

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

DISSERTATION

IDLapoE-isoformspezifische Wirkung auf die flussabhängige
Vasodilatation und Bindung an anionische Biopolyelektrolyte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felicitas Mockenhaupt

aus Krefeld

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis	
Vorwort	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Abstrakt Deutsch	7
Abstract English	8
1. Einleitung	9
1.1. IDL in seiner klinischen Bedeutung	9
1.2. Lipoproteinmetabolismus	11
1.3. Intermediate-density Lipoprotein	12
1.4. Pathophysiologische Bedeutung von IDL	16
1.4.1. Modell der arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen durch IDL	17
1.4.2. Modell der cerebrovaskulären Nanoplaqueformation	17
1.5. Gefäßtonus	18
1.5.1. Flussabhängige Vasodilatation	18
1.5.2. Vegetative Regulation des Gefäßtonus	19
1.6. Zielsetzung	20
2. Material und Methodik	21
2.1. Studienkollektiv	21
2.2. Lösungen	21
2.2.1. IDL-Akquise	21
2.2.2. IDL-Apolipoprotein E-Isoformen	22
2.2.3. Krebslösung	22
2.2.4. Adrenorezeptorantagonisten	22
2.3. Materialgewinnung	22
2.4. Materialaufbereitung	23
2.5. Kraftmessung	23
2.5.1. Versuchsaufbau	23
2.5.2. Versuchsdurchführung	24
2.6. Potentialmessung	25
2.6.1. Versuchsaufbau	25
2.6.2. Versuchsdurchführung	26
2.7. Messung der Nukleotidkonzentrationen	26
2.7.1. Versuchsaufbau	26
2.7.2. Konzentrationsmessung von cAMP	27
2.7.3. Konzentrationsmessung von cGMP	27
2.7.4. Auswertung der Konzentrationsmessungen	28
2.8. Ellipsometriemessung	29
2.8.1. Versuchsaufbau	29
2.8.2. Versuchsdurchführung	30
2.9. Statistische Methoden	31
3. Ergebnisse	31
3.1. Charakteristika der Studienpopulation und Studienpräparate	31
3.2. Messung des Gefäßtonus und des Membranpotentials	32
3.2.1. Einfluss von IDL <i>pool</i>	32
3.2.2. Einfluss von IDL <i>pool</i> und Phentolamin	33
3.2.3. Einfluss von IDL <i>pool</i> und Propranolol	34
3.2.4. Einfluss von IDL <i>pool</i> mit Phentolamin und Propranolol	34
3.2.5. Einfluss der AR-Antagonisierung im Vergleich zu IDL <i>pool</i>	40
3.2.6. Einfluss von IDLapoE4/E4	41
3.2.7. Einfluss von IDL apo E0/E0 ohne und mit apoE3 _{syn}	42

Inhaltsverzeichnis

3.3. Bestimmung der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide	43
3.3.1. Einfluss von Krebslösung und IDL <i>pool</i>	43
3.3.2. Einfluss von homozygotem IDLapoE4/E4 und IDLapoE0/E0	44
3.4. Ellipsometriemessung	47
3.4.1. Arteriosklerotische Nanoplaqueformation mit IDLapoE3/E3 ohne und mit Glukose	47
3.4.2. Arteriosklerotische Nanoplaqueformation mit IDLapoE4/E4 mit und ohne Glukose	49
3.4.3. Alzheimer-Nanoplaqueformation mit IDLapoE4/E4 ohne und mit Glukose	51
4. Diskussion	53
4.1. Beeinflussung der flussabhängigen Dilatation	53
4.1.1. Flussabhängige Wirkung von IDLapoE-Isoformen	53
4.1.2. Flussabhängige Wirkungen der ApoE-Isoformen	55
4.1.3. Wirkung von IDL an den vaskulären Adrenorezeptoren	57
4.1.4. Möglicher vaskulärer Wirkmechanismus	58
4.2. Effekt von Glukose auf die Nanoplaqueformation	59
4.2.1. Bedeutung von IDL für die Alzheimer Nanoplaqueformation	61
4.3. Eigenschaften des Studiendesigns	62
4.4. Bedeutung von IDL für die klinische Verwendung	63
4.5. Bewertung des Gesamtmodells	63
5. Literaturverzeichnis	65
Eidesstattliche Versicherung	78
Lebenslauf	79
Publikationsliste	81
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	82
Danksagung	84

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Siegel, G., **Mockenhaupt, F.H.M.E.**, Behnke, A.-L., Ermilov, E., Winkler, K., Pries, A.R., Malmsten, M., Hetzer, R., Saunders, R., Lindman, B.: Lipoprotein binding to anionic biopolyelectrolytes and the effect of glucose on nanoplaque formation in arteriosclerosis and Alzheimer's disease. *Adv. Coll. Interface Sci.* 232, 25-35 (2016).

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer'sche Demenz
ApoB100	Apolipoprotein B100
ApoC	Apolipoprotein C
ApoE	Apolipoprotein E
AR	Adrenorezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
Ca ²⁺ -CAM	Ca ²⁺ -Calmodulin-Komplex
cAMP	zyklisches Adenosin-3'5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3'5'-monophosphat
Cl ⁻	Chloridionen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CVD	kardiovaskuläre Erkrankungen, <i>cardiovascular diseases</i>
DAG	1,2-Diazylglyzerin
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FFS	freie Fettsäuren
FVD	flussvermittelte Dilatation
GAG	Glykosaminoglykan
G-Protein	Guanylnucleotid-Protein
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HLP3	Hyperlipoproteinämie Typ 3, Remnant Hyperlipidämie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IDL	<i>intermediate-density lipoprotein</i>
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteinlipase

Abkürzungsverzeichnis

MLCK	Myosinleichtketten-Kinase
MLCP	Myosinleichtketten-Phosphatase
NO	Stickstoffmonoxid
NSB	nichtspezifische Bindung
PK	Proteinkinase
RCT	reverser Cholesterintransport
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TAG	Triacylglycerine
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TRL	<i>triglyceride-rich lipoprotein</i>
VLDL	<i>very low-density lipoprotein</i>

Abstrakt Deutsch

Einleitung: Kardiovaskuläre Erkrankungen als weltweit häufigste Todesursache sind initial unter anderem auf arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen zurückzuführen. Neben *low-density lipoprotein* (LDL) bildet *intermediate-density lipoprotein* (IDL) einen eigenständigen Risikofaktor für die Pathogenese arteriosklerotischer Insulte, sowie deren klinische Ausprägung. Für Hinweise auf eine IDL-induzierte endotheliale Dysfunktion sind bisher wenige Wirkmechanismen untersucht worden. Die arteriosklerotische Nanoplaqueformation als initialer vaskulärer Insult sowie die Verminderung der physiologischen flussabhängigen Dilatation sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Methodik: An Koronararterien vom Menschen wurden flussabhängige isometrische Tonuswerte (3-100 mL/min), transmembranale Potentiale, sowie die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP unter Superfusion mit IDLApoE-Isoformen erfasst. Ein Einfluss der Interaktion über Adrenorezeptoren wurde mittels Applikation von Phentolamin (10^{-4} mmol/L) und Propranolol (10^{-4} mmol/L) bestimmt. Arteriosklerotische und Alzheimer Nanoplaqueformationen der IDLApoE-Isoformen an Heparansulfat-Proteoglykanen, als endothelial exprimierten Rezeptoren, wurden mithilfe ellipsometrischer Messungen aufgezeichnet.

Ergebnisse: Die Messung der Gefäßtonusänderungen ergab für IDL in den Isoformen ApoE4, ApoE0, ApoE0 mit Addition eines synthetischen ApoE3 sowie vermischten Isoformen eine verminderte flussabhängige Vasodilatation. Begleitend wurden eine verminderte Hyperpolarisation sowie eine verminderte Konzentration der zyklischen Nukleotide gezeigt. Eine Applikation der Adrenorezeptorantagonisten Phentolamin und Propranolol konnte eine ebenfalls verringerte Relaxation der Gefäßpräparate zeigen. Die Erfassung der arteriosklerotischen Nanoplaqueformation für IDLApoE3 und IDLApoE4, welches zuvor mit Glukose inkubiert wurde, zeigte eine deutliche Adsorption der Lipoproteine auf einer Oberfläche, an die zuvor Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) gebunden wurde. Eine Hinzugabe von Amyloid- β führte unter typischen Umgebungskomponenten einer Alzheimer'schen Demenz ebenfalls zu einer Glukose-getriggerten Adsorption des Lipoproteins.

Schlussfolgerung: Eine Interaktion des IDL mit der flussabhängigen Vasodilatation ist möglicherweise über die Expression verschiedener Isoformen des ApoE und über die vaskulären

Abstrakt

Adrenorezeptoren vermittelt. Eine Hyperglykämie induziert eine vermehrte Adsorption des Lipoproteins unter arteriosklerotischen Bedingungen, sowie unter Amyloid β -Präsenz.

Abstract Englisch

Introduction: Cardiovascular diseases, causing highest mortality rates globally, are initially manifested in arteriosclerotic vascular dysfunction. Besides the well established low-density lipoprotein, intermediate-density lipoprotein (IDL) is an independent arteriosclerotic risk factor, causing clinical events. Pathomechanisms including IDL causing endothelial dysfunction are rarely known. Arteriosclerotic nanoplague formation as an initial insult and an impaired physiological flow-dependent vasodilatation are investigated in this study.

Methods: Therefore, we measured isometric tension of human coronaries dependent on increasing flow rates (3 to 100 mL/min) of different IDLapoE isoforms with or without application of phentolamin and propranolol or both. Additionally, intracellular membrane potential and the concentration of the cyclic nucleotides cAMP and cGMP were measured. With ellipsometric investigations, this study analyzed arteriosclerotic and Alzheimer nanoplague formation with different glucose incubated IDLapoE isoforms.

Results: IDL isoforms apoE4, apoE0, apoE0 with addition of synthetic apoE3 and pooled isoforms showed an impaired flow-dependent vasodilation. According to this, we also measured an impaired hyperpolarization and a decreased cAMP and cGMP concentration. Application of phentolamine and propranolol induced a similarly impaired relaxation of the coronaries. Measurement of arteriosclerotic and Alzheimer nanoplague formation for IDLapoE3 and IDLapoE4, preincubated with glucose, showed a significant increase of lipoprotein adsorption.

Conclusion: Different IDLapoE isoforms and the interaction between IDL and vascular adrenergic receptors seem to affect flow-dependent vasodilatation. Hyperglycemia highly increases arteriosclerotic and Alzheimer nanoplague formation with IDL.

1. Einleitung

1.1. IDL in seiner klinischen Bedeutung

Kardiovaskuläre Erkrankungen (Cardiovascular Diseases, CVD) als häufigste Todesursache global, verursachten 2012 mit geschätzten 17.5 Millionen Betroffenen fast ein Drittel der weltweiten Todesfälle [103]. Neben sozialen Auswirkungen, wie frühzeitiger Berentung und vermehrten Lebensjahren mit Behinderung oder Krankheit, bilden CVD den größten Beitrag zur nationalen Krankheitslast [103]. Sie verursachen erhebliche indirekte Kosten durch verminderte Produktivität und Gesundheitsausgaben gleichermaßen für Individuum und Staat [10,18,148].

CVD bilden auch in Europa mit einem Anteil von 47% der Gesamtmortalität im Jahr 2012 und deutschlandweit mit einem Anteil von knapp 40% im Jahr 2013 die häufigste Todesursache [18,95]. In einem Großteil der europäischen Länder zeigt sich ein Rückgang der Mortalitätsrate bedingt durch CVD mit insgesamt 4,6 Millionen Todesfällen im Jahr 2000 auf 4,4 Millionen im Jahr 2012. Dies kann auf die Auswirkungen von Gesundheitspräventionen in Staaten hohen Einkommens (High Income Countries), klassifiziert durch die Weltbank, zurückzuführen sein [95]. 80% der CVD treten in Staaten niedrigen und mittleren Einkommens (Low- and Middle-Income Countries, LMIC) auf [15]. In diesen stieg die Anzahl der CVD-bedingten Todesfälle. Insgesamt wird für 2030 eine Steigerung der Mortalitätsrate durch CVD auf 6 Millionen erwartet. Hinzu kommt eine dreifach erhöhte Rate an disability adjusted life years (DALYs) in LMIC, im Vergleich zu HIC. Diese quantifizieren durch Summation der vorzeitigen Todesrate eines Landes im Vergleich zum globalen Durchschnittsalter und Lebensjahren mit einer Behinderung oder Krankheit, die verringerte Lebensqualität eines Landes. Kosteneffektive Interventionen, Präventionsmaßnahmen sowie Diagnosemöglichkeiten werden in steigendem Maße für die Verminderung des CVD-Risikos untersucht [148].

Risikofaktoren im individuellen Verhalten wie körperliche Inaktivität, Nikotinabusus, erhöhter Alkoholkonsum und fett- und kalorienreiche Ernährung lassen sich anhand ihrer primären Effekte wie Adipositas, Hypertonus, Hyperglykämie und Hyperlipidämie klinisch erfassen [5,7,103,147]. Diese sogenannten „Intermediären Risikofaktoren“ tragen zur Bildung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen bei und erlauben bei ihrer frühzeitigen Erkennung und Beeinflussung einen verbesserten klinischen Outcome, bzw. eine verminderte Morbidität [3].

Hyperglykämie als Leitsymptom des Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie sowie arteriosklerotische Gefäßveränderungen gelten außerdem als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung kognitiver Einschränkungen, einer vaskulären Demenz sowie einer Alzheimer'schen

Einleitung

Demenz (AD). Epidemiologisch zeigt sich ein Risiko für das Auftreten der AD bei Patienten mit erhöhter Nüchtern glukose (nüchterne Glukosekonzentration 110-125 mg/dL) oder Diabetes mellitus (nüchterne Glukosekonzentration ≥ 126 mg/dl) [30,146]. Interaktionen zwischen metabolischem Syndrom und neurodegenerativen Erkrankungen rücken mit ansteigender Inzidenz beider Morbiditäten ins Forschungsinteresse. 46,5 Millionen Menschen weltweit leiden an einer Demenz, die in 60-70% der Fälle auf die Hauptursache AD zurückzuführen ist [104]. Charakteristische Symptome sind unter anderem verringerte Gedächtnisleistungen, sprachliche Dysfunktionen und progressive motorische Verschlechterungen (Dyspraxie) [104].

Wichtigster genetischer Risikofaktor für die Entstehung einer sporadischen AD ist ApolipoproteinE (ApoE) in seiner Isoform ApoE4, für welche 65-80% aller Patienten mit AD heterozygote Genträger sind [107,141]. ApoE4 und die Isoform ApoE2 erhöhen zudem durch veränderte Rezeptoraffinitäten die Blutkonzentration atherogener Lipoproteine, sowie die Entstehung arteriosklerotischer Plaques [52,53].

Als ein solches atherogenes Lipoprotein kann *intermediate-density lipoprotein* (IDL), mit seinem assoziierten Hauptapolipoprotein ApoB100, sowie seinem Rezeptorliganden ApoE betrachtet werden [14,36,96,132]. ApoB-enthaltende Lipoproteine, die nicht *low-density lipoprotein* (LDL) sind, gelten als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen [118,139]. Eine erhöhte IDL-Plasma-Konzentration, verantwortlich für ein erhöhtes Risiko von CVD, findet sich in Patientenkohorten mit chronischem Nierenversagen, Diabetes mellitus Typ 2 sowie den hereditären Erkrankungen familiär kombinierte Hyperlipidämie und Hyperlipoproteinämie Typ 3 (HLP3, Remnant Hyperlipidämie) [77,85,94,117,140]. Zudem konnte in klinischen Studien eine direkte Assoziation von IDL mit der Inzidenz und Progression arteriosklerotisch bedingter Erkrankungen, wie einer Koronargefäßerkrankung, einer Verdickung der Carotidenwand und letztlich einer CVD nachgewiesen werden [48,64,109,135,142]. Die Konzentration von IDL-Cholesterol zeigt außerdem eine signifikante, BMI-unabhängige Korrelation zum Framingham Risk Score von Probanden [57]. Dieser ermöglicht eine Aussage zum 10-Jahres-Risiko für das Auftreten von CVD [57]. Trotz dieser epidemiologischen Hinweise auf eine pathophysiologische Bedeutung von IDL für die Entstehung von CVD sind sowohl standardisierte diagnostische Methoden, als auch therapeutische Optionen zur Beeinflussung der IDL-Plasmakonzentration nur in Ansätzen ergründet [84,85].

