichtiger Cofaktor der NO-Synthase. Eine Oxidation von Tetrahydrobiopterin durch Peroxynitrit ist die Ursache für die „Entkopplung“ der NO-Synthase. Peroxynitrit oxidiert Tetrahydrobiopterin zu Dihydrobiopterin. Hieraus lässt sich folgende Hypothese entwickeln.

*Hypothese:*

Spezifische vasokonstriktorische Substanzen sind bei Individuen mit ApoE-Defekt stärker exprimiert als beim Gesunden.

Erst kürzlich konnte durch Maguire et al. [77] im Apo E-Knockout Mausmodells gezeigt werden, daß in den Aorten der Tiere, welche noch keine atherosklerotischen Läsionen aufwiesen, die Endothelin-vermittelte Vasokonstriktion signifikant erhöht war. Die ET-Rezeptor-Dichte und Rezeptor-Subtyp-Expression waren jedoch nicht erhöht, wie bereits durch d’Uscio et al. [32] beschrieben. Ferner war die vaskuläre Reaktivität auf ET signifikant erhöht. Demnach erfolgten die Veränderungen im Endothelin-System bei diesen Tieren in einem frühen Krankheitsstadium, d.h. vor atherosklerotischer Plaque-Bildung. Sie führen zu einer verstärkten Progression der Erkrankung.

*Hypothese:*

Die eNOS Aktivität ist vermindert bei Individuen mit Apolipoprotein E-Defekt.

Auch dieses konnte im Tierexperiment an ApoE-Knockout-Mäusen gezeigt werden. Die Endothel-abhängige, NO-vermittelte Vasodilatation von ApoE-Knockout-Mäusen war deutlich aufgrund einer im L-Citrullin-Assay verzeichneten Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen eNOS-Aktivität vermindert. Die NO-Synthase-Protein-Expression war hingegen unverändert [35].

#### *Hypothese:*

Der cGMP Spiegel ist bei Apo E-Gendefekt vermindert.

Ebenfalls im Tiermodell mit Apo E-Knockout-Mäusen konnten signifikant erniedrigte cGMP-Spiegel in ihren Aorten gemessen werden, wobei die cAMP-Spiegel unverändert waren [35]. Dies spricht für einen selektiven Verlust der cGMP-abhängigen Gefäßfunktion. Ein reduzierter cGMP-Spiegel führte zu einer verminderten Relaxation. Die gleiche Beobachtung machten auch wir im Rahmen unserer Experimente unter dem Einfluß von Apo E0/E0.

Neben dem Apo E4-Allel ist auch der Apo E-Gendefekt mit einem Hypertonus assoziiert. In unseren Versuchen kam es unter dem Einfluß von Apo E0 zu einer Vasokonstriktion.

So entwickelten in Tierexperimenten mit Apo E-Knockout-Mäusen diese eine erhebliche Hypercholesterinämie mit spontaner Arteriosklerose. Ebenso führten die arteriosklerotischen Läsionen im Bereich der Nierenarterien zu einer systemischen Hypertension und zu einer endothelialen Dysfunktion [132,136].

## **5 Zusammenfassung**

### **5.1. Limitationen**

Die Verwendung humaner Koronararterien aus explantierten Herzen geht mit einer Fallzahlbegrenzung angesichts limitierter Transplantationszahlen einher. Die zeitnahe Entnahme/Präparation der Gefäße zog einen erheblichen zeitlichen und personellen Aufwand nach sich.

Es besteht eine Heterogenität des Patientenkollektivs hinsichtlich Alter, Geschlecht, Risikofaktoren und Nebendiagnosen. Diese Faktoren besitzen einen Einfluß auf die Endothelfunktion und Atheroskleroseentwicklung und beeinflussen somit auch die gemessene Tonusentwicklung der Präparate.

Bei der Präparation wurde daher penibel darauf geachtet, keine Gefäßabschnitte zu verwenden, an denen sich makroskopisch sichtbare Atheroskleroseläsionen zeigten. Mikroskopische Veränderungen wurden jedoch nicht berücksichtigt.

Zudem sind physiologische Variabilitäten der verwendeten arteriellen Gefäßabschnitte denkbar. Dieser Variabilität wurde durch eine Normierung des Reaktionsverhaltens auf Kontrollbedingungen Rechnung getragen. Die zusätzliche Durchführung einer Messung in Krebslösung an jedem Präparat zu den Messungen in HDL erhöhte die Vergleichbarkeit. Alle Gefäße wurden vor Versuchsbeginn mehrere Stunden in Krebslösung zur Herstellung einer physiologischen Homöostase des Ionengleichgewichtes und Schaffung vergleichbarer Ausgangsbedingungen äquilibriert. Dies diente ebenfalls dazu, die Effekte verabreichter Medikamente mit einem möglichen Einfluß auf die Vasomotorik auszuschalten.