1.2. Lipoproteinmetabolismus

Lipoproteine, als Zusammenschluss aus Cholesterin, Cholesterinestern, Phosphoglyceriden und Triacylglycerinen (TAG) mit Apolipoproteinen, bilden die Transportform der überwiegend hydrophoben Lipide im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit [12,73]. Sie können gemäß ihres Lipidgehaltes, ihrer Dichte in der sequenziellen Ultrazentrifugation, ihres Lipid-Protein-Verhältnisses sowie ihrer Proteinkomponenten eingeteilt werden (vgl. Tabelle 1) [73].

Exogen zugeführte TAG werden in duodenalen Mukosazellen zusammen mit Aggregaten aus Phospholipiden und Apolipoprotein B48, den sogenannten unreifen Chylomikronen, Cholesterin, Phosphoglyceriden, sowie Apolipoprotein AI und Apolipoprotein AIV als reife Chylomikronen in den extrazellulären Raum exozitiert. Im Blutkreislauf folgt eine Aufnahme der Apolipoproteine E (ApoE) und C (ApoC) von *high-density lipoprotein*-Partikeln (HDL). Mithilfe von ApoCII als Cofaktor katalysiert die endothelständige Lipoproteinlipase die Hydrolyse von 70-90% des Triacylglyceringehaltes sowie die Aufnahme der entstandenen FFS zur weiteren extrahepatischen Verstoffwechslung. Die verbleibenden Chylomikronen Remnants unterliegen einer ApoE-vermittelten hepatischen Internalisierung über Bindung von diesem an den LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor related Protein (LRP). Hier erfolgt bei hohen Cholesterin- und Phosphoglyceridspiegeln, die Synthese des *very-low-density lipoprotein* (VLDL) aus ApoB100, ApoE, ApoCII, TAG, Phosphoglyceriden, Cholesterin und Cholesterinestern. Wiederum folgt auf einen Austausch von ApoE, ApoC und Cholesterinestern mit HDL, eine Hydrolyse der VLDL-Partikel mittels Lipoproteinlipase (LPL) zu FFS und Glycerin. Diese werden von peripherem Gewebe aufgenommen [73]. Die so entstandenen Überreste werden nach der Ablösung von der LPL IDL genannt [111]. In Interaktion mit den HDL-Partikeln erfolgt die Abgabe von ApoCII und Aufnahme von Cholesterinestern [12]. Eine hepatische Internalisierung der VLDL-Remnants und IDL-Partikel erfolgt über ApoE-Rezeptoren. Alternativ ermöglicht die hepatische Triacylglycerin-Lipase eine weitere Hydrolyse der enthaltenden TAG zur Aufnahme von Glycerin und FFS in die Leber. Das verbleibende Lipoprotein IDL, reich an Cholesterinestern und ApoE, kann über Bindung von Apo B100 an den LDL-Rezeptor hepatisch aufgenommen oder durch die hepatische TAG-Lipase weiter zu LDL abgebaut werden. Mit dem Verlust der TAG sowie der Abgabe der Lipoproteine, mit Ausnahme des ApoB100, entstehen die LDL-Partikel. Diese werden entweder hepatisch abgebaut oder dienen als Cholesteroltransporter in extrahepatische Gewebe [33]. Dort können sie ApoB100 vermittelt über LDL-Rezeptoren endozytiert werden und so Cholesterin für die Steroidbiosynthese und Membranbestandteile liefern.

Einleitung

Der reverse Cholesterintransport zum hepatischen Abbau wird durch *high-density lipoprotein* (HDL) vermittelt. Die Synthese der HDL erfolgt in der Leber und den Mucosazellen des Dünndarms. Peripher erfolgt die Bindung und Veresterung von Cholesterin aus Makrophagen und Gewebe. Über Scavenger-Rezeptor-B1, ApoE-Rezeptoren, das Cholesterinester-Transferprotein und weitere Mechanismen wird die hepatische Aufnahme von Cholesterin vermittelt. Daraufhin folgt die biliäre Cholesterinausscheidung. Die fünf Lipoproteinklassen unterscheiden sich gemäß ihrer Funktion, in ihrer Dichte, Partikelgröße, Proteinzusammensetzung und elektrophoretischen Eigenschaften (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. Eigenschaften der Lipoproteinklassen. Modifiziert nach Harrison's Principles of Internal Medicine“ [111]

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte (g/mL)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Durchmesser (nm)	75-1200	30-80	15-35	18-25	7,5-20
Apolipoprotein	B-48, A, C, E	B-100, A, C, E	B-100, C, E	B-100, (E)	A, C, E
Zusammensetzung (%)					
TAG	86	52	38	10	5-10
Cholesterinester	3	14	30	38	14-21
Cholesterin	1	7	8	8	3-7
Phospholipide	8	18	23	22	19-29
Protein	2	8	11	21	33-57

1.3. Intermediate-density Lipoprotein

Mittels sequenzieller Ultrazentrifugation lässt sich IDL mit einer Schwimmdichte von 1,006-1,019 g/mL von den restlichen Lipoproteinen separieren [73]. Innerhalb dieser Dichtefraktion können mithilfe von Gelelektrophorese zwei IDL-Subtypen mit metabolischer Heterogenität, die Überlappungen in Größe und Dichte aufweisen, differenziert werden [64,84,91]. IDL-1 mit einem Durchmesser von 31 nm ± 0,7 nm (mean ± SEM), triacylglyceridreich und cholesterinärmer als IDL-2, bildet die transiente Form während der Delipidierung von VLDL zu LDL [84]. IDL-2 dagegen, 25,7 nm ± 2,4 nm im Durchmesser, unterliegt einer gesonderten hepatischen Freisetzung [84]. Seine Konzentration sinkt bei ansteigenden Plasma-Triacylglycerinen, wobei die Partikelgröße, gemessen an ihrem Durchmesser, mit dem LDL-Partikeldurchmesser korreliert [84]. Entsprechend der Rolle des ApoC-II als Kofaktor der

Lipoproteinlipase, zuständig für die VLDL-IDL-LDL-Delipidierungskaskade, ist dieses im triacylglyceridreicheren IDL-1 in doppelter Menge vertreten als im IDL-II [85]. Letzteres, cholesterinreich bindet *in vitro* spezifisch an Chondroitin-6-Sulphat (CS-6), sowie als kleinerer, dichter IDL-Subtyp mit höherer Affinität an Proteoglykane der Arterienwand als LDL und VLDL [4,85]. IDL zeigt eine Zusammensetzung aus ca. 38% Cholesterin und Cholesterinestern, 38% TAG und 11% Proteinen (vgl. Tabelle 1). Die physiologisch nur geringe Plasmakonzentration könnte zur bisher geringen Studienlage des IDL beitragen [84,91].

1.3.1. Apolipoprotein B100

Den größten Proteinanteil des IDL bildet Apolipoprotein B100, Strukturprotein in VLDL, LDL und IDL, welches hepatisch synthetisiert wird und als Ligand des LDL-Rezeptors dient [12,41]. Die Lipoproteine enthalten jeweils eine Kopie des hydrophoben, nicht austauschbaren ApoB100, welches in der Leber exprimiert wird. Chylomikronen hingegen enthalten eine um die LDL-Rezeptorbindungsstelle verkürzte Form mit nur 48% des N-Terminus, das ApoB48 [102]. Dieses entsteht intestinal durch mRNA-*editing*, katalysiert durch das Enzym apobec-1 [17,39,110]. Jeweils ein Molekül ApoB100 ist um die Lipoproteinoberfläche gewunden, wodurch seine Konzentrationsbestimmung im Blut die Messung der Gesamtanzahl arteriosklerotischer Partikel ermöglicht [28,130].

1.3.2. Apolipoprotein E und Isoformen

Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, IDL, VLDL, LDL und HDL beinhalten als Strukturprotein ApoE, welches größtenteils hepatisch synthetisiert wird [53,78,83]. Weitere Produktionsorte sind Astrozyten und astrozytäre Zellen des Gehirns, Nebennieren, Haut, Milz, Lunge, Darm und das Fettgewebe [53,55]. Während der Sekretion wird ApoE an Lipide der Zelloberfläche oder sekretorischer Vesikel gebunden [53]. Im Plasma, der Lymphflüssigkeit und dem Liquor cerebrospinalis tritt es assoziiert mit Phospholipiden oder als Oberflächenprotein der Lipoproteine auf [53]. ApoE wird zwischen den Lipoproteinen transferiert und reguliert über ihren Transport ihre Plasmakonzentration und Plasmaclearance [73,75]. Als polymorphes Protein wird ApoE in verschiedenen Isoformen exprimiert, die durch strukturelle und funktionelle Heterogenität charakterisiert sind. Die Allele ApoE2, ApoE3 sowie ApoE4 ermöglichen im Rahmen der kodominanten Vererbung drei homozygote und drei heterozygote Phänotypen, von denen ApoE3/E3 mit 50-70% den größten Populationsanteil bildet (vgl. Tabelle 2) [55,79,149].

Einleitung

ApoE bindet mit Isoform-abhängiger Affinität unter anderem an den VLDL-Rezeptor, den LDL-Rezeptor, das LRP, Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) und den ApoE-Rezeptor 2 [53,78,79]. In Hepatozyten und Neuronen ermöglicht die Bindung an HSPG die Internalisierung ApoE-haltiger Lipoproteine direkt oder über einen Transfer an LRP [53]. Unter anderem über HSPG-Bindung ist ApoE als Strukturprotein des HDL am reversen Cholesterintransport (RCT) und der zellulären Aufnahme von HDL-Cholesterylestern beteiligt [73,78].

Die Substitution der Aminosäure Cystein durch Arginin an Position 112, Eigenschaft der Isoform ApoE4, verursacht über eine zusätzliche Salzbrückenbildung eine Interaktion der C- und N-terminalen Proteindomänen [143]. Die ApoE-Isoform E2, charakterisiert durch eine Aminosäuresubstitution von Arginin an Position 158, ist assoziiert mit einer auf 2% stark verminderten Funktion der LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne [53,75]. Diese resultiert aus der Cystein-158 bedingten Aufhebung einer Salzbrückenbindung und der damit verbundenen veränderten Größe der positiv geladenen Proteindomäne [79]. Isoformspezifisch zeigen sich physiologische und pathophysiologische Wechselwirkungen des ApoE für vaskuläre und neurologische Insulte (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2. Isoformspezifische Charakteristika des ApoE. Modifiziert nach Huang et al. [79]

	E4	E3	E2
Allelfrequenz	15%	77%	8%
Sequenzunterschiede	Arg-112	Cys-112	Cys-112
	Arg-158	Arg-158	Cys-158
Rezeptorbindung	100%	100%	<2%
Klinische Auswirkungen	AD	„normal“	Typ III Hyperlipoproteinämie
Hauptvorkommen	VLDL, VLDL	HDL	HDL
	Remnants		

ApoE und Alzheimer'sche Demenz (AD)

Isoformabhängig ist ApoE unter anderem mit der AD assoziiert, für die ApoE4 als ein genetischer Hauptrisikofaktor gilt [61]. Epidemiologisch zeigt sich ein Risiko von 90-95% für die Entwicklung einer AD bei einer ApoE4/E4-Homozygotie [24]. ApoE4 ist zudem mit einem früheren Erkrankungsalter der Allelträger assoziiert [141]. ApoE2 reduziert dagegen das Risiko, an einer AD zu erkranken um die Hälfte [141]. Im peripheren Nervensystem akkumuliert ApoE, synthetisiert und sekretiert von Makrophagen und Monocyte-derived-Makrophagen, in der

Extrazellulärmatrix geschädigter Nervenfasern und kann möglicherweise die Lipidverteilung der regenerierenden Axone mit beeinflussen [53]. Auch im zentralen Nervensystem wird ApoE neben seiner Aufgabe als Lipidtransportprotein als Antwort auf Schädigungen in hippocampalen und kortikalen Neuronen exprimiert [53,145]. In kultivierten Spinalganglienzellen des Kaninchens und Neuroblastom (Neuro-2a)-Zellen moduliert es isoformabhängig das Neuronenwachstum [51,53]. Im zentralen Nervensystem unterliegt ApoE hauptsächlich einer astrozytären Synthese. Neben spezialisierten astrozytären Zelltypen, wie der Bergmann-Glia des Cerebellums, werden auch neuronale Expressionsorte des ApoE vermutet [53].

Zur pathogenetischen Beeinflussung der AD durch ApoE wurden zahlreiche Wirkungshypothesen vorgeschlagen [61]. Hierzu gehören die τ -Phosphorylierung und intrazelluläre Aggregation der τ -Proteine durch ApoE [61,141]. Ebenso werden ein modifizierter Lipid-Metabolismus, eine protrahierte neuronale Inflammation und eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion vermutet [137,141]. Besonders der Lipidbindenden Domäne, dem C-terminalen Drittel des ApoE-Moleküls, werden neurotoxische Eigenschaften zugeschrieben [53]. Als Pathomechanismus der Amyloid- β ($A\beta$, β -Amyloid-Peptid)-abhängigen Wirkung von ApoE4 auf AD wird die Stabilisierung der $A\beta$ -Aggregation und darauf folgend eine verminderte Plaquelöslichkeit diskutiert [45,53]. $A\beta$, ein 40-43 Aminosäuren großes Peptid, entsteht als Spaltprodukt der β - und γ -Sekretasen aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP, amyloid precursor protein) [17]. Eine Katalyse der APP-Spaltung durch die α -Sekretase resultiert in Peptidfragmenten ohne gesteigerte Plaquetformation [17]. Folge der $A\beta$ -Akkumulation ist eine neuronale Dysfunktion und die Freisetzung neurotoxischer Mediatoren. In zahlreichen Tiermodellen konnte zusätzlich eine Dysregulation der cerebrovaskulären Versorgung durch $A\beta$ nachgewiesen werden. Initial wird eine oberflächenbedingte ApoE-Isoform-abhängige Akkumulation der $A\beta$ -Peptide vermutet [80,144].

ApoE und Arteriosklerose

Die atheroprotektive Funktion des ApoE, z.B. über Beteiligung am RCT und der Regulation der Plasmaclearance triacylglyceridreicher Lipoproteine, ist isoformabhängig [29]. Klinisch apparent wird die genetische Variante ApoE2 mit ihrer verminderten LDL-Rezeptorbindungsaffinität in der Hyperlipoproteinämie Typ III (HLP3) [54]. Diese ist laborchemisch durch erhöhte Plasmakonzentrationen von Cholesterolem und TAG charakterisiert [79]. Zusätzlich zur genetischen Prädisposition bedarf es für die klinische Krankheitsausprägung metabolische Umgebungsfaktoren. Hierbei kann es sich um einen Hypothyreoidismus mit nachfolgend verringerter LDL-Rezeptor-Expression handeln [54,79]. Auslöser einer Hyperlipoproteinämie

Typ III ist zusätzlich eine familiäre ApoE-Defizienz, über die bisher in vier Fallstudien berichtet wurde. Für zwei dieser Fälle liegt eine Genotypisierung vor [37].

Funktionelle Konsequenz der zuvor beschriebenen Proteindomäneninteraktion des ApoE4 ist die vermehrte Präsenz auf großen, triacylglyceridreichen Lipoproteinen wie VLDL und IDL, statt auf phospholipidreichen, kleineren HDL-Partikeln [55,78,79,143]. Ihre dadurch gesteigerte Clearance resultiert möglicherweise über ein erhöhtes intrazelluläres Cholesterolangebot in der Herunterregulierung der LDL-Rezeptoren mit plasmatischer LDL-Akkumulation [79,116]. Neben dem Anstieg der Plasmakonzentration des LDL verursacht ApoE4 somit einen gesteigerten Plasma-Cholesterolspiegel und eine erhöhte Anzahl an ApoB100-tragenden Lipoproteinfraktionen [75,78,79]. Im Vergleich zu ApoE3 erhöhen ApoE4 sowie umgebungsabhängig auch ApoE2 die Konzentration arteriosklerotisch wirksamer Lipoproteine [78,79]. Epidemiologisch zeigt sich für ApoE4, unabhängig von einem erhöhten Cholesterolspiegel, ein vermehrtes Arterioskleroserisiko. Die Plasmakonzentration des ApoE reguliert außerdem über die hepatische VLDL- und IDL-Produktion sowie die hepatische Lipolyse die Plasmakonzentration triacylglyceridreicher Lipoproteine [17,79]. Untersuchungen am Mausmodell mit einer ApoE-Defizienz zeigten eine verringerte VLDL-Produktion der Hepatozyten [40,68,79]. Eine Überexpression von ApoE steigerte dagegen in hypertriglyceridämischen Patienten die VLDL-Synthese [29,79].