Es erfolgte eine De-Endothelialisierung der Präparate mittels einmaligem, vorsichtigem Abschaben des Endothels mittels Skalpell. Daraus ergibt sich untersucherabhängig eine eingeschränkte Vergleichbarkeit. Sie ist davon abhängig, ob wirklich alles Endothel entfernt wurde.

Um den oxidativen Stress für die Präparate möglichst gering zu halten, erfolgte eine zeitnahe Koronarpräparation, ein lichtgeschützter Transport ins Labor in Krebslösung, eine standardisierte Äquilibration und Feinpräparation in Krebslösung und ein Einspannen bei einem Fluß von 3 mL/min.

## **5.2. Zusammenfassung**

Atherosklerose, eine seit Beginn der Menschengeschichte bekannte Erkrankung, ist noch immer weltweit die führende Todesursache. Als wichtiger atheroprotektiver Faktor gilt unter anderem ein hoher HDL-Spiegel. Ein wichtiger Bestandteil des HDL ist das Apolipoprotein E (ApoE), welches hauptsächlich in den drei Isoformen E2, E3, E4 vorkommt. Gerade in der frühen Entwicklung der Atherosklerose spielt die gestörte FDD eine Rolle. Die Wirkung der verschiedenen HDL-Isoformen auf die FDD ist ein bislang unzureichend untersuchter Bereich.

Unsere Studienergebnisse zeigen, daß HDL wirkungsvoll und endothelvermittelt die flussabhängige Dilatation steigern kann durch eine NO-Erhöhung, gemessen an der erhöhten cAMP- und cGMP-Konzentration. HDL wirkt somit anti-atherosklerotisch. Die FDD ist dabei vor allem endothelvermittelt, denn nach Entfernen des Endothels zeigte sich eine zwar noch bestehende, im Vergleich jedoch erheblich reduzierte FDD in nativem HDL. Hierfür sind am ehesten Wechselwirkungen des HDL mit der extrazellulären Matrix verantwortlich, vor allem mit Proteoglykanen.

Unsere Ergebnisse decken sich sehr mit neuesten Erkenntnissen zum HDL, denen zufolge es bei akuter bzw. chronischer Inflammation zu relevanten Veränderungen der HDL-Effekte

kommen kann, mit einer Wendung zu einem pro-inflammatorischen Partikel. So besitzt das HDL von KHK-Patienten veränderte Endothelwirkungen mit Verlust seiner atheroprotektiven Wirkung.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß sich bestimmte genetische Mutationen wie HDLapoE4/E4 oder HDLapoE0/E0 negativ auf die FDD auswirken, es kommt unter ihrem Einfluß sogar zu einer Vasokonstriktion. Möglicherweise kommt es durch die Wechselwirkung dieser Apo E-Isoformen mit dem HDL zu einer Veränderung seiner endothelprotektiven Effekte bis hin zu pro-atherogenen Wirkungen.

Die vorliegende Arbeit bestätigt somit die zum Teil früher bereits beschriebenen heterogenen Endothelwirkungen von HDL. Weiterhin zeigt sie, daß ApoE als bekannter Risikofaktor für kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen zum Erkrankungsgeschehen durch eine Beeinträchtigung der flussabhängigen Dilatation beiträgt.

## 6 Literatur

- [1] Abletshaus C, Klüßendorf D, Schmidt A, Winkler K, März W, Buddecke E, Malmsten M, Siegel G. Biosensing of arteriosclerotic nanoplaque formation and interaction with HMG-CoA reductase inhibitor. *Acta Physiol Scand* 2002; 176: 131-145.
- [2] Algotsson A, Nordberg A, Lannfelt L, Almkvist O, Winblad B. Apolipoprotein E epsilon4 allele, skin vessel reactivity and vascular risk factors in Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 1996; 22(3): 223-32.
- [3] Aliev G, Obrenovich ME, Tabrez S, Jabir NR, Reddy VP, Li Y, Burnstock G, Cacabelos R, Kamal MA. Link between cancer and Alzheimer disease via oxidative stress induced by nitric oxide-dependent mitochondrial DNA overproliferation and deletion. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:962984.
- [4] Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(8-9): 1078-87.
- [5] Assanasen C, Mineo C, Seetharam D, Yuhanna IS, Marcel YL, Connelly MA, Williams DL, de la Llera-Moya M, Shaul PW, Silver DL. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J Clin Invest* 2005; 115(4): 969-77.
- [6] Attems J, Jellinger KA. The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease-lessons from pathology. *BMC Med* 2014; 12: 206.
- [7] Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phos

- phorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996;78(5): 750-8.
- [8] Bartunek J, Mohan P, Paulus WJ, Cagan S. Paracrine modulation of coronary vasomotor tone and myocardial performance by vascular and endocardial endothelium. *Brastisl Lek Listy* 1995; 96(2): 69-75.
- [9] Bauer C. Blut ein flüssiges Organsystem. In: Rainer Klinke und Stefan Silbernagel (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York: (1994) 185-186, 365f
- [10] Bayliss WM. On the local reaction of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol (London)* 1902; 28: 220 -31.
- [11] Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJ, Bittner V, Fruchart JC; Treating to New Targets Investigators. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2007; 357(13): 1301-10.
- [12] Bevan JA, Joyce EH, Wellman GC. Flow-dependent dilation in a resistance artery still occurs after endothelium removal. *Circ Res* 1988; 63(5): 980-5.
- [13] Bhavani AB, Sastry KB, Reddy NK, Padma T. Lipid profile and apolipoprotein E polymorphism in essential hypertension. *Indian Heart J* 2005; 57(2): 151-7.
- [14] Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium, *Thromb Haemost* 1997; (Bd 77), Nr. 3: 408-23.
- [15] Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosa-trienoic acids as endothelium-derived-hyperpolarizing-factors. *Circ. Res* 1996; 78: 415-423.
- [16] Castelli WP. Cardiovascular disease and multifactorial risk: challenge of the 1980s. *Am Heart J* 1983; 106(5 Pt 2): 1191-200.
- [17] Cavelier C, Ohnsorg PM, Rohrer L, von Eckardstein A. The  $\beta$ -chain of cell surface F(0)F(1) ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(1): 131-9.
- [18] Chroni A, Nieland TJ, Kypreos KE, Krieger M, Zannis VI. SR-BI mediates cholesterol efflux via its interactions with lipid-bound ApoE. Structural mutations in SR-BI diminish cholesterol efflux. *Biochemistry* 2005; 44(39): 13132-43.
- [19] Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337-3349.
- [20] Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* 1978; 58: 255-303.
- [21] Connelly MA, de la Llera-Moya M, Monzo P, Yancey PG, Drazul D, Stoudt G, Fournier N, Klein SM, Rothblat GH, Williams DL. Analysis of chimeric receptors shows that multiple distinct functional activities of scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), are localized to the extracellular receptor domain. *Biochemistry* 2001; 40(17): 5249-59.
- [22] Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79(5): 984-9.

- [23] Curtiss LK. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11(3): 243-51.
- [24] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75(3):519-60.
- [25] Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8(1): 1-21.
- [26] Dallongeville, J. Apolipoprotein E: proprietes physiologiques, polymorphysme et atherosclerose. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1993; 5: 707-717.
- [27] Dallongeville J, Tiret L, Visvikis S, O'Reilly DS, Saava M, Tsitouris G, Rosseneu M, DeBacer G, Humphries SE, Beisiegel U. Effect of apo E phenotype on plasma postprandial triglyceride levels in young male adults with and without a familial history of myocardial infarction: the EARS II study. *European Atherosclerosis Research Study. Atherosclerosis* 1999.
- [28] de Andrade M, Thandi I, Brown S, Gotto A Jr, Patsch W, Boerwinkle E. Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis. *Am J Hum Genet* 1995; 56(6): 1379-90.
- [29] Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302(18): 1993-2000.
- [30] Douglas SA, Ohlstein EH. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vasc Res* 1997; 34: 152-164.
- [31] Dreon DM, Krauss RM. Diet-gene interactions in human lipoprotein metabolism. *J Am Coll Nutr* 1997; 16: 313-24.
- [32] d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(6): 1017-22.
- [33] Eichner JE, Knuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, Mc Callum LM, Ferrell RE, Neaton JD. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993; 7: 160 – 165.
- [34] Falcone JC, Davis MJ, Meininger GA. Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol.* 1991; 260(1 Pt 2): H130-5.
- [35] Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 1998; 273(6): 3125-8.
- [36] Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res* 1997; 34(3):165-74.
- [37] Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; 88(11): E68-75.
- [38] Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1982; 257(12): 6653-5.