1.4. Pathophysiologische Bedeutung von IDL

Pathophysiologisch lässt sich die arteriosklerotische Wirkung von IDL zum einen auf seinen im Vergleich zu LDL hohen TAG-Gehalt zurückführen [63]. Triacylglycerid-reiche Lipoproteine (TRL) und ihre Überreste, genannt Remnants, erhöhen die Rate und Schwere arteriosklerotischer Veränderungen [42,63,109]. Neben einer pathologischen Triglyceridkonzentration im Plasma ist schon eine postprandiale Hypertriglyceridämie mit einem erhöhten Risiko einer Koronargefäßerkrankung (Coronary artery disease, CAD) verbunden [42,48,63,65]. VLDL und IDL als triacylglyceridreiche Lipoproteine tragen neben LDL zur Lipidakkumulation in Arterienwänden bei [4,100,101,120]. IDL zeigt proportional zum Plasmatriacylglyceridspiegel eine vermehrte Akkumulation. Teilweise wurde IDL im Vergleich zu LDL als stärkerer prädiktiver Parameter für die Progression einer Arteriosklerose beurteilt. Diese Messergebnisse fanden sich *in vivo* angiographisch an Koronararterien oder sonographisch an Karotiden [48,63,65]. Hämodialysierte Patienten mit nephrotischer Proteinurie erleiden eine Hypercholesterinämie, die zu einem hohen Risiko für CVD beiträgt. Dieses beruht auf einer

hepatisch akquirierten LDL-Rezeptor-Defizienz mit nachfolgend erhöhtem IDL-Plasmaspiegel [94].

1.4.1. Modell der arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen durch IDL

Als Primärläsion der klinisch nachweisbaren arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen lässt sich auf molekularer Ebene unter anderem eine ternäre Aggregation aus Lipoprotein-Partikeln, HSPG und ionisiertem Calcium messen [1,125,127]. Die initiale Anlagerung von LDL, oxidiertem LDL, IDL und VLDL an der Oberfläche endothelialer Zellen und an extrazellulärer Matrix scheint den Ausgangspunkt für arteriosklerotische Insulte zu bilden [1,113]. HSPG, Makromolekül der Extrazellulärmatrix und peripherer Rezeptor für Lipoproteine, wird unter arteriosklerotischen Bedingungen hauptsächlich von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC, vascular smooth muscle cell) synthetisiert [74]. Es setzt sich aus einem Proteinkern ($M_r = 38$ kD) mit repetitiven, sulfatierten und carboxylierten Disaccharid-Seitenketten ($M_r \approx 35$ kD) zusammen [17,74]. Sowohl in ApoE- als auch in LDL-Rezeptor-defizienten Mausmodellen zeigte sich vor allem in bereits nekrotisierten, arteriosklerotischen Läsionen eine gesteigerte HSPG-Expression [74]. Über die Interaktion des HSPG mit Apolipoproteinen, die auf LDL, IDL und VLDL präsent sind, lässt sich möglicherweise sein Anteil an der Arteriosklerose-Progression erklären. So ermöglicht eine Bindung des HSPG an das ApoE der Lipoproteine eine direkte intrazelluläre Aufnahme [1,2].

Nach der initialen Deposition der arteriosklerotischen Lipoproteine in der Gefäßwand folgen chronisch progressive Modifikationsprozesse, wie Oxidation, Lymphozyteninfiltration, bindegewebiger Umbau und Kalzifizierung der Gefäßintima [113]. Ein validiertes molekulares Biosensormodell zur Darstellung der ersten Ablagerung ist die Messung der arteriosklerotischen Nanoplaqueformation mittels Reflexionsspektroskopie (Patent EP 0 946 876) [123,125]. Neben der Darstellung des pathologischen Adsorptionsverhaltens der Lipoproteine, ermöglichte dieses Modell eine Beobachtung der verringerten Lipoproteinablagerung durch Applikation verschiedener Therapeutika, wie HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren [1,127].

1.4.2. Modell der cerebrovaskulären Nanoplaqueformation

Als vereinfachtes Modell einer oberflächenabhängigen Nanoplaqueformation wurde das beschriebene Biosensormodell für die Imitation cerebrovaskulärer Läsionen, im Rahmen der Alzheimerplaqueformation verwandt [80,127]. Grundlegende Annahme hierfür ist eine Abhängigkeit des neuronalen Metabolismus von einem physiologischen cerebralen Blutfluss, sowie eine erhöhte A β -Ablagerung bei dysregulierter cerebrovaskulärer Durchblutung [30,80]. Bisher wurde eine Cholesterol- und Lipoprotein-induzierte endotheliale A β -Deposition durch

begünstigte Insertion von A β in die Plasmamembran und Veränderung seiner räumlichen Struktur beschrieben [32,80]. Cholesterol katalysiert die Fibrillation des löslichen A β hin zur typischen, morphologischen Struktur des Peptids in Plaques der AD [32,80]. Die initiale Ablagerung von LDL, IDL, VLDL und HDL auf mit HSPG modifizierten Oberflächen wurde in vorhergehenden Studien in Abhängigkeit von A β und verschiedenen Isoformen des ApoE gezeigt [1,80]. Ein mögliches pathologisches Korrelat zwischen T2DM, den ApoE-Isoformen und der endothelialen Plaqueformation als initialer Schritt der Arteriosklerose und AD, wurde in der vorliegenden Studie anhand dieses etablierten Biosensormodells untersucht [80,127].

1.5. Gefäßtonus

Pathophysiologisch bedeutsam für die Bildung arteriosklerotischer Plaques ist unter anderem eine beeinträchtigte flussabhängige Vasodilatation (FVD), die als Trigger für eine endotheliale Dysfunktion gilt. Sie wird durch die Konzentration verschiedener Lipoproteine beeinflusst. Endotheliale Dysfunktion, als „Primäreignis“ der Arterioskleroseentstehung, bezeichnet eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit mit verminderter, endothelvermittelter Vasoaktivität [25,69,128]. Die Vasoaktivität gewährleistet die physiologische Aufrechterhaltung eines Ruhetonus durch die glatte Muskulatur und seine Anpassung, z.B. an Blutdruckänderungen oder erhöhten Sauerstoffbedarf peripherer Gewebe [34].

Hierfür sind autoregulatorische Mechanismen verantwortlich, wie die Ca²⁺-vermittelte, myogene Konstriktion bei erhöhtem Dehnungsreiz (Bayliss-Effekt) sowie die flussabhängige NO-vermittelte Vasodilatation bei Erhöhung der Wandschubspannung (Scherkraft, *shear stress*) des Blutflusses [19,34]. Neurohumeral wirkt das vegetative Nervensystem mittels katecholaminerger Transmitter regulierend auf die Vasomotorik der glatten Gefäßmuskulatur. Zudem wird diese durch lokale Metabolite wie Prostaglandin, Thromboxan, Adenosin und Bradykinin beeinflusst [34].

1.5.1. Flussabhängige Vasodilatation

Neben dem senkrecht einwirkenden, pulsabhängigen Zug des Blutflusses auf die Gefäßwand, greift parallel zum Blutfluss die vektoriell gerichtete Wandschubspannung (*shear stress*), ein Maß für die Oberflächenfraktion des Blutes, an der luminalen Tunica intima an [34,86]. Einer Änderung der Wandschubspannung, z.B. durch eine Flusserrhöhung, folgt die Endothelzellvermittelte Gefäßadaptation in Form der flussabhängigen Vasodilatation [34]. Diese ermöglicht eine bedarfsorientierte Gewebeversorgung. Als Biosensor postuliert wurden neben Ionenkanälen und Rezeptorphosphorylierungen unter anderem membranständige, polyanionische Proteoglykane und Glykosaminoglykane (GAG) auf Endothelzellen und glatter Muskulatur, in der

Extrazellulärmatrix, der Basalmembran und Glykokalix [6,124]. Hierzu gehört auch HSPG. Folgend auf eine flussinduzierte Konformationsänderung bindet vermehrt Na^+ an Kationen-Bindungsstellen der viskoelastischen Makromoleküle [129]. Über die kanalvermittelte Aufnahme des Na^+ depolarisiert die Endothelzelle und ermöglicht so den für die NO-Freisetzung notwendigen Ca^{2+} -Einstrom [38,124,126,129].

Die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase 3 (eNOS) wird durch Calcium-Calmodulin-Komplexe induziert. Sie katalysiert die Reaktion von L-Arginin und Arginin-Derivaten NADH/NADPH-abhängig mit O_2 und Tetrahydrobiopterin (BH_4) als Kofaktoren zu L-Citrullin und oxidiertem NO [62,71,73]. Neben einer autokrinen Stimulation der Ausschüttung von NO und BH_4 induziert NO, ebenso wie Prostazyklin, parakrin die Vasodilatation in der glatten Muskelzellen [34,47]. Dieser Vorgang wird über Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase, bzw. membranständigen Adenylylcyclase und damit vermehrter Synthese von zyklischem Adenosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) und zyklischem Guanosin-3'5'-Monophosphat (cGMP) initiiert.

Die zyklischen Nukleotide aktivieren die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), bzw. die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), welche die Phosphorylierungen von Ca^{2+} - und K_{Ca} -Kanälen, sowie der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Pumpe vermitteln. Hierauf folgt über vermindertes intrazelluläres $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ein verändertes Gleichgewicht der Myosinleichtketten-Enzyme zu Gunsten der Myosinleichtketten-Phosphatase (MLC-Phosphatase). Diese induziert die Inaktivierung der kontraktile Myosinkette. Zusammen mit der Rückverlagerung von Calmodulin an den Aktin-Tropomyosin-Komplex, wird hierdurch der Gefäßtonus verringert [34,124]. Die Konzentration der zyklischen Nukleotide kann dementsprechend als Indikator für die stattgefundene Vasotonusänderung genutzt werden.

1.5.2. Vegetative Regulation des Gefäßtonus

Die Innervation der glatten Gefäßmuskulatur durch das vegetative Nervensystem erfolgt über direkte Transmitterausschüttung sowie indirekte Stimulation humoraler Mediatoren [31]. Sympathisch erfolgt die Versorgung der Gefäße über Stimulation der Adrenalinfreisetzung aus dem Nebennierenmark und Freisetzung von Noradrenalin aus synapsenähnlichen Kontakten zwischen postganglionären nervalen Varikositäten und der Plasmamembran glatter Gefäßmuskelzellen [31]. Die physiologische, Katecholamin-vermittelte Wirkung auf den Vasotonus hängt von der Anzahl und Verteilung der verschiedenen Adrenorezeptortypen ab.

Adrenalin und Noradrenalin wirken mit ähnlicher Stärke auf postsynaptische α_1 -Adrenorezeptoren (AR). Über G_q -Protein-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C und den

Einleitung

folgenden Phosphatidstoffwechsel erhöhen sie die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Hierdurch wird letztlich eine Depolarisation und Vasokonstriktion induziert [58].

Prä- und postsynaptisch lokalisierte α_2 -Rezeptoren binden vermehrt Adrenalin. Sie induzieren G_i -Protein-gekoppelt die Hemmung der Adenylatzyklase, gefolgt von einem absinkenden cAMP-Spiegel mit verminderter eNOS-Aktivierung [133]. Postsynaptisch wird hierdurch eine Vasokonstriktion hervorgerufen [119].

Vermehrt myokardial vorkommend, erhöhen β_1 -Adrenorezeptoren G_s -Protein-gekoppelt die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Sie aktivieren, mit höherer Affinität zu Noradrenalin, G_s -Protein-gekoppelt die Adenylatzyklase [44]. Besonders Adrenalin bewirkt über β_2 -Adrenorezeptoren ebenfalls einen cAMP-Anstieg mit nachfolgender Phosphorylierung der PKA. Diese phosphoryliert Ca^{2+} -ATPasen, welche die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration senken [44,133]. Außerdem phosphoryliert die PKA, durch β_2 -adrenerge Rezeptoren aktiviert, die Myosinleichtketten-Kinase, mit nachfolgend verminderter Affinität zum Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex [133].

1.6. Zielsetzung

Die Bedeutung von IDL als unabhängigem Risikofaktor für die Entstehung von CVD, unter anderem als Bestandteil der TRL ist bisher nur unzureichend untersucht [13,22]. Eine mögliche Beeinflussung der endothelialen Dysfunktion durch eine Rezeptorinteraktion des IDL wurde deshalb an Koronarpräparaten vom Menschen untersucht. Vor allem die verschiedenen ApoE-Isoformen könnten zu den pathophysiologischen Mechanismen beitragen. Eine Wechselwirkung zwischen den Adrenorezeptoren und verschiedenen Isoformen des IDL wurde dementsprechend für die flussabhängige Vasodilatation einbezogen. Weiterhin wurde eine Messung der IDL-abhängigen Membranpotentiale durchgeführt, um eine etwaige elektromechanische Kopplung beurteilen zu können. Ergänzend ließ sich die flussabhängige Wechselwirkung des IDL in verschiedenen ApoE-Isoformen auf intrazelluläre Signalkaskaden anhand der Konzentrationsbestimmung zyklischer Nukleotide bewerten.

Die möglichen Auswirkungen von ApoE4 auf die genannten Risikofaktoren T2DM, Arteriosklerose und Dyslipidämie, sowie für die Entstehung der AD wurden zuvor erläutert. Weiterhin kann eine ApoE4-induzierte Rezeptorinteraktion zur initialen endothelialen Anlagerung von IDL führen [80]. Hinweisen auf eine pathogenetische Rolle der T2DM-induzierten Hyperglykämie wurde anhand der Bestimmung der Nanoplaqueformation nachgegangen.

2. Material und Methodik

Ein Teil der vorliegenden Versuche zur Beantwortung der genannten Fragestellung wurde an Koronararterien von im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) anlässlich von Herztransplantationen explantierten Herzen durchgeführt. Es lag eine schriftlich eingeholte Einverständnis der Patienten vor. Die Experimente umfassen eine flussabhängige mechanische Messung der Wandspannung der Arterien unter Superfusion mit Krebslösung, IDL und adrenerger Blockade, sowie eine transmembranale Potentialmessung an den glatten Muskelzellen. Außerdem wurde eine Konzentrationsbestimmung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP an den Präparaten durchgeführt.

Mithilfe ellipsometrischer Messung wurde die Nanoplaqueformation von IDL unter arteriosklerotischen Bedingungen und mit Zusatz von A β gemessen. Teilweise wurde IDL zuvor in verschiedenen ApoE Isoformen mit Glukose inkubiert.

2.1. Studienkollektiv

Eingeschlossen wurden Koronargefäßpräparate von Patienten, die sich von Dezember 2012 bis August 2015 einer Herztransplantation, einer Herz-Lungen oder einer Herz-Nieren-Transplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin unterzogen hatten. Es wurden keine Ausschlusskriterien bezüglich der Patientencharakteristika, wie z.B. Geschlecht, Alter, Medikation, kardiale Erkrankungen und Begleiterkrankungen angewandt. Patienten mit mechanischen Herzunterstützungssystemen (Left Ventricular Assist Device, Biventricular Assist device) oder einem ICD (Implantable Cardioverter-Defibrillator) wurden ebenso eingeschlossen. Ausschlusskriterien für Gefäßpräparate waren Bypass-Gefäße, Gefäßabschnitte mit Stent-Versorgung, makroskopisch sichtbare atherosklerotische Läsionen und jeweils angrenzende Gefäßabschnitte im Abstand bis zu 5 mm. Intramurale Arterienverläufe, sowie Abgänge von Arterienästen wurden ebenfalls von der Präparation ausgeschlossen.

2.2. Lösungen

2.2.1. IDL-Akquise

IDL-Solute für die Versuchsdurchführung wurden aus dem Blut gesunder, freiwilliger Probanden im Lipidlabor des Instituts für klinische Chemie der Universität Freiburg gewonnen. Die venöse Blutentnahme erfolgte bei den Probanden nach 12-stündiger Nahrungskarenz in Äthylendiamintetraacetat (EDTA)-haltige Sarstedt-Monovetten. Nach einer Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur folgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 4000 Umdrehungen pro

Minute. Die gewonnenen Plasmaüberstände in der obersten Phase wurden vermischt („gepoolt“), um mögliche Polymorphismen der Lipoproteine auszugleichen. Im Anschluss wurde IDL durch sequenzielle Ultrazentrifugation bei 18°C und 120000 rpm in einer Optima TLX Tisch-Ultrazentrifuge mit Rotor TLA 120.2 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA) mit einer Dichte von $1,016 < d < 1,019$ g/mL extrahiert. Das gewonnene IDL wurde in einer Ionenaustauschchromatographie unter Stickstoffbegasung von EDTA und NaCl gereinigt. Daraufhin folgte eine Verdünnung des IDL mit Krebslösung auf 10 mg/dL (pH 7,35).

2.2.2. IDL-Apolipoprotein E-Isoformen

Mittels Analyse der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen wurde die Genotypisierung der freiwilligen Probanden zur Akquise von homozygotem IDLapoE4/E4 sowie IDLapoE0/E0-Isoformen durchgeführt. Dieses wurde wie in 2.2.1. beschrieben gewonnen. IDLapoE0/E0 stammt von einem der weltweit zwei mit dieser Isoform genotypisierten Patienten [37,127].

2.2.3. Krebslösung

Für den Transport, die Lagerung der Koronararterien, als Spüllösung und Kontrollmedium gegenüber IDL-Solut wurde Blutersatzlösung genutzt.

Als solche wurde nach Krebs modifizierte Versuchslösung verwandt, die aus folgenden Bestandteilen hergestellt wurde: Na^+ 151,16 mmol/L; K^+ 4,69 mmol/L; Ca^{2+} 2,52 mmol/L; Mg^{2+} 1,1 mmol/L; Cl^- 145,4 mmol/L; HCO_3^- 16,31 mmol/L; H_2PO_4^- 1,38 mmol/L sowie Glucose 7,77 mmol/L.

Die Krebslösung wurde für den Transport auf 2-8°C und als Lösung für die Äquilibration auf 37°C temperiert. Letzteres fand bei Begasung mit Carbogen und unter kontinuierlicher pH-Kontrolle statt.

2.2.4. Adrenorezeptorantagonisten

Als Adrenorezeptor-Blocker wurden Phentolaminhydrochlorid, ein kompetitiver, nicht-selektiver Antagonist an α_1 und α_2 -Adrenorezeptor und Propranololhydrochlorid, welches nicht-kardioselektiv β_1 und β_2 -AR blockiert, der Fa. Sigma in einer Verdünnung mit Aqua dest. von 10^{-4} mmol/L verwendet. Die Solute wurden in drei Versuchslösungen jeweils einzeln und als Gemisch dem IDL-Ansatz hinzugefügt.

Vorhergehende Kontrollversuche zeigten, dass von den verwendeten Substanzen Phentolamin und Propranolol keine intrinsische Aktivität ausging [59].

2.3. Materialgewinnung

Die Gewinnung der untersuchten Koronararterien erfolgte während der Herztransplantationen im

Deutschen Herzzentrum Berlin. Im Operationssaal wurden die Herzen der Empfängerpatienten direkt nach ihrer Explantation in eine Instrumentenschale mit gekühlter, isotonischer Kochsalzlösung überbracht und innerhalb von 45 Minuten auf einem separaten, sterilen Instrumententisch präpariert [70]. Zur Präparation der Koronararterien wurden je eine anatomische Pinzette mit stumpfem Ende, eine stumpfe Schere und eine spitze Schere verwendet. Die Präparation der Arterien aus dem epikardialen Fettgewebe erfolgte mittels einer scharfen randlichen Absetzung unter Vermeidung einer mechanischen Kontusion. Intramurale Gefäßabschnitte wurden wegen zu großer Risiken einer mechanischen Beanspruchung durch die Präparation belassen. Zur Schonung der Aortenklappe wurde 1 cm distal des Sinus aortae, ohne vorherige Sondierung, mit der Feinpräparation begonnen. Extrahiert wurden, soweit möglich, die Trunci communes der Aa. coronaria sinistra (LCA) und dextra (RCA) sowie die Hauptäste Ramus circumflexus und Ramus interventricularis anterior der LCA und Ramus interventricularis posterior und Ramus marginalis dexter der RCA. Mindestens 3 cm lange Probenstücke wurden abgesetzt und umgehend in modifizierter Krebslösung auf 2-8°C gekühlt. Die Überführung in das Labor erfolgte zügig, gekühlt und lichtgeschützt, sodass maximal 36 Stunden zwischen Explantation und Versuchsbeginn vergingen [66].

2.4. Materialaufbereitung

Im Labor erfolgte zweieinhalb Stunden vor Versuchsbeginn in 37°C warmer Krebslösung eine Feinpräparation der Gefäßproben. Mittels einer spitzen Schere und einer chirurgischen Pinzette mit spitzem Ende wurden die Gefäßstreifen von perivaskulärem Fettgewebe und teilweise anhaftender Adventitia befreit. Die infolge des Transportes und der Lagerung entstandenen Gleichgewichtsverschiebungen des Ionengradienten und der stetig ansteigende pH wurden durch eine Begasung der Krebslösung mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% O₂, auf physiologische Werte ausgeglichen. Diese Äquilibration erfolgte über zwei Stunden unter kontinuierlicher pH-Kontrolle mit einem Ziel-pH von 7,35. Die Präparate wurden nach makroskopischer Begutachtung gemäß der Beschaffenheit ihrer Gefäßwände eingeteilt.

2.5. Kraftmessung

2.5.1. Versuchsaufbau

Die Messungen erfolgten mit einem induktiven Kraftaufnehmer mit digitaler Messverstärkung und Anzeige der gemessenen Werte als Tonus in g (KWS 522.C, K52 C; Hottinger-Baldwin, Darmstadt, Deutschland). Mit einem Messweg von unter 100 µm und einer Längenänderung von 1% bei größtmöglich restringiertem Präparat kann von einer annähernd isometrischen Messung

ausgegangen werden [66]. Eine Eichung des Kraftaufnehmers erfolgte vor jedem Versuch mit Gewichten bekannter Schwere.

Zehn Minuten vor dem Versuchsbeginn wurde ein ca. 5 mm großer Abschnitt der Arterie abgetrennt und der Länge nach aufgeschnitten. Das so entstandene ca. 5 mm lange und 10 mm breite Präparat wurde nun mittels einer Bogenpinzette in die mit Krebslösung (37°C) bei 3 mL/min Flussrate gefüllte Messkammer eingebracht. Es wurde so mit seinen beiden Längsenden in der fixierten Schraubklemme und der flexiblen, an den Kraftaufnehmer angeschlossenen, Schraubklemme adjustiert, dass die Endothelfläche nach oben gerichtet war. Um eine Beschädigung des später superfundierten Endothels zu vermeiden, wurden lediglich die in die Klemmen eingebrachten Enden des Gefäßstückes mit der Pinzette gegriffen. Eine Beurteilung der Lage erfolgte mikroskopisch. Die longitudinal aufgeschnittenen Präparate wurden gemäß der Lage ihrer glatten Muskelzellen, quer zum Blutfluss und Ausrichtung der Endothelzellen, zwischen Kraftaufnehmer und statischer Schraubklemme eingespannt. Eine Abnahme des gemessenen Tonuswertes im Laufe der Erhöhung der Durchflussrate weist dementsprechend auf eine Relaxation des Gefäßpräparates hin.

Die Imitation eines physiologischen Blutdruckes von 100 mmHg erfolgte durch eine manuell regulierte mechanische Dehnung des Arterienpräparates von 0,4 g pro Minute über 5 Minuten. Der erreichte Tonus von 2,0 g wurde über 5 Minuten konstant gehalten. Die Kraftänderung wurde mittels Einstellung des induktiven Kraftaufnehmers vorgenommen und kontrolliert.

2.5.2. Versuchsdurchführung

Hierauf folgte die Umstellung der perfundierenden Flüssigkeit von Krebslösung als Kontrollmedium auf die mit Carbogen begasten Versuchslösungen (37,0°C). Der flussabhängige mechanische Gefäßtonus wurde bei Superfusion des Gefäßstückes mit IDL, IDL und Phentolaminhydrochlorid, IDL und Propranololhydrochlorid, sowie IDL und beiden Adrenorezeptorblockern gemessen. Die Flussgeschwindigkeit der Solute wurde nach 10 Minuten durch die manuelle Umstellung eines Schraubventils von 3 mL/min auf 5, 20, 40 und 100 mL/min erhöht. Eine Kontrolle der Flussrate über eine Minute wurde per Meßzylinder und Stoppuhr nach jeder Flussveränderung durchgeführt. Die Aufzeichnung der Tonuswerte erfolgte in fünfminütigen Abständen, schriftlich und digital, ausgegeben über RS 232C. Eine Speicherung und Darstellung der Messdaten auf einem PC (80486 DX2-66, 8 MB, Highscreen, Vobis, Aachen) erfolgte zusammen mit dem Spannungssignal der Membranpotentialmessung und einer Zeiteichung über einen ADDA-Wandler (DT2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) mit der Software Win ADDA 1.31 (Mikrotaurus, Software, Berlin). Im

Anschluss wurde das Präparat schnellstmöglich aus der Messkammer entfernt und in einer vorgekühlten Metallpresse in flüssigem Stickstoff bei -196°C fixiert. Die Proben wurden in Aluminiumfolie in einem Dewargefäß bis zur Bestimmung der Nukleotidkonzentrationen gelagert.

2.6. Potentialmessung

2.6.1. Versuchsaufbau

Zur Ableitung des intrazellulären Membranpotentials wurden, wie zuvor beschrieben, Mikroelektroden, eigens aus Spezialglasrohr (Pyrex Brand K2916, Corning Glass Works, New York; Innendurchmesser/Außendurchmesser 1,8/3,0 mm) per Horizontal-Pipettenpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) bei 6,8 A Heizstrom in 2 Minuten extrahiert, genutzt [70].

Die Füllung der Elektroden mit 3 mol/L KCl erfolgte nach Erhitzen in 99,9%igem Äthylalkohol unter Druckerniedrigung mit einer Vakuumpumpe (D6, Leybold - Heraeus, Hanau) und 48-stündiger Lagerung in Aqua bidest. Voraussetzung für die Nutzung waren ein kontrollierter Spitzendurchmesser von $<1\ \mu\text{m}$, um signifikante Störungen der Zellfunktionen zu vermeiden, ein Widerstand von 60 bis 100 M Ω und ein Tip-Potential von 60-100 mV, welches während des Versuches gemessen wurde [66]. Eine Abschirmung des Versuchstandes erfolgte durch einen Faraday-Käfig und zwei Potentialfolger (Difference Voltage Follower/ IV Converter Typ D 6903, H, Ehrler & Peper, Neckargemünd), jeweils an den Mikroelektroden und den Verbindungen zum Differenzverstärker. Eine mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllte Agar-Brücke verbunden mit einem 3 mol/L KCl enthaltenden Glaszylinder, diente als indifferente Elektrode. Über eine Ag/AgCl/Platin-Elektrode im Glaszylinder, angeschlossen an einen 10-fachen Messverstärker, wurden die Messwerte an ein Großbildoszilloskop (SGM 43 BN901 s/N 293, Knott, München), eine Software zur Speicherung und Darstellung in Echtzeit (s. Versuchsdurchführung Kraftmessung) und ein Vierstrahloszilloskop (Typ 565, Tektronix, Beaverton, USA) mit Zeiteichung übermittelt. Zusätzlich erfolgte die schriftliche Protokollierung der ermittelten Messwerte.

Nach der Einbringung des Gefäßpräparates in der Messkammer und der Vorspannung auf 2,0 g über 5 Minuten erfolgte die Positionierung der Messelektrode auf der endothelialen Seite des Gefäßabschnittes per Mikromanipulator unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Ein senkrechtes Vorschieben der Messelektrode in die Muskelzelle wurde durch einen direkten Potentialsprung auf negativere Werte als -50 mV bestätigt. Sowohl das Elektroden-Hintergrundrauschen, als auch die Tip-Potentiale wurden während und nach dem Einstich kontrolliert und die gemessenen

Signalwerte nur bei Übereinstimmung akzeptiert. Ein Mittelwert der Potentiale des gesamten Gefäßabschnittes wurde durch 10-40 Einstiche nach horizontaler Justierung am Mikromanipulator errechnet. Eine kontinuierliche Potentialmessung über einen längeren Zeitraum gelang teilweise über einen einzigen, senkrechten Einstich.

2.6.2. Versuchsdurchführung

Membranpotentiale wurden bei Superfusion der Präparate mit Krebs-Lösung, IDL *pool*, IDL und Phentolamin, IDL und Propranolol sowie IDL mit Phentolamin und Propranolol gemessen. Entsprechend den Registrierungen des Gefäßtonus wurden Werte bei einer Flussrate von 3 mL/min, 5 mL/min, 20 mL/min, 40 mL/min und 100 mL/min erhoben. Dies erfolgte jeweils nach Exposition des Präparates für 10 Minuten gegenüber einer Flussrate, um so einen mechanisch stationären Zustand der Gefäße zu beurteilen, in dem keine weitere Änderung der Kraftentwicklung stattfand. Die Reihenfolge der Messansätze wurde gemäß einem Schema variiert.

2.7. Messung der Nukleotidkonzentrationen

2.7.1. Versuchsaufbau

Die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP wurden an den zuvor in flüssigem Stickstoff (-196°C) kryokonservierten Gefäßpräparaten mithilfe des Peroxidase-basierten Amersham cAMP und cGMP-Biotrak Enzymimmunoassay System RPN225 durchgeführt [70]. Zunächst erfolgte eine Gewichtsbestimmung der Präparate in einem auf -80°C gekühlten 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, woraufhin die Gefäßabschnitte ohne Verzögerung in das mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gefüllte Dewargefäß zurückgegeben wurden. Für die Konzentrationsmessung der intrazellulären Nukleotide erfolgte zunächst ein hydrolytischer Aufschluss der Zellmembranen. Hierfür wurden die Proben aus der Immersion heraus einzeln in einem gekühlten 2 mL Glas-Potter-Homogenisator, gefüllt mit 200 µL Lyse-Reagenz 1B des Biotrak EIA Systems (0,25% Dodecyltrimethylammoniumbromid) manuell mittels Glaspistill homogenisiert. Dies wurde zuvor in 60 mL Assay-Puffer (auf 500 mL mit Aqua bidest. verdünnt: 0,05 M Acetat Puffer, pH 5.8 mit 0,02% (w/v) bovines Serum Albumin und 0,01% (w/v) preservativ) gelöst und mit weiterem Assay-Puffer auf 100 mL angepasst. Der Überstand des Probenaufschlusses wurde in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß pipettiert und die verbleibende Probe mit 200 µL Lyse-Reagenz 1B aufgefüllt. Folgend wurde wiederum der Überstand in das 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Konzentration in Standard und Probe wurde jeweils in Dupletts ausgeführt.

2.7.2. Konzentrationsmessung von cAMP

Wie zuvor beschrieben erfolgte die cAMP-Bestimmung mittels 96-well ELISA-Mikroplatten mit 38 pg/mL Empfindlichkeit ohne Acetylierung [116]. Mit dieser Methode wird der gesamte cAMP-Gehalt intrazellulär und der cAMP-Gehalt des Zell-Überstandes durch Konkurrenz des Proben-cAMP mit einer bekannten Menge eines cAMP-Peroxidase-Konjugates an Bindungsstellen eines polyklonalen Kaninchen cAMP-Antiserums bestimmt. Dieses, in Lyse-Reagenz 2B, wird auf einer mit Anti-Kaninchen-IgG bedeckten Mikroplatte immobilisiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde aus einem cAMP-Standard, bestehend aus cAMP in einer Konzentration von 32 nmol/L, gelöst in Lyse-Reagenz 1B (0,25% Dodecyltrimethylammoniumbromid), eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen erstellt (fmol/L): 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600; 3200. Eine Aufteilung der *wells* erfolgte gemäß Herstellerempfehlung in: ohne Substrat (Blank, B), nicht-spezifische-Bindung (NSB), 20 Standard (0 - 3200) sowie 72 Probe (S). Für die Ansätze wurde wie folgt pipettiert: 100 µL aus Lyse Reagenz 1B und 2B in die NSB- *wells*, 100 µL Lyse Reagenz 1B in die 0 Standard-*wells*, 100 µL Standardlösung in die dazugehörigen *wells* (5-3200), 80 µL Assaypuffer und 20 µL Probe in die S- *wells*. Nach Hinzugabe von 100 µL Antiserum, mit Assaypuffer 1:2 verdünnt und in 11 mL Assaypuffer gelöst, in Probe- und Standard- *wells*, folgte die Inkubation für 120 Minuten im Tischschüttler (4°C). Mit Ausnahme des B- *wells* wurden die Ansätze mit 50 µL cAMP-Peroxidase-Konjugat (cAMP-Kaninchen-Peroxidase in 0,05 M Acetatpuffer, pH 5,8, 0,02% bovines Serum Albumin und 0,01% (w/v) Konservierungslösung) ergänzt und erneut für 60 Minuten inkubiert (4°C). Die Proben wurden einem fünffachen Waschvorgang mit Waschpuffer, aus 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 0,05% Tween 20 (0,05% Polysorbat) unterzogen und getrocknet.