- [39] Frank PG, Pedraza A, Cohen DE, Lisanti MP. Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increases plasma high-density lipoprotein levels. *Biochemistry* 2001; 40(36): 10892-900.
- [40] Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3(9): 2007-18.
- [41] Gaehtgens, P. Das Kreislaufsystem In: Rainer Klinke und Stefan Silbernagel (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York: Kap. 8, 164 f (1994)
- [42] Gaw AJ, Bevan JA. Flow-induced relaxation of the rabbit middle cerebral artery is composed of both endothelium-dependent and -independent components. *Stroke* 1993; 24(1):105-10.
- [43] Geiselhoringer A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, Schlossmann J. IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J* 2004; 23(21): 4222-31.
- [44] Genest JJ Jr, Martin-Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH, Silberman SR, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992.
- [45] Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol* 1992; 9: 155-67.
- [46] Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Breser HB Jr. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 1981.
- [47] Gimbrone, MA, Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis, *Am J Cardiol* 1995; (Bd 75), Nr. 6: 67B-70B.
- [48] Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li XA, Zhu W, Uittenbogaard A, Smart EJ. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. *J Clin Invest* 2003; 111(10): 1579-87.
- [49] Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1): 8-15.
- [50] Granér M, Kahri J, Varpula M, Salonen RM, Nyssönen K, Jauhiainen M, Nieminen MS, Syväne M, Taskinen MR. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both carotid and coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007.
- [51] Greenow K. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med* 2005; 83(5): 329-42.
- [52] Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease, *Circulation* 1997. (Bd 96) Nr. 10, 3264-5.

- [53] Guangda X, Linshuang Z, Jie H, Ling Y, Huijuan X. Apo e4 allele is associated with endothelium-dependent arterial dilation in women with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 72(2): 155-61.
- [54] Handelsmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extensions of neuritis by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* 1992; 33: 1677 – 88.
- [55] Hecker, M.: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? *News Physiol Sci* 2000; Vol 15, 1f.
- [56] Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 1997; 349(9046): 151-4.
- [57] Ilveskoski E, Loimaala A, Mercuri MF, Lehtimäki T, Pasanen M, Nenonen A, Oja P, Bond MG, Koivula T, Karhunen PJ, Vuori I. Apolipoprotein E Polymorphism and carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *Atherosclerosis* 2000; 153 (1): 147-53.
- [58] Ishigami M, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY.: Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J Biol Chem* 1998; 273: 20156-61.
- [59] Kalmijn S, Feskens EJM, Launer LJ, Kromhout D. Cerebrovascular Disease, the Apolipoprotein e4 Allele, and Cognitive Decline in a Community-Based Study of Elderly Men. *Stroke* 1996; 27: 2230-2235.
- [60] Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, Miwa Y, Hirata K, Suematsu M, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 1996; 148(6): 1949-56.
- [61] Kaufmann JE, Iezzi M, Vischer UM. Desmopressin (DDAVP) induces NO production in human endothelial cells via V2 receptor- and cAMP-mediated signaling. *J Thromb Haemost* 2003; 1(4): 821-8.
- [62] Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JAK. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: Production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol* 1994; 159: 124 – 39.
- [63] Kern, R. Untersuchungen über die elektrischen Eigenschaften von Glasmikroelektroden. Inauguraldissertation Heidelberg (1996)
- [64] Kervinen K, Södervik H, Mäkelä J et al. Is the development of adenoma and carcinoma in proximal colon related to apolipoprotein E phenotype? *Gastroenterology* 1996; 110:1785 – 90.

- [65] Kitajima K, Marchadier DH, Miller GC, Gao GP, Wilson JM, Rader DJ. Complete prevention of atherosclerosis in apoE-deficient mice by hepatic human apoE gene transfer with adeno-associated virus serotypes 7 and 8. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(8):1852-7.
- [66] Kontny, A. Papaverinwirkung an isoliert arbeitenden Ratten- und Meerschweinchenherzen bei unterschiedlicher Kalziumkonzentration. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (2003).
- [67] Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 1990; 259(4 Pt 2): H1063-70.
- [68] Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 2014; 103(3): 350-61.
- [68a] Krohn S. Zur Wirkung vaskulärer Adrenorezeptoren in der High-Density-Lipoprotein-induzierten Relaxation menschlicher Koronararterien. Inaugural-Dissertation, Charité-Universitätsmedizin Berlin (2016)
- [69] Kuller Lh, Shemanski L, Manolio T et al. Relationship between ApoE, MRI findings and cognitive function in the Cardiovascular Health Study. *Stroke* 1998; 29: 388 – 98.
- [70] Kuvin JT, Ramet ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J* 2002; 144(1): 165 -72.
- [71] Kuvin JT, Patel AR, Sidhu M, Rand WM, Sliney KA, Pandian NG, Karas RH. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am J Cardiol* 2003; 92(3): 275 – 9.
- [72] Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103(9):1282-8.
- [72a] Lendner J. Die Interaktion von VLDL mit adrenergen Rezeptoren bei der flussabhängigen Dilatation an Koronararterien des Menschen, Inaugural-Dissertation, Charité Universitätsmedizin Berlin (2015)
- [73] Li P, Zou A, Campbell WB. Regulation of potassium channels in coronary smooth muscle by endothelium - derived vasodilators. *Hypertension* 1997; 29: 262 -267.
- [74] Li XA, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M, Uittenbogaard A, Smart EJ. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem* 2002; 277(13):11058-63.
- [75] Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int. J Cardiol* 2000; 73(3): 231-6.

- [75a] Liechtenstein JT. Differentielle Analyse des HDL-Proteoms mittels Massenspektrometrie, Inaugural Dissertation, dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg (2010).
- [76] Löffler G, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage, Springer Verlag Heidelberg; Kap. 25.4.5: 773 - 776 (2007).
- [77] Maguire JJ, Wiley KE, Kuc RE, Stoneman VE, Bennett MR, Davenport AP. Endothelin-mediated vasoconstriction in early atherosclerosis is markedly increased in ApoE<sup>-/-</sup> mouse but prevented by atorvastatin. *Exp Biol Med* 2006; 231(6): 806-12.
- [78] Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse Cholesterol transport. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1226-9.
- [79] Malmsten M, Siegel G, Becker A. A Model Substrate for Ellipsometry Studies of Lipoprotein Deposition at the Endothelium. *Journal of Colloid and Interface Science* 2001; 240: 372 – 374.
- [80] Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem* 2006; 13(14): 1655-65.
- [81] Meyer-Rath G. Der Einfluß von endothelständigen Proteoglykanen und subendothelialer Matrix auf die flußabhängige Gefäßmodulation isolierter gesunder und arteriosklerotischer Koronararterien des Menschen. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (2005).
- [82] Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(11): 1361-6.
- [83] Mineo C, Shaul PW.: Circulating cardiovascular disease risk factors and signaling in endothelial cell caveolae. *Cardiovasc Res* 2006; 70(1): 31-41.
- [84] Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98(11): 1352-64.
- [85] Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nature Genet* 1996; 14: 55 – 61.
- [86] Miyauchi T, Tomombe Y, Shiba R, Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Sugishita Y, Ita I, Goto K, Masaki T. Involvement of Endothelin in the regulation of human vascular tonus. Potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cells. *Circulation* 1990; 81(6): 1874-80.
- [87] Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J* 2001; 15(14): 2623-30.
- [88] Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(7): 252-6.
- [89] Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(8): 1551-7.
- [90] Mujynya-Ludunge K, Viswambharan H, Driscoll R, Ming XF, von Segesser LK, Kappenberger L, Yang Z, Vasalli G. Endothelial nitric oxide synthase gene transfer restores endothe-

- lium-dependent relaxations and attenuates lesion formation in carotid arteries in apolipoprotein E-deficient mice. *Basic Res Cardiol* 2004; 100(2): 102-11.
- [91] Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF induced coronary arteriolar dilation in vivo. *AM J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H459-H465.
- [92] Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004; 113(4): 569-81.
- [93] O'Connell BJ, Genest J Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001; 104(16): 1978-83.
- [94] O'Neill F, Riwanto M, Charakida M, Colin S, Manz J, McLoughlin E, Khan T, Klein N, Kay CW, Patel K, Chinetti G, Staels B, D'Aiuto F, Landmesser U, Deanfield J. Structural and functional changes in HDL with low grade and chronic inflammation. *Int J Cardiol* 2015; 188: 111-6.
- [95] Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 97(25): 2494-8.
- [96] Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91(6): 2546-51.
- [97] Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginin. *Nature* 1988; 333: 664 – 6.
- [98] Pencina MJ, D'Agostino RB, Zdrojewski T, Williams K, Thanassoulis G, Furberg CD, Peterson ED, Vasan RS, Sniderman AD. Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C. *Eur J Prev Cardiol* 2015; 22(10): 1321-7.
- [99] Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71(2): 343-53.
- [100] Poirier J, Minnich A, Davignon J. Apolipoprotein E, synaptic plasticity and Alzheimer's disease. *Ann Med* 1995; 27: 663 -70.
- [101] Pries AR, Secomb TW, Gaetgens P. The endothelial surface layer. *Pflügers Arch* 2000; 440: 653–666.
- [102] Reyland ME, Gwynne JT, Forgez P, Prack MM, Williams DL. Expression of the human apolipoprotein E gene suppresses steroidogenesis in mouse Y1 adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2375-9.
- [103] Riddell DR, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine nitric oxide pathway-Implications for vascular disease. *J Biol Chem* 1997; 272: 89