Die Messung erfolgte photometrisch nach Zusatz von 150 µL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TBM) und H₂O₂ in allen Ansätzen und Stopp der Umsetzungsreaktion durch Peroxidase (15-30 °C) mittels 100 µL 1-molarer Schwefelsäure. Dies erfolgte bei Blaufärbung des Nullstandards, abweichend von der Herstellerempfehlung, zwischen 10 und 120 Minuten. Durch Messung der optischen Dichte in der stabilen Phase für ca. 30 Minuten bei $\lambda = 450$ nm im Perkin-Elmer Victor ELISA-Platten Photometer wurden die Konzentrationen der Proben bestimmt.

2.7.3. Konzentrationsmessung von cGMP

Zur direkten cGMP-Bestimmung wurde Amersham-cGMP-Biotrak-Enzymimmunoassay System mit einer Sensitivität von 14 pg/mL nach Acetylierung verwandt. Das Verfahren entspricht, mit

Ausnahme des Acetylierungsschrittes zur Sensitivitätssteigerung, der cAMP-Messung [70]. cGMP wird hierbei im Bereich zwischen 2-512 fmol/well gemessen.

Die Acetylierung erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Proben und des Standards im Verhältnis 1:10 mit Acetylierungsreagenz aus Essigsäureanhydrid und Triäthylamin 1:2. Darauf folgte die Versuchsdurchführung analog zur cAMP-Messung. Eine Standardverdünnungsreihe wurde in folgenden Konzentrationen angefertigt: 0; 2; 4; 8; 16; 32; 128; 256 und 512 fmol/50 μ L. Die *wells* der Mikroplatten wurden in B, NSB, S und Standard (0-512) eingeteilt und 100 μ L cGMP-Antiserum in S- und Standard-*wells* pipettiert. Die NSB-*wells* wurden mit 150 μ L Assaypuffer versetzt. Standardlösung und Probe wurden aufgeteilt zu je 50 μ L und in die S- und Standard- *wells* pipettiert und zusammen mit den NSB- *wells* mit 100 μ L Antiserum aufgefüllt. Daraufhin wurden die Mikrotiterplatten für 120 Minuten inkubiert (4°C). Nach dem Zusatz von cGMP-Peroxidase-Konjugat in die NSB, S und Standard-*wells* erfolgte die zweite Inkubationsphase für 60 Minuten. Daraufhin wurden die Platten fünffach mit Waschpuffer gespült und getrocknet. Die photometrische Messung erfolgte nach Zugabe von 200 μ L TMB und H₂O₂, sowie 100 μ L Schwefelsäure zum Beenden der Umsetzreaktion bei sichtbarer Blaufärbung.

2.7.4. Auswertung der Konzentrationsmessungen

Gemäß den Herstellerempfehlungen wurde, wie zuvor beschrieben, eine nicht-lineare Eichkurve aus den erhobenen Daten der optischen Dichte der Standard-cAMP-Messungen, von denen der durchschnittliche NSB - Wert abgezogen wurde, in der Verdünnungsreihe erstellt [116]. Wie zuvor beschrieben, erfolgte mittels einer Funktionsanpassung gemäß der Methode der kleinsten Quadrate, die Erstellung der Standardkurve:

$$f(x) = \frac{a * b}{(b + x)} + c$$

mit x: Konzentration zyklischer Nukleotide im Standard [fmol]

f(x): Absorption bei $\lambda = 450$ nm

a, b, c: Funktionsparameter.

Nach Berechnung der wahrscheinlichsten Funktionsparameter erfolgte die Bestimmung der Menge der zyklischen Nukleotide [fmol] über:

$$x' = \frac{a * b}{(f(x') - c)} - b$$

mit: x': Konzentration zyklischer Nukleotide in Probe [fmol]

f(x'): Absorption bei $\lambda = 450$ nm

a,b,c: Funktionsparameter.

Für die Konzentrationsbestimmung [nmol/kg] wurde das Produkt aus x' und

$$\frac{\text{Gesamtvolumen } [\mu\text{L}]}{\text{Probenvolumen } [\mu\text{L}] * \text{Probengewicht } [\text{mg}]}$$

bestimmt [70].

2.8. Ellipsometriemessung

2.8.1. Versuchsaufbau

Die Messung der Adsorption von IDL erfolgte, wie zuvor detailliert beschrieben, lasergestützt, mittels *in situ*-Ellipsometrie bei 532 nm am Optrel Multiskop (Optrel, Kleinmachnow, Deutschland) [10,47,81,112]. Dieses Messverfahren nutzt die Änderung des Polarisationsstatus eines einfallenden Lichtstrahls bei Reflektion auf einer mit einer Probe beschichteten Oberfläche [47]. Für die Messung wurden hydrophobe Silikatoberflächen mittels termischer Oxidation und folgender Methylierung aus Silizium-Platten hergestellt. Natives HSPG (ca 175 kDA) boviner Aorten wurde zur Adsorption auf der Silikatoberfläche genutzt [127].

Als Versuchslösungen wurden genotypisiertes IDLapoE4/E4 und IDLapoE3/E3, jeweils in unbehandelter und zuvor mit Glukose inkubierter Form verwendet. Zusätzlich wurde die Adsorption von unbehandeltem IDLapoE4/E4 und mit 150 mg/dL Glukose-behandeltem IDLapoE4/E4 bei Applikation von 0,1 mg/mL β -Amyloid (Calbiochem, Schwalbach, Deutschland) bzw. β -Amyloid (0,1 mg/mL) + Glukose (150 mg/dL) bestimmt. Die Versuchslösungen wurden für 24 Stunden in einer glukosehaltigen Krebslösung (300 mg/dL) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die physiologische Konzentration der IDL-Lösung über eine Ionenaustauschchromatographie mit Krebslösung wiederhergestellt.

Mittels Bikarbonat/Phosphat-Puffer und kontinuierlicher Carbogen-Begasung (95% O₂ / 5% CO₂) wurde der pH-Wert der Probelösung konstant gehalten, um eine Calcium-Präzipitation und Protein Degradation zu vermeiden [81].

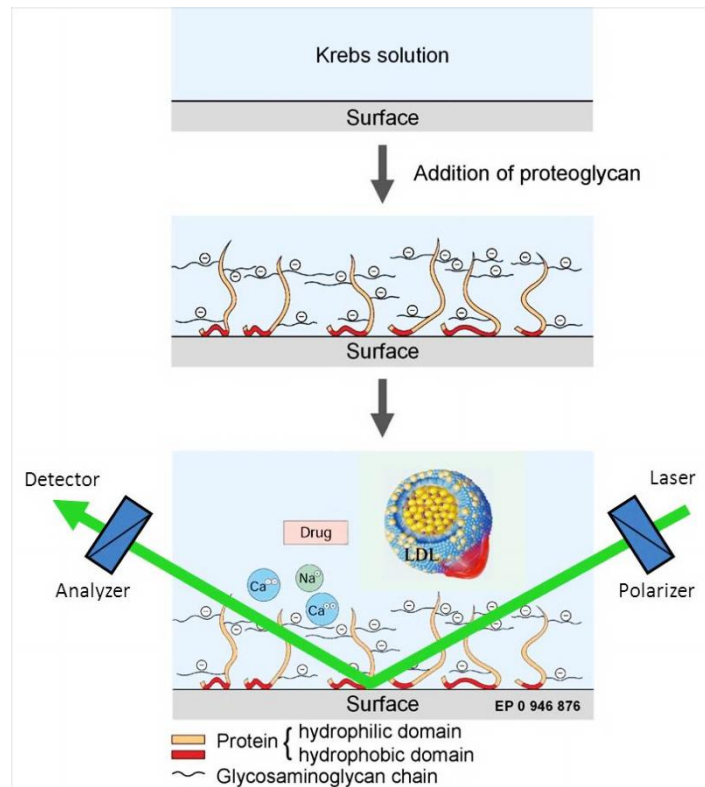


Abbildung 1. Laserbasiertes Biosensormodel (EP 0 946 876) (aus [124])

2.8.2. Versuchsdurchführung

Auf die Prüfung der optischen Antwort der Oberfläche folgend, wurde zu Beginn der Messung natives Proteoheparansulfat (HSPG) boviner Aorten (0,1 mg/mL) an der hydrophoben Silikatoberfläche adsorbiert [1]. Anschließend folgte jeweils nach 60 Minuten die Applikation der IDL-Versuchslösungen (10 mg/dL). Zur Bestimmung der arteriosklerotischen Nanoplaqueformation folgte weiterhin die Zugabe von Ca^{2+} in den ansteigenden titrierten Endkonzentrationen 2,52 mMol/L, 7,56 mMol/L, 10,08 mMol/L und 17,64 mMol/L. Zu dem Ellipsometrie-basierten Modell der Alzheimer-Plaue-Formation wurde je nach Versuchsaufbau Amyloid- β (0,1 mg/dL) mit oder ohne Glukose (150 mg/dL) hinzugegeben. Die adsorbierte Menge (Nanoplaquebildung) wurde anhand der aufgezeichneten Polarisationsänderung des reflektierten Laserstrahls gemäß De Feijter mit einem Brechungsindexinkrement von $0,18 \text{ cm}^3/\text{g}$ berechnet [81].

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte, wie zuvor beschrieben, mittels iterativer Funktionsanpassung der nichtlinearen allosterisch-kooperativen, einfach gesättigten oder exponentiellen Kinetik mithilfe der Methode der kleinsten Fehler-Quadrate [81]. Zusätzlich wurde die gesamte Nanoplaquebildung, abhängig von der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration,

bestimmt. Hierfür wurde der Quotient aus dem Mittelwert aller Messwerte der Nanoplaquebildung bei der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration und dem Mittelwert der Nanoplaquebildung unter IDL-Applikation ohne Ca^{2+} -Zusatz gebildet. Damit wurde der prozentuale Anstieg der Ca^{2+} -abhängigen Adsorptionsänderung, als Steigerung der durchschnittlichen gesamten Nanoplaquebildung im Vergleich zu den Kontrollwerten ohne Glukoseinkubation, errechnet [127].

2.9. Statistische Methoden

Zur Auswertung der vorliegenden Daten zur Messung des Gefäßtonus, der Membranpotentiale und der cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen an Koronararterien, wurden die arithmetischen Mittelwerte sowie der Standard Error of the Mean (SEM) erhoben. Weiterhin wurde für normalverteilte Grundgesamtheiten ein Zweistichproben-*t*-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakteristika der Studienpopulation und Studienpräparate

In die Studie wurden Koronararterienpräparate von 14 Patienten, die zwischen dem 15.07.2003 und dem 15.07.2015 einer Herztransplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin unterzogen wurden, eingeschlossen. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Patientencharakteristika der Studienpopulation

Charakteristika	Studienpopulation
Geschlecht	13 männliche Patienten, 1 weiblicher Patient
Alter	18 – 72 ($45 \pm 4,2$) Jahre
Kardiale Diagnosen	
Dilatative Kardiomyopathie	9 Patienten (2 Myokarditis, 3 idiopathisch, 3 Vitien, 1 ischämisch)
Restriktive Kardiomyopathie	1 Patient (chemotoxisch)
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	1 Patient

Medikation	
Katecholamine:	4 Patienten (Dobutamin)
β-Blocker:	3 Patienten (1 Carvedilol, 2 Metoprolol)
Phosphodiesterasehemmer:	3 Patienten (PDE3-Hemmer: 1 Enoximon (Perfan), 1 Corotrop; 1 Sildenafil)
Amiodaron:	4 Patienten

Die makroskopische Beurteilung der Gefäßabschnitte ergab ein zartes Präparat, fünf normale Präparate und sieben Gefäßpräparate, die teilweise arteriosklerotische Ablagerungen aufwiesen.

3.2. Messung des Gefäßtonus und des Membranpotentials

3.2.1. Einfluss von IDL *pool*

Jedem Versuch unter Einfluss von α -adrenerger- und β -adrenerger-Blockade ging die Messung der Kraftentwicklung und des Membranpotentials mit Krebslösung als Kontrollmedium und reinem IDL voraus. Abbildung 2B zeigt die Änderung des Vasotonus unter Perfusion mit Krebslösung (n=15) und IDL (n=13).

Nach Vorgabe des Vasotonus von 2,0 g über 10 Minuten, einer Flussrate des IDL respektive der Krebslösung von 3mL/min und einer zusätzlichen Inkubationszeit von 10 Minuten betrug die Kraftentwicklung der Gefäßabschnitte unter Superfusion mit Krebslösung im Mittel $1,728 \pm 0,055$ g gegenüber $1,746 \pm 0,040$ g unter IDL-Solut. Bei 100 mL/min Fluss und einer Inkubationszeit von 60 Minuten zeigte sich unter IDL eine signifikant verringerte Relaxation der Gefäßpräparate mit einem finalen Tonuswert von im Mittel $1,557 \pm 0,025$ g im Vergleich zu $1,332 \pm 0,009$ g bei Inkubation mit Krebslösung ($p=0,0001$). Die absolute flussabhängige Änderung des Vasotonus (ΔT_{Flow}) unter IDL-Superfusion betrug im Mittel 0,189 g. Im Vergleich zur Relaxation unter Krebslösung mit im Mittel 0,396 g zeigte sich eine verminderte Relaxation um im Mittel 0,207 g oder 12,1%. Die höchste absolute Tonusminderung ließ sich im Mittel sowohl in IDL als auch in Krebslösung im Intervall zwischen einer Flussrate von 3 mL/min und 5 mL/min feststellen (vgl. Abbildung 2A). Bis zu einem Fluss von 40 mL/min relaxierten die Präparate bei IDL-Inkubation. Mit steigender Flussrate zwischen 40 mL/min und 100 mL/min fand in IDL jedoch eine Vasokonstriktion von im Mittel $-0,003 \pm 0,026$ g im Vergleich zur voranschreitenden Vasorelaxation unter Krebslösung mit $0,057 \pm 0,009$ g statt.

Die IDL-induzierte Änderung des Gefäßtonus lässt sich, als Differenz zwischen erreichter Tonusänderung während der Inkubation der Präparate mit Krebslösung und IDL-Solut für jede Flussrate x bestimmen:

Ergebnisse

$$\Delta T(x)_{IDL} = T(x)_{IDL} - T(x)_{Krebs}$$

Im Mittel war die IDL-induzierte-Vasorelaxation im Vergleich zur Perfusion mit reiner Krebslösung um $0,144 \pm 0,037$ g vermindert. Die Messung des Membranpotentials zeigte für Koronarpräparate in Krebslösung eine stärkere flussabhängige Hyperpolarisation als in IDL-Solut (vgl. Abbildung 2A). Die Potentialmessung unter IDL-Superfusion ergab eine flussabhängige Hyperpolarisation von im Mittel $-47,2 \pm 0,3$ mV auf $-48,7 \pm 0,2$ mV. Dies entspricht einer mittleren Hyperpolarisation von 1,5 mV oder 3,2%. Die mittlere flussabhängige Hyperpolarisation in Krebslösung bei einem Membranpotential von $-47,3 \pm 0,2$ mV und einer Flussrate von 3 mL/Min auf $-50,5 \pm 0,1$ mV bei 100 mL/Min Flussrate, fiel mit 3,2 mV oder 6,7% größer aus. Entsprechend der IDL-induzierten Änderung des Gefäßtonus ließ sich eine IDL-abhängige Verminderung der Hyperpolarisation der Kontrolle von im Mittel $0,9 \pm 0,3$ mV festhalten. Ab einer Flussrate von 40 mL/min zeigte sich die Verminderung der Vasorelaxation durch IDL als signifikant ($p < 0,01$). Gemäß der Flussabhängigkeit wurde die maximale Hyperpolarisation durch IDL bei einem Fluss von 100 mL/min mit 1,8 mV erreicht.