- [104] Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, Perisa D, Heinrich K, Altwegg L, von Eckardstein A, Lüscher TF, Landmesser U. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density-lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome-remodeling. *Circulation* 2013; 127(8): 891-904.
- [105] Riwanto M, Rohrer L, von Eckardstein A, Landmesser U. Dysfunctional HDL: from structure-function-relationships to biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 224: 337-66.
- [106] Roher AE, Debbins JP, Malek-Ahmadi M, Chen K, Pipe JG, Maze S, Belden C, Maarouf CL, Thiyyagura P, Mo H, Hunter JM, Kokjohn TA, Walker DG, Kruchowsky JC, Belohlavek M, Sabbagh MN, Beach TG. Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vasc Health Risk Manag* 2012; 8: 599-611.
- [107] Rohrer L, Ohnsorg PM, Lehner M, Landolt F, Rinninger F, von Eckardstein A. High-density lipoprotein transport through aortic endothelial cells involves scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter G1. *Circ Res* 2009; 104(10): 1142-50.
- [108] Rye KA, Bright R, Psaltis M, Barter PJ. Regulation of reconstituted high density lipoprotein structure and remodeling by apolipoprotein E. *J Lipid Res* 2006; 47(5): 1025-36.
- [109] Sabouni MH, Ramagopal MV, Mustafa SJ. Relaxation by adenosine and its analogs of potassium-contracted human coronary arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 341(4): 388-90.
- [110] Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation* 1991; 84(1): 129-39.
- [111] Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G, Forte TM, Ordovas JM, Zech LA, Brewer HBJr. Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest* 1986; 78(5): 1206-19.
- [111a] Schlangen J. Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an Koronararterien des Menschen, Inaugural-Dissertation, Charité Universitaetsmedizin Berlin (2010).
- [112] Schretzenmayr, A. Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit. *Arch Exp Pathol* 1932; 164: 743 -48.
- [113] Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 2003; 547(Pt 1): 21-33.
- [114] Shore B, Shore VB. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 1973; 12: 502-507.
- [115] Siegel G, Nuck R, Schnalke F, Michel F. Molecular Evidence for Phytopharmaceutical K<sup>+</sup> Channel Opening by Garlic in Human Vascular Smooth Muscle Cell Membranes. *Phytotherapy Research* 1998; VOL. 12, S149-S151.
- [116] Siegel G, Malmsten M, Klüssendorf D, Leonhardt W. Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999; 144(1): 59-67.

- [117] Siegel G, Malmsten M, Klüßendorf D, Michel F. A receptor-based biosensor for lipoprotein docking at the endothelial surface and vascular matrix. *Journal of Biosensors and Bioelectronics* 2001; 16, 895-904.
- [118] Siegel G, Malmsten M, Ermilov E. Anionic biopolyelectrolytes of the syndecan/perlecan superfamily: physicochemical properties and medical significance. *Adv Colloid Interface Sci* 2014; 205: 275-318.
- [119] Silbernagel S, Klinke R *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag. Kapitel 14, 365.
- [120] Silver PJ. Biochemical aspects of inhibition of cardiovascular low (Km) cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. *Am J Cardiol* 1989; 63: 2A-8A.
- [121] Statistisches Bundesamt. Anzahl der Gestorbenen 2013. (Stand: 2013)
- [122] Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein Polymorphism predicts death from coronary artery disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 265-269.
- [123] Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4725-7.
- [124] Takuwa Y, Yanagisawa M, Takuwa N, Masaki T. Endothelin, its diverse biological activities and mechanisms of action. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1(4): 195-206.
- [125] Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, Wang N, Mzhavia N, Langlois R, Pagler T, Li R, Welch CL, Goldberg IJ, Tall AR. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest* 2008; 118(11): 3701-13.
- [126] Van Erpecum KJ, Carey MC. Apolipoprotein E4: Another risk factor for cholesterol gallstone formation? *Gastroenterology* 1996; 111: 1764-7.
- [127] van de Woestijne AP, van der Graaf Y, Liem AH, Cramer MJ, Westerink J, Visseren FL; SMART Study Group. Low high-density lipoprotein cholesterol is not a risk factor for recurrent vascular events in patients with vascular disease on intensive lipid-lowering medication. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(20): 1834-41.
- [128] Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, Hindy G, Hólm H, Ding EL, Johnson T, Schunkert H, Samani NJ, Clarke R, Hopewell JC, Thompson JF, Li M, Thorleifsson G, Newton-Cheh C, Musunuru K, Pirruccello JP, Saleheen D, Chen L, Stewart A, Schillert A, Thorsteinsdottir U, Thorgeirsson G, Anand S, Engert JC, Morgan T, Spertus J, Stoll M, Berger K, Martinelli N, Girelli D, McKeown PP, Patterson CC, Epstein SE, Devaney J, Burnett MS, Mooser V, Ripatti S, Surakka I, Nieminen MS, Sinisalo J, Lokki ML, Perola M, Havulinna A, de Faire U, Gigante B, Ingelsson E, Zeller T, Wild P, de Bakker PI, Klungel OH, Maitland-van der Zee AH, Peters BJ, de Boer A, Grobbee DE, Kamphuisen PW, Deneer VH, Elbers CC, Onland-Moret NC, Hofker MH, Wijmenga C, Verschuren WM, Boer JM, van der Schouw YT, Rasheed A, Frossard P, Demissie S, Willer C, Do R, Ordovas JM, Abecasis GR, Boehnke M, Mohlke KL, Daly MJ, Guiducci C, Burt NP, Surti A, Gonzalez E, Purcell S, Gabriel S, Marrugat J, Peden J, Erdmann J, Diemert P, Willenborg C, König IR, Fi-

- scher M, Hengstenberg C, Ziegler A, Buysschaert I, Lambrechts D, Van de Werf F, Fox KA, El Mokhtari NE, Rubin D, Schrezenmeir J, Schreiber S, Schäfer A, Danesh J, Blankenberg S, Roberts R, McPherson R, Watkins H, Hall AS, Overvad K, Rimm E, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Cupples LA, Reilly MP, Melander O, Mannucci PM, Ardissino D, Siscovick D, Elosua R, Stefansson K, O'Donnell CJ, Salomaa V, Rader DJ, Peltonen L, Schwartz SM, Altshuler D, Kathiresan S. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 2012; 380(9841): 572-80.
- [129] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; 260: 1124-7.
- [130] Worner R, Lukowski R, Hofmann F, Wegener JW. cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(1): H237-44.
- [131] Wu X, Haystead TA, Nakamoto RK, Somlyo AV, Somlyo AP. Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(18): 11362-9.
- [132] Xiaotao L, Yanmei D, Yanfang D, Xizheng H. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with essential hypertension and its complications. *Clinical and Experimental Medicine* 2004; Vol. 2(4): 175-179.
- [133] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; (Bd 332), Nr. 6163: 411-5.
- [134] Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, Jin H. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(11): 2762-8.
- [135] Yarchoan M, Xie SX, Kling MA, Toledo JB, Wolk DA, Lee EB, Van Deerlin V, Lee VM, Trojanowski JQ, Arnold SE. Cerebrovascular atherosclerosis correlates with Alzheimer pathology in neurodegenerative dementias. *Brain* 2012; 135(Pt12): 3749-56.
- [136] Yeh DC, Duncan JA, Yamashita S, Michel T. Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin. *J Biol Chem* 1999; 274(46): 33148-54.
- [137] Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001; 7(7):853-7.
- [138] Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 2006; 84(4): 276-94.

## 7 Anhang

### Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Isabelle Moutongo Missala, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Der Einfluß von verschiedenen HDL-Isoformen auf die flussabhängige Gefäßmodulation menschlicher Koronarien“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 30.03.2016

Isabelle Missala

## **Lebenslauf**

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

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

## **Publikationen und Kongreßbeiträge**

Jungehülsing J, Endres M (Hrsg): Komplikationen und Folgeerkrankungen nach Schlaganfall, **Missala I**, Steinhagen-Thiessen E, Kap. 22: 142-9: Hohes Alter und Schlaganfall, 1. Auflage, Thieme Verlag 2015

Kassner U, Wühle-Demuth M, **Missala I**, Humphries SE, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I. Clinical utility gene card for: hyperlipoproteinemia, TYPE II. Eur J Hum Genet 2014 Jul; 22(7).