3.2.2. Einfluss von IDL *pool* und Phentolamin

Unter Superfusion mit IDL *pool* und α -Adrenorezeptorblocker Phentolamin zeigte sich bei einer Flussrate von 3 mL/min ein Ausgangstonus von im Mittel $1,752 \pm 0,036$ g (vgl. Abbildung 3B). Die maximale Vasorelaxation erreichte das Gefäßpräparat bei einer Flussrate von 20 mL/min mit $1,608 \pm 0,015$ g früher als in reinem IDL *pool*. Daraufhin zeigte sich analog zu reinem IDL *pool* bei einer Flussrate von 100 mL/min eine Vasokonstriktion auf $1,626 \pm 0,026$ g. Die absolute flussabhängige Dilatation ΔT_{Flow} betrug 0,126 g (7,2%) oder eine um 68,8% verminderte Relaxation im Vergleich zur Superfusion mit Krebslösung. Insgesamt ließ sich lediglich für eine Flussrate von 100 mL/min eine bei IDL *pool* signifikant verminderte Vasorelaxation um 0,232 g feststellen (vgl. Abbildung 3B). Die Messung der Membranpotentiale ergab eine analoge Hyperpolarisation bis zu einer Flussrate von 40 mL/min und eine leichte Depolarisation bei einer Flussrate von 100 mL/min (vgl. Abbildung 3A). Nach der Vorspannphase auf 2,0 g und einer Anpassungsphase von 10 Minuten zeigte sich bei Inkubation mit IDL *pool* und Phentolamin im Mittel ein Membranpotential von $-47,1 \pm 0,2$ mV. Eine maximale Hyperpolarisation war bei einer Flussrate von 40 mL/min mit $-48,4 \pm 0,1$ mV zu verzeichnen. Hierauf folgte die Depolarisation um 0,2 mV auf $-48,2 \pm 0,2$ mV unter 100mL/min Flussrate. Die absolute

flussabhängige Hyperpolarisation bei Hinzugabe von Phentolamin war mit 0,8 mV im Vergleich zur Superfusion mit reinem IDL *pool* vermindert.

3.2.3. Einfluss von IDL *pool* und Propranolol

Die Blockade der β -Adrenorezeptoren mittels Propranolol während der Applikation von IDL *pool* wies im Vergleich zu reinem IDL zwischen 3 mL/min und 40 mL/min keine signifikanten Vasotonusänderungen auf (vgl. Abbildung 4B). Wie unter α -Blockade, zeigte sich im Intervall zwischen 3 mL/min und 5 mL/min Flussrate die stärkste Relaxation mit 0,095 g, entsprechend 89,6% der gesamten flussvermittelten Tonusänderung unter IDL mit Propranolol von 0,106 g. Eine Superfusion mit IDL und β -Blocker führte bei einer Flussrate von 100 mL/min zu einer signifikant verminderten Vasorelaxation auf $1,634 \pm 0,016$ g im Vergleich zur Wandspannung unter reiner IDL-Superfusion. Die Vasorelaxation unter IDL und Propranolol ähnelt sehr stark derjenigen unter IDL und Phentolamin. Während der Flussrate von 3 mL/min findet sich der größte Unterschied mit einer um 0,012 g erhöhten Vasorelaxation. Insgesamt zeigte sich eine flussabhängige Vasorelaxation, die im Vergleich zu den Kontrollversuchen unter Krebslösung, ab einer Flussrate von 20 mL/min signifikant vermindert war ($p < 0,001$). Entsprechend hierzu ergab sich ab dieser Flussrate eine signifikante Verminderung der Membranhyperpolarisation (vgl. Abbildung 4A). Beginnend mit einem Membranpotential von $-47,2 \pm 0,2$ mV vergrößert sich die Hyperpolarisation auf $-48,4 \pm 0,1$ mV bei einer Flussrate von 40 mL/min. Daraufhin folgte eine Depolarisation auf $-48,2 \pm 0,1$ mV.

3.2.4. Einfluss von IDL *pool* mit Phentolamin und Propranolol

Die Inkubation der Gefäßpräparate mit IDL, Phentolamin und Propranolol führte für alle Flussraten zu einer signifikanten Vasokonstriktion (vgl. Abbildung 4B). Bereits zu Beginn der Messung, nach einer Inkubationszeit von insgesamt 20 Minuten und 3 mL/min Flussrate zeigte sich die signifikant geringste Tonusminderung. Die Koronarpräparate relaxierten nur um 0,144 g auf $1,856 \pm 0,040$ g. Die maximale Vasodilatation unter IDL mit α - und β -Adrenorezeptorblockade trat bei einer Flussrate von 5 mL/min mit $1,788 \pm 0,046$ g auf. Dem folgte eine Vasokonstriktion der Gefäßstücke auf $1,858 \pm 0,042$ g bei 100 mL/min. Die absolute flussabhängige Tonusänderung ergab eine Vasokonstriktion von 0,002 g. Im Vergleich zur Einzelblockade der α - oder β -Adrenorezeptoren zeigte die flussabhängige Änderung des Gefäßtonus bei Blockade beider Adrenorezeptoren im Mittel eine signifikante Vasokonstriktion ab einer Flussrate von 5 mL/min. Bis zu einer Flussrate von 5 mL/min ließ sich eine Membranhyperpolarisation ausgehend von $-46,3 \pm 0,1$ mV auf $-46,5 \pm 0,1$ mV feststellen (vgl.

Ergebnisse

Abbildung 4A). Danach blieb das Membranpotential fast konstant und erreichte bei 100 mL/min Flussrate $-46,5 \pm 0,1$ mV.

Ergebnisse

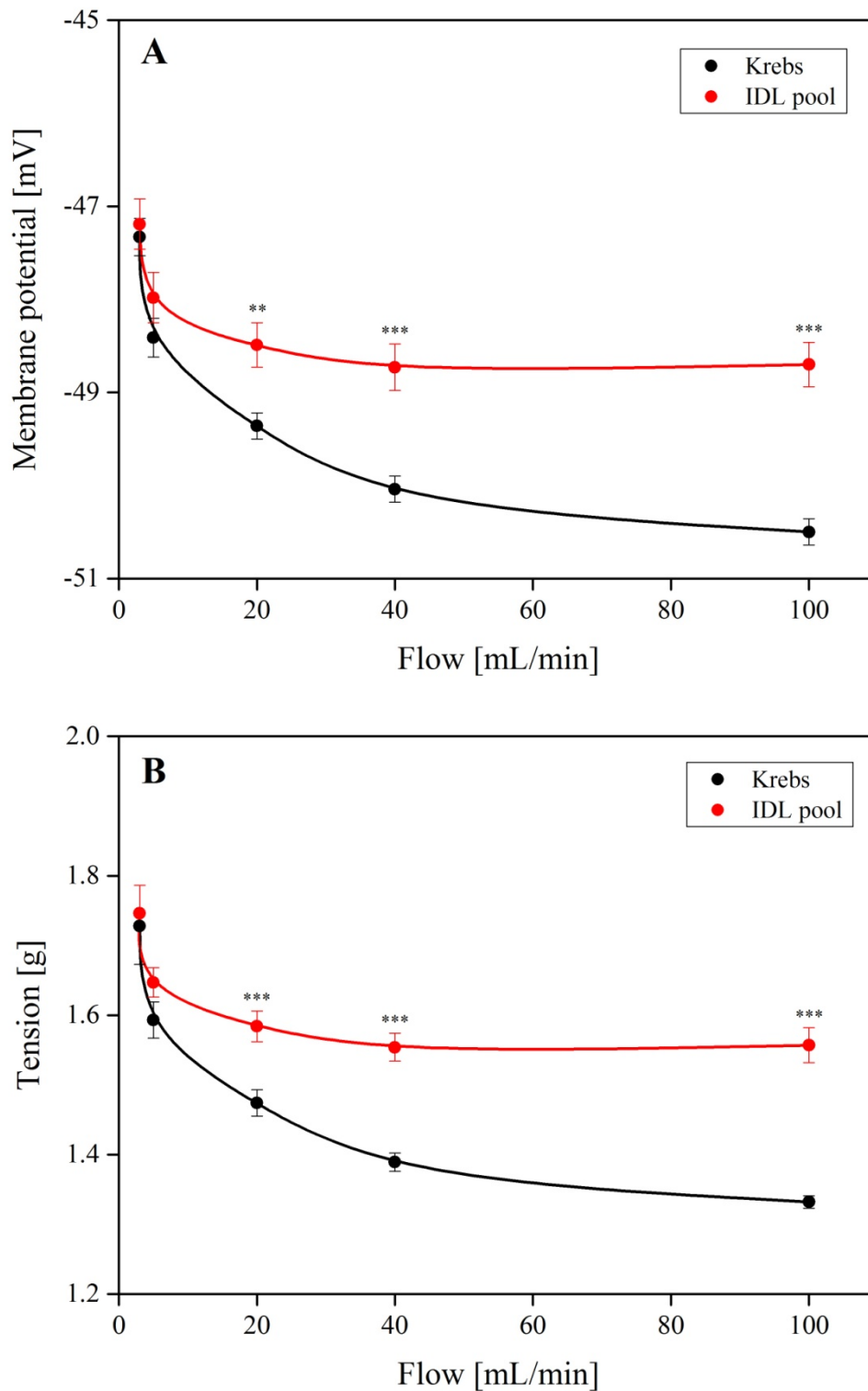


Abbildung 2. (A) Flussabhängige Änderung des transmembranalen Potentials in Krebslösung (●) und IDL *pool* (●). (B) Flussabhängige Vasotonusänderung in Krebslösung (n=15) und IDL *pool* (n=13). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

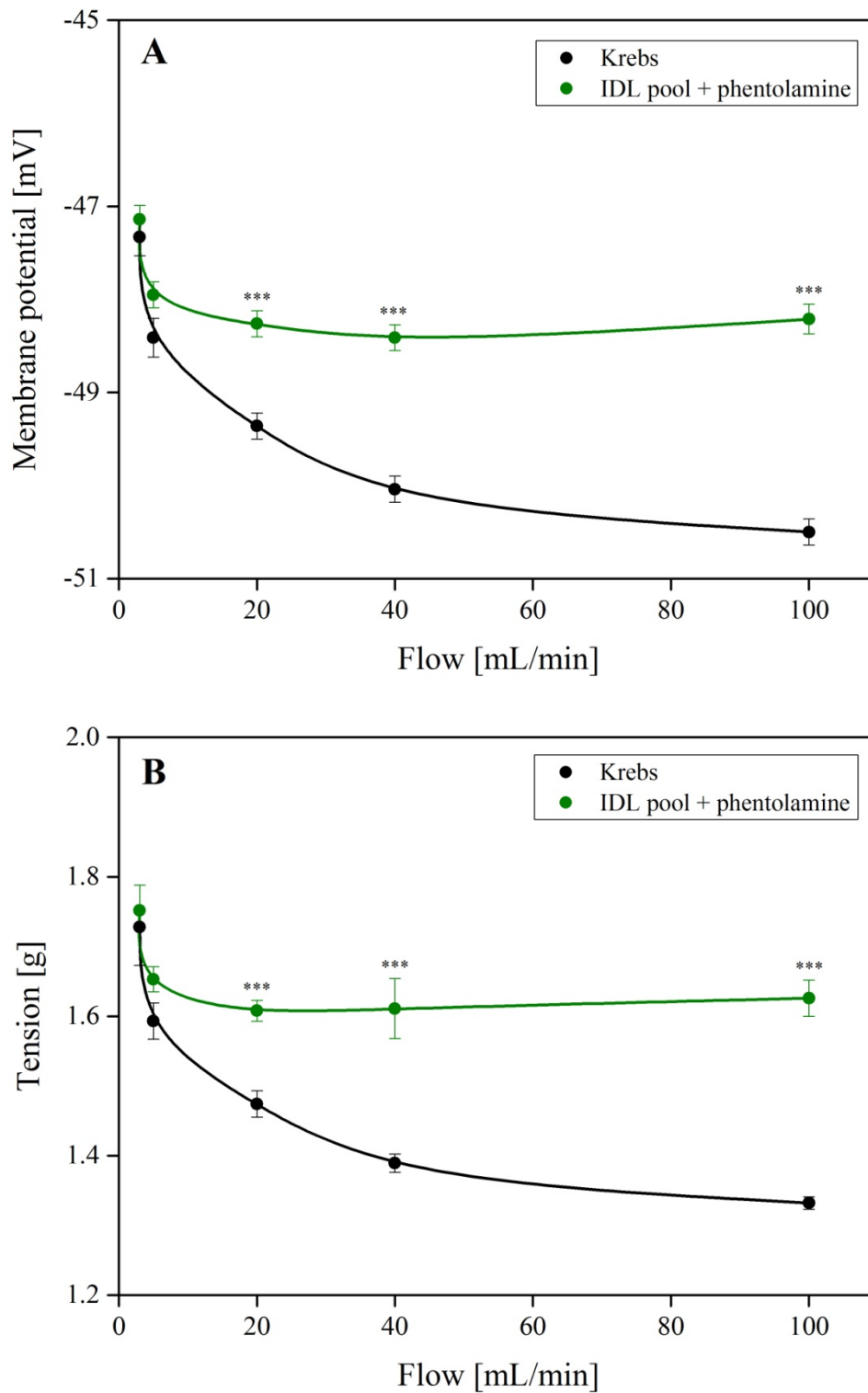


Abbildung 3. (A) Flussabhängige Änderung des transmembranalen Potentials unter Krebzlösung (•) und IDL *pool* + Phentolamin (•). (B) Flussabhängige Vasotonusänderung in Krebzlösung (n=15) und IDL *pool* + Phentolamin (n=8). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

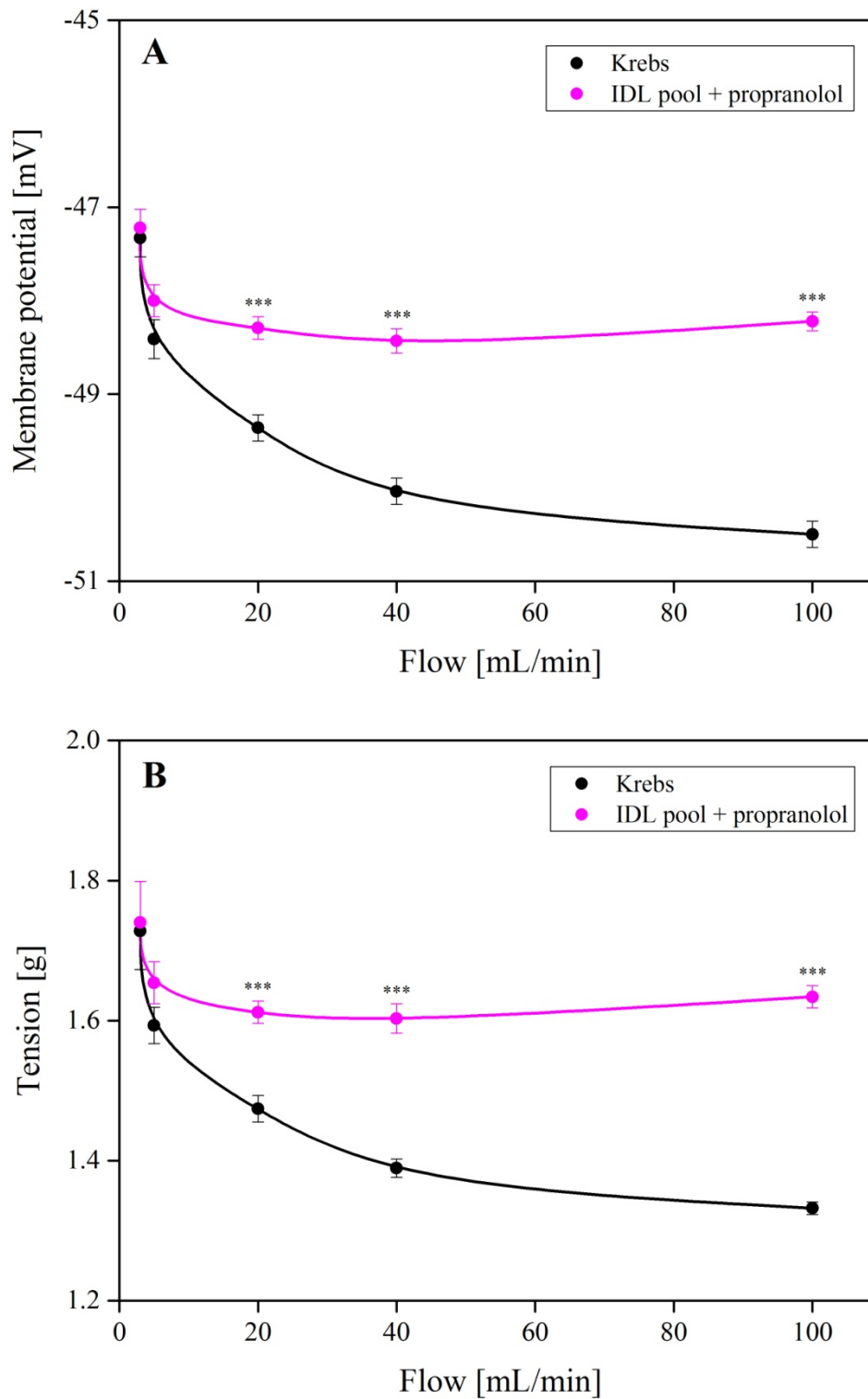


Abbildung 4. (A) Flussabhängige Änderung des transmembranalen Potentials in Krebslösung (●) und IDL *pool* + Propranolol (●). (B) Flussabhängige Vasotonusänderung in Krebslösung (n=15) und IDL *pool* + Propranolol (n=8). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

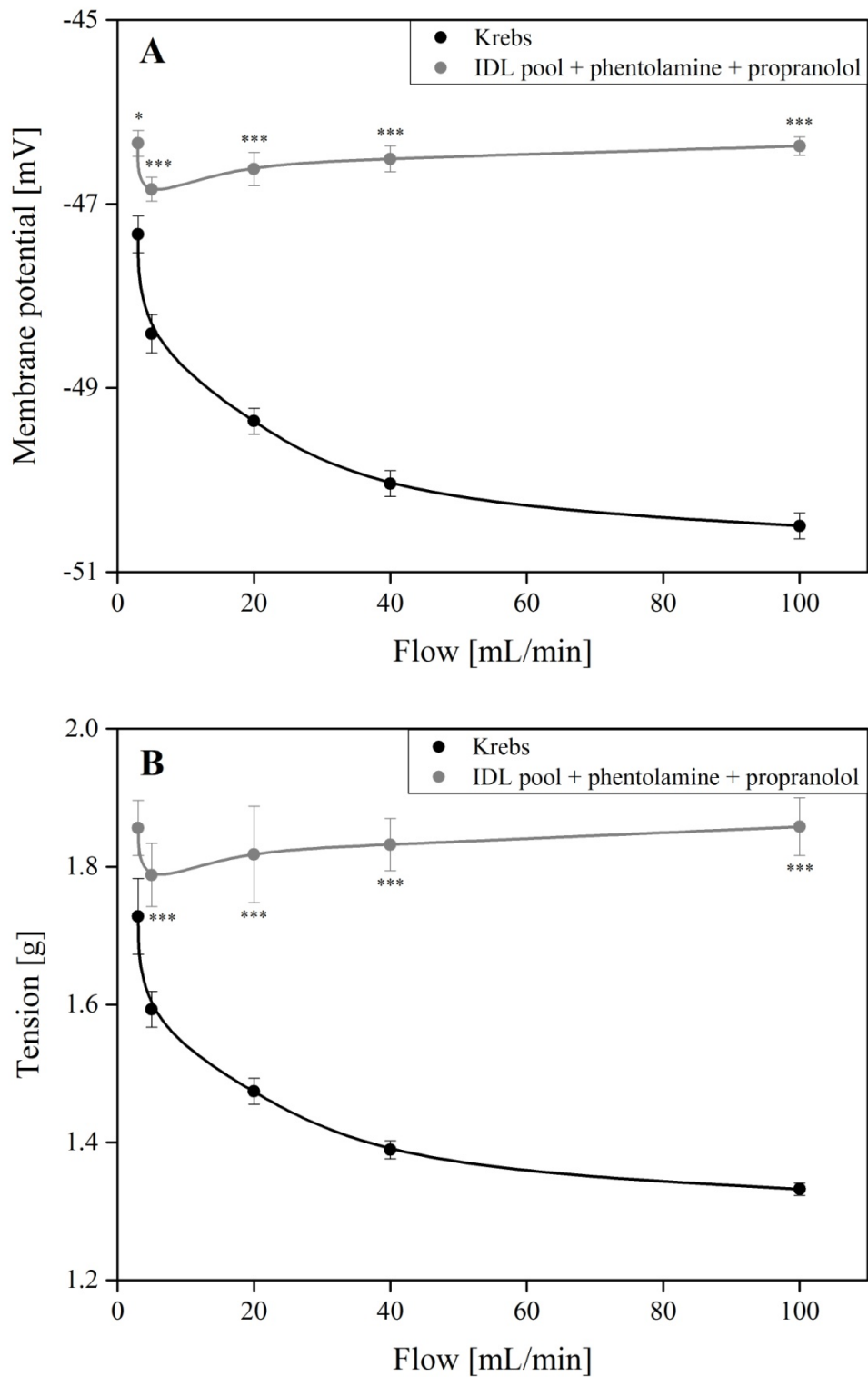


Abbildung 5. (A) Flussabhängige Änderung des transmembranalen Potentials in Krebslösung (●) und IDL *pool* + Phentolamin + Propranolol (*). (B) Flussabhängige Vasotonusänderung in Krebslösung (Kontrollmessung n=15) und IDL *pool* + Phentolamin + Propranolol (n=9). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.5. Einfluss der AR-Antagonisierung im Vergleich zu IDL *pool*

Die Differenz der Vasotonuswerte mit zugesetzten AR-Antagonisten im Vergleich zu reiner IDL *pool*-Lösung ist in Abbildung 6 dargestellt. Unter Applikation von Phentolamin und Propranolol allein ergab sich eine sehr ähnliche Differenz gegenüber Superfusion mit reinem IDL *pool*. Im Intervall zwischen 40 mL/min und 100 mL/min Flussrate zeigte sich unter Perfusion mit IDL *pool* und Propranolol eine größere Steigerung (0,039 g) als unter IDL *pool* und Phentolamin (0,028 g). Bei einer Flussrate von 100 mL/min unterscheiden sich die Messungen unter der einzelnen Hinzugabe der AR-Antagonisten gegenüber IDL *pool* von diesem um 13,1% für IDL *pool* mit Phentolamin und um 12,4% für IDL *pool* mit Propranolol. Die gleichzeitige Gabe von IDL *pool* mit beiden AR-Antagonisten ergab eine deutlich stärkere Kontraktion der Gefäßpräparate. Schon zu Beginn der Messungen ließ sich ein signifikant erhöhter Grundtonus messen. Im weiteren Kurvenverlauf zeigte sich eine Differenz von 0,301 g im Vergleich zu IDL *pool*.

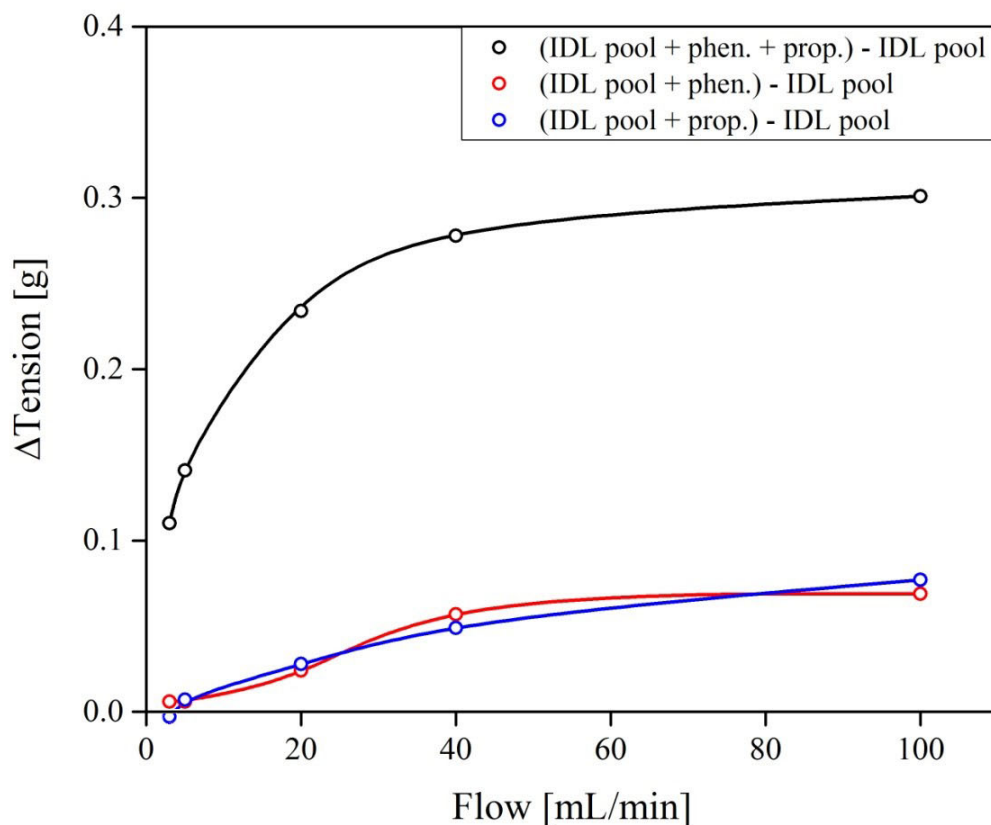


Abbildung 6. Wirkung von Phentolamin, Propranolol und beiden Substanzen auf den Gefäßtonus im Vergleich zu IDL *pool*.

3.2.6. Einfluss von IDLapoE4/E4

Abbildung 7 zeigt die Änderung des Gefäßtonus der Koronarien bei Applikation der IDLapoE4/E4-Isoform. Insgesamt lässt sich eine verminderte flussabhängige Vasorelaxation der Gefäßpräparate gegenüber der Kontrolle in Krebslösung und gegenüber IDL *pool* festhalten [127]. Nach Inkubation mit IDLapoE4/E4 für 20 Minuten und einer Flussrate von 3 mL/min wurde ein Tonus von $1,883 \pm 0,019$ g gemessen. Wie bei einer flussabhängigen Dilatation erfolgte ein weiterer gleichmäßiger Abfall des Vasotonus auf $1,622 \pm 0,016$ bei 40 mL/min Flussrate. Im Vergleich zu reinem IDL und IDL mit Adrenorezeptorblockern zeigte sich bei Applikation von IDLapoE4/E4 statt einer Konstriktion lediglich eine stark verminderte Vasorelaxation von nur 0,021 g im Intervall zwischen der Flussrate von 40 mL/min und 100 mL/min. Mit einem Tonuswert von $1,601 \pm 0,014$ g bei einer Flussrate von 100 mL/min betrug die absolute flussvermittelte Vasorelaxation insgesamt 0,282 g.

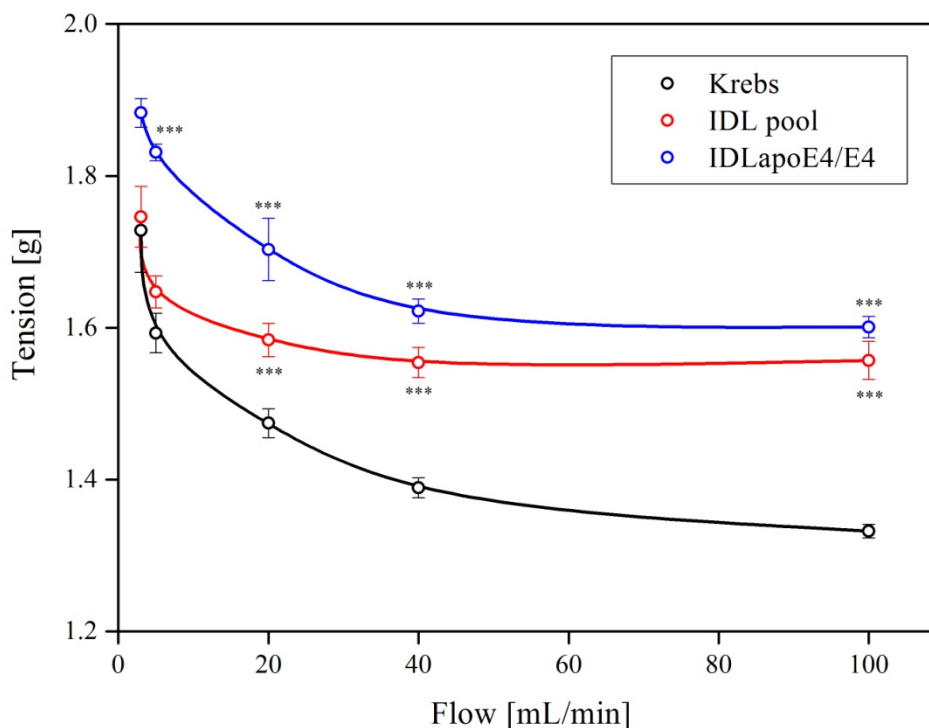


Abbildung 7. Flussabhängige Vasotonusänderung unter Krebslösung (●, Kontrollmessung, n=15), IDL *pool* (●, Vergleich, n=13) und IDLapoE4/E4 (●, n=5). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber Krebslösung.

3.2.7. Einfluss von IDL apo E0/E0 ohne und mit apoE3_{syn}

Bei Zusatz von IDLapoE0/E0 wurde eine starke Vasokonstriktion ausgehend von 3 mL/min Flussrate mit $2,048 \pm 0,066$ g auf $2,694 \pm 0,042$ g bei 100 mL/min gemessen [127]. Im Intervall zwischen 5 und 20 mL/min Flussrate fand die stärkste Vasokonstriktion von 0,343 g statt. Die gesamte Vasokonstriktion beträgt im Mittel 0,646 g (31,5%). Der Vasotonus liegt im Verlauf 0,302 g bis 1,137 g über der Wandspannung unter reiner IDL-Superfusion.

Bei zusätzlicher Applikation von synthetischem ApoE3 zeigte sich zunächst ein im Vergleich zu IDL *pool* signifikant verminderter Grundtonus von auf $1,678 \pm 0,091$ g ($p < 0,05$). Folgend kontrahierten die Gefäßpräparate bis zum Erreichen des maximalen Tonus von $1,984 \pm 0,077$ g ($p < 0,01$). Die Vasokonstriktion über die Zeit betrug insgesamt im Mittel 0,306 g (18,24%).

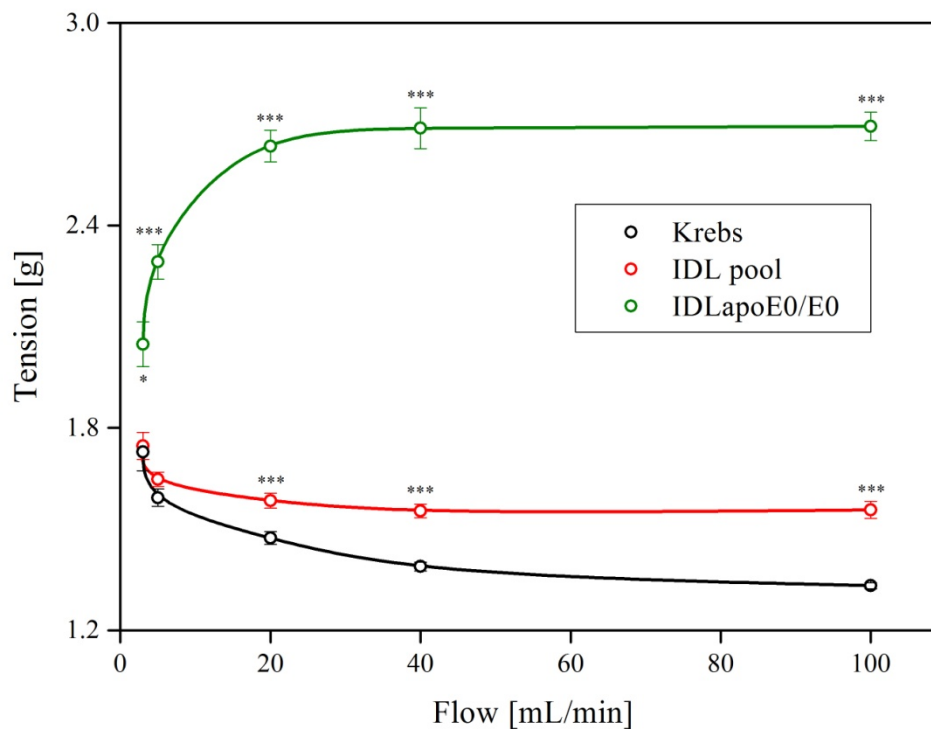


Abbildung 8. Flussabhängige Vasotonusänderung unter Krebslösung (●, n=15), IDL *pool* (◊, Vergleich, n=13) und IDLapoE0/E0 (◉, n=3). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber Krebslösung.