Kassner U / Grenkowitz T, **Missala I**, Meyer-zum-Büschelfelde D, Steinhagen-Thiessen E, The Use of Lp-PLA2 Measurement as a cardiovascular „finetuner“, 81. EAS Kongreß, 02.-05.06.2013, Lyon, Frankreich

**Missala I**, Kassner U, Steinhagen-Thiessen E. A systematic literature review of the association of Lipoprotein(a) and autoimmune diseases and atherosclerosis. J of International Rheumatology 2012, Special Section.

Steimann L, **Missala I**, van Kaick S, Walston J, Malzahn U, Heuschmann PU, Steinhagen-Thiessen E, Dohle C. [Rivermead assessment of somatosensory performance : Validation of a German version (RASP-DT)]. Nervenarzt 2012; 83(12):1632-7.

Symposiumsbeitrag: **Missala I.** Chronic Care Management - The Berlin Stroke Alliance, MIHealth Health Management and Clinical Innovations, Mont Juic Venue, 24-25 May 2012, Barcelona, Spain.

Posterbeitrag: **Missala I,** Kassner U, Gelsing C, Gauer N, Steimann L, Steinhagen-Thiessen E. Association of severe Hypertriglyceridemia (SHTG) and genetic lipoproteinlipase (LPL) mutation and cardio- or cerebrovascular disease. The International Conference on Heart and Brain, Paris France 1-3 March 2012.

Grube MM, Dohle C, Djouchadar D, Rech P, Bienek K, Dietz-Fricke U, Jöbges M, Kohler M, **Missala I,** Schönherr B, Werner C, Zeytountchian H, Wissel J, Heuschmann PU. Evidence-based quality indicators for stroke rehabilitation. Stroke. 2012; 43(1): 142-6.

Posterbeitrag: Steimann L, **Missala I,** van Kaick S, Walston J, Malzahn U, Heuschmann PU, Steinhagen-Thiessen E, Dohle C. Rivermead assessment of somatosensory performance (RASP), Validierung einer Deutschen Version, 84. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), Wiesbaden 28.09.-01.10.2011.

M. Gövercin, **I. M. Missala,** M. Marschollek, E. SteinhagenThiessen. Virtual Reality Rehabilitation and Telerehabilitation for the upper limb A Geriatric Review. Gerontology Special Section 2009.

Symposiumsbeitrag: **I.M. Missala,** Usability of a visual monitoring system, GSA 61st Annual Scientific Meeting at the Gaylord National Resort and Convention Center Washington D.C., America, November 21-25<sup>th</sup> 2008

Berlin, den 30.03.2016

Isabelle Missala

**Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Günter Siegel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion am Institut für Physiologie der Charité Berlin. Mit großer Begeisterung und hohem persönlichen Engagement auch bis in die Nacht hinein hat er wesentlich zum Abschluß dieser Arbeit beigetragen und mich für Wissenschaft und Forschung begeistert.

Auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Charité möchte ich mich herzlich für ihre langjährige Unterstützung bedanken. Dabei danke ich ganz besonders Frau Angela Becker für ihre Hilfe bei der Versuchsdurchführung und logistischen Organisation. Ihr Sinn für Perfektion, ihre langjährige Berufserfahrung und Routine und geduldige Anleitung waren für mich von großem Wert.

Für die Kooperation zur Gewinnung der Präparate danke ich Herrn Professor Dr. Roland Hetzer und den Mitarbeitern des Deutschen Herzzentrums Berlin.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Steinhagen-Thiessen und Frau Dr. Ursula Kassner und den Patienten des Stoffwechszentrums der Charité Berlin für die Bereitstellung der Lipidlösungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten des Deutschen Herzzentrums Berlin, die ihr Herz der Forschung zur Verfügung stellten. Ohne sie wäre dieses Projekt unmöglich gewesen.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie der Universität Freiburg unter Leitung von Herrn Professor Dr. Karl Winkler für die Gewinnung der Blutproben und die Isolierung der Lipoproteine.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Frau Dr. med. J. Schlangen und Dr. med. N. Fabich für die Kameradschaft und die gute Zusammenarbeit – wenn nötig auch tief in der Nacht im Rahmen der Versuchsdurchführung.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die durch ihre langjährige und unermüdliche Unterstützung, Gebete und Ermutigung, die Fertigstellung der Arbeit ermöglicht hat.