Ergebnisse

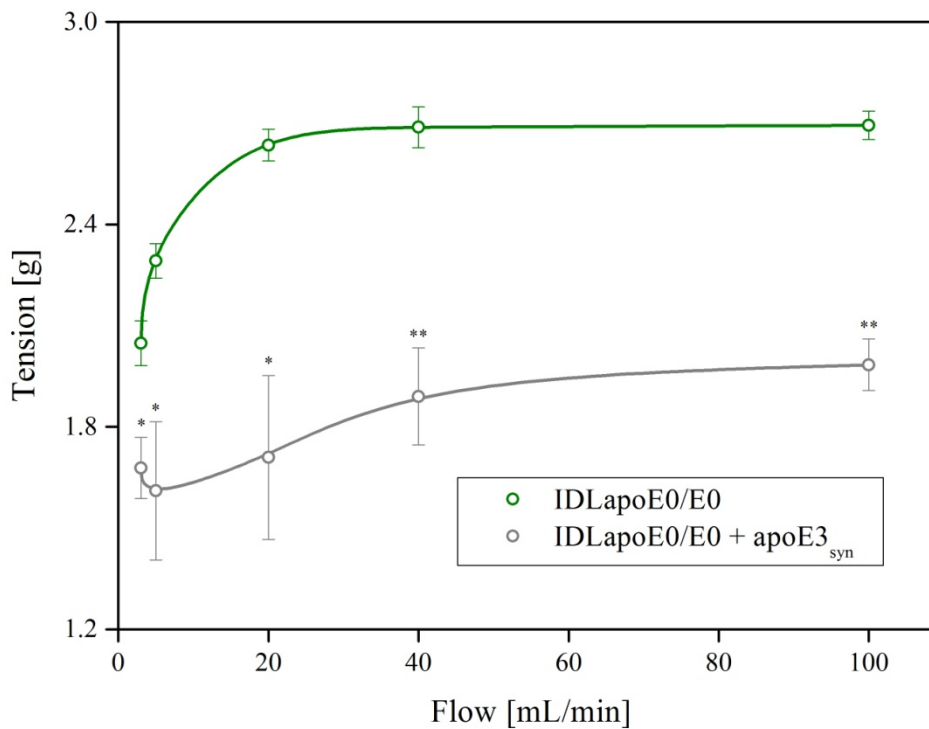


Abbildung 9. Flussabhängige Vasotonusänderung in IDLapoE0/E0 (●, n=3) und IDLapoE0/E0 + apoE3_{syn} (○, n=3). Mittelwerte ± SEM, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 gegenüber IDLapoE0/E0.

3.3. Bestimmung der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide

3.3.1. Einfluss von Krebslösung und IDL pool

Tabelle 4. Konzentrationen von cGMP und cAMP in Krebslösung und verschiedenen IDL-Lösungen mit Phentolamin oder Propranolol bei 100 mL/min Flussrate. Mittelwert ± SEM (Anzahl)

Substrat	Konzentration zyklischer Nukleotide	
	cGMP [nmol/kg]	cAMP [nmol/kg]
Krebslösung	50,6 ± 1,7 (n=10)	165,5 ± 3,8 (n=50)
IDL Pool	32,5 ± 0,4 (n=38)	131,3 ± 2,0 (n=54)
IDL + Phentolamin	29,7 ± 1,0 (n=28)	127,9 ± 6,3 (n=9)
IDL + Propranolol	29,0 ± 0,5 (n=36)	127,9 ± 2,5 (n=18)
IDL + Phentolamin + Propranolol	18,7 ± 0,8 (n=28)	117,2 ± 4,3 (n=16)

Tabelle 4. zeigt die Ergebnisse der Konzentrationsmessung der zyklischen Nukleotide in den Gefäßpräparaten nach 100 mL/min Flussrate. Die Messung der cGMP-Konzentration ergab eine signifikante Verminderung in Präparaten mit IDL-Superfusion im Vergleich zur Superfusion mit Krebslösung (p<0,0001). Die Konzentration ist um 18,2 nmol/kg (35,9%) vermindert. Eine

Ergebnisse

Zugabe von Phentolamin resultierte in einer weiteren Reduktion der cGMP-Konzentration um 2,7 nmol/kg (8,4%) im Vergleich zur reinen IDL-Inkubation ($p=0,0077$). Ähnlich hoch, und damit die Tonusmessungen bestätigend, fiel die Konzentration der cGMP-Nukleotide nach Applikation von Propranolol aus. Diese betrug $29,0 \pm 0,5$ nmol/kg und war um 3,4 nmol/kg (10,5%) im Vergleich zur IDL-Superfusion vermindert ($p<0,0001$). Der simultane Zusatz von Phentolamin und Propranolol zur IDL-Lösung resultierte in einer um 13,7 nmol/kg (42,3%) verminderten cGMP-Konzentration ($p<0,0001$).

Die cAMP-Konzentration war unter IDL im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant vermindert ($p<0,0001$). Im Mittel zeigte sich eine cAMP-Konzentration von $131,3 \pm 2,0$ nmol/kg. Mit Phentolamin inkubierten Proben ergaben einen um 37,6 nmol/kg (22,75%) verminderten Wert ($p<0,0001$). Auch Propranolol führte zu einer um 37,6 nmol/kg verminderten cAMP-Konzentration ($p<0,0001$), während diese Reduktion bei gleichzeitige Gabe der Adrenorezeptorantagonisten 48,4 nmol/kg betrug ($p<0,001$).

3.3.2. Einfluss von homozygotem IDLapoE4/E4 und IDLapoE0/E0

Tabelle 5. Konzentrationen von cGMP und cAMP in Krebslösung und verschiedenen IDLapoE-Isoformen bei 100 mL/min Flussrate. Mittelwerte \pm SEM (Anzahl).

Substrat	Konzentration zyklischer Nukleotide	
	cGMP [nmol/kg]	cAMP [nmol/kg]
Krebslösung	$50,6 \pm 1,7$ (n=10)	$165,5 \pm 3,8$ (n=50)
IDL Pool	$32,5 \pm 0,4$ (n= 38)	$131,3 \pm 2,0$ (n=54)
IDLapoE4/E4	$29,3 \pm 1,0$ (n= 12)	$129,0 \pm 4,7$ (n=14)
IDLapoE0/E0	$10,4 \pm 0,5$ (n=8)	$100,7 \pm 5,5$ (n=16)
IDLapoE0/E0 + apoE_{syn}.	$15,1 \pm 1,1$ (n=8)	$114,7 \pm 5,3$ (n=16)

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung zyklischer Nukleotide für IDL bei seinen verschiedenen ApoE-Isoformen. IDLapoE4/E4 mit seinen erhöhten flussabhängigen Tonuswerten, zeigte um 3,2 nmol/kg (9,7%) signifikant verminderte cGMP Konzentrationen im Vergleich zu den Präparaten in IDL *pool*. Unter Superfusion mit IDLapoE0/E0 zeigte sich die geringste cGMP-Konzentration mit lediglich $10,4 \pm 0,5$ nmol/kg. Sie war gegenüber der IDL *pool*-Lösung um 22,0 nmol/kg (67,8%) verringert ($p=0,002$). Die zusätzliche Applikation von synthetischem ApoE3/E3 schwächte diesen Effekt ab ($p=0,0014$). Unter der supplementierten IDLapoE0/E0-Lösung zeigte sich eine um nur noch 17,3 nmol/kg (53,4%) verminderte cGMP-Konzentration. Die cAMP Konzentration war für IDLapoE4/E4 um 2,3 nmol/kg gegenüber IDL

Ergebnisse

pool nicht signifikant vermindert. Die Applikation von IDL ApoE0/E0 zeigte dagegen eine signifikante Verminderung des cAMP um 30,5 nmol/kg (23,2%, $p < 0,0001$). Die Addition des synthetischen ApoE3 zur ApoE0/E0-Lösung resultierte in einer nur noch um 16,5 nmol/kg (12,6%) signifikant verringerten cAMP-Konzentration im Vergleich zu IDL *pool* ($p < 0,0001$).

3.5. Chemomechanische Kopplung

Abbildung 10 zeigt den Zusammenhang zwischen Nukleotidkonzentrationen und zugehörigen Gefäßtonuswerten. Einer chemomechanischen Kopplung entsprechend sind hohe Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP verknüpft mit signifikant verminderten Werten im Gefäßtonus (n=8).

Ergebnisse

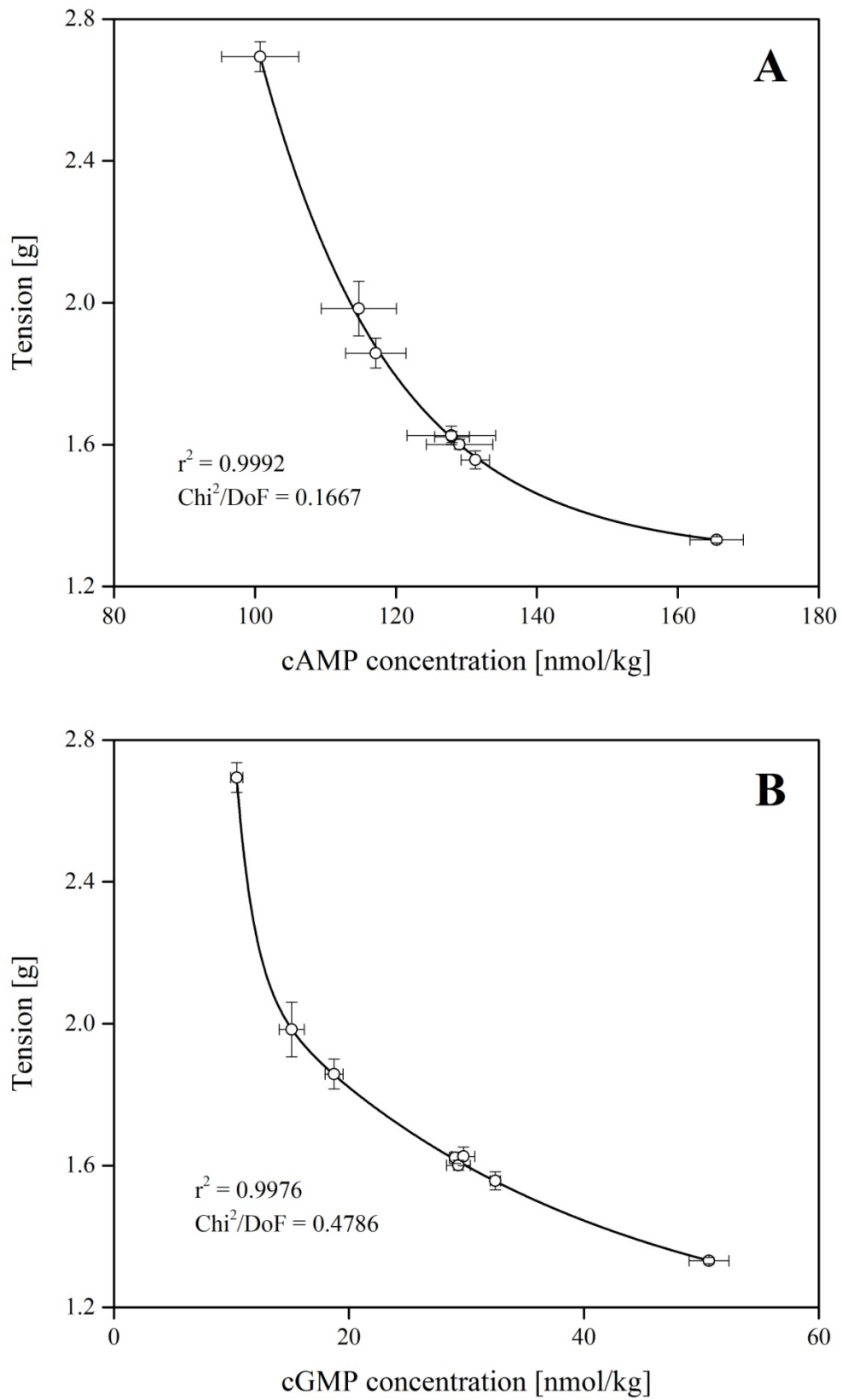


Abbildung 10. Wandspannung in Abhängigkeit von der cAMP- (A) und cGMP-Konzentration (B); Mittelwerte \pm SEM.

3.4. Ellipsometriemessung

3.4.1. Arteriosklerotische Nanoplaqueformation mit IDLapoE3/E3 ohne und mit Glukose

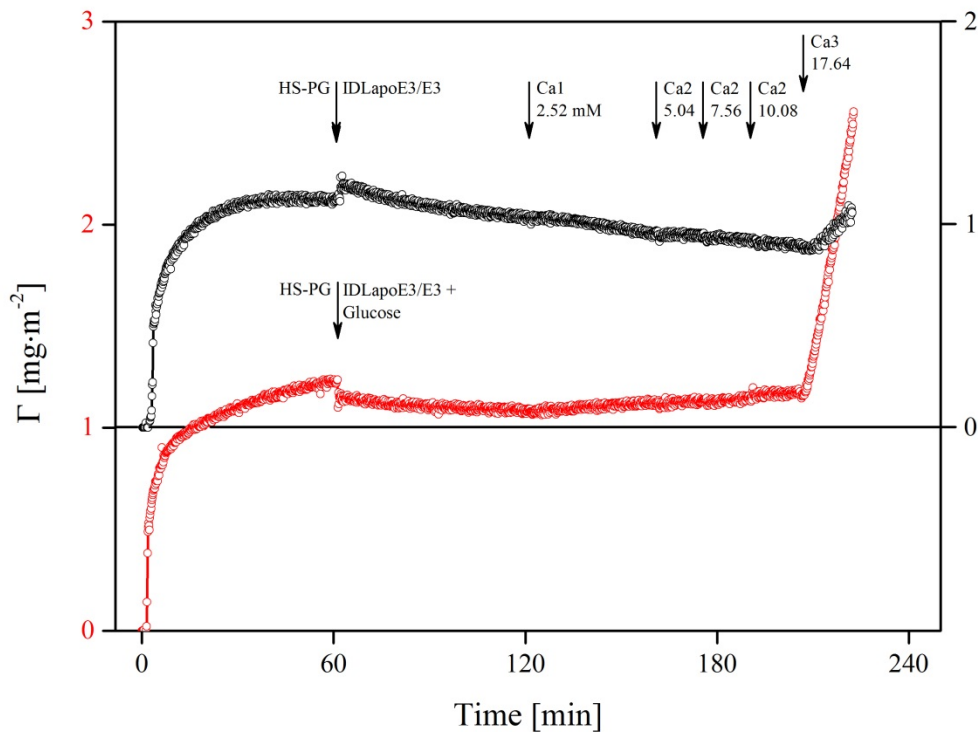


Abbildung 11. Arteriosklerotische Nanoplaqueformation mit IDLapoE3/E3. Adsorbierte Schichtmenge gegenüber der Zeit ohne (●, pH 7,23) und mit (●, pH 7,26) Glukoseapplikation [127].

Abbildung 11 zeigt die arteriosklerotische Nanoplaqueformation unter IDLapoE3/E3 Inkubation. Zu Beginn der Messung, beim Zeitpunkt null erfolgten Zugabe und Adsorption von HSPG an die hydrophobe Silikatoberfläche. Nach 60 Minuten zeigt sich eine gesättigte Adsorption mit 1,2 mg/m². Die Applikation von IDLapoE3/E3, ohne oder mit Glukosezusatz ist durch den ersten Pfeil gekennzeichnet. Bei einer physiologischen Serum-Ca²⁺-Konzentration von 2,52 mmol/L, ebenfalls gekennzeichnet durch einen Pfeil, ist die absolute arteriosklerotische Nanoplaqueformation des glykierten IDLapoE3/E3 im Vergleich zum nicht-glykierten IDLapoE3/E3 erhöht (vgl. Abbildung 12A). Die Adsorption bei Applikation von IDLapoE3/E3 ohne vorherige Glukoseinkubation sinkt bei steigender Ca²⁺-Konzentration graduell ab. Erst ab einer Ca²⁺-Konzentration von 17,64 mmol/L zeigt sich ein Anstieg. Unter glykiertem IDLapoE3/E3 imponiert dagegen ein stetiger Anstieg der Adsorption bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von 10,08 mmol/L mit einem folgenden steilen Anstieg der adsorbierten Menge

Ergebnisse

[127]. Insgesamt zeigt sich für IDLapoE3/E3 eine Ca^{2+} -abhängige Nanoplaquebildung (Abbildung 12 B).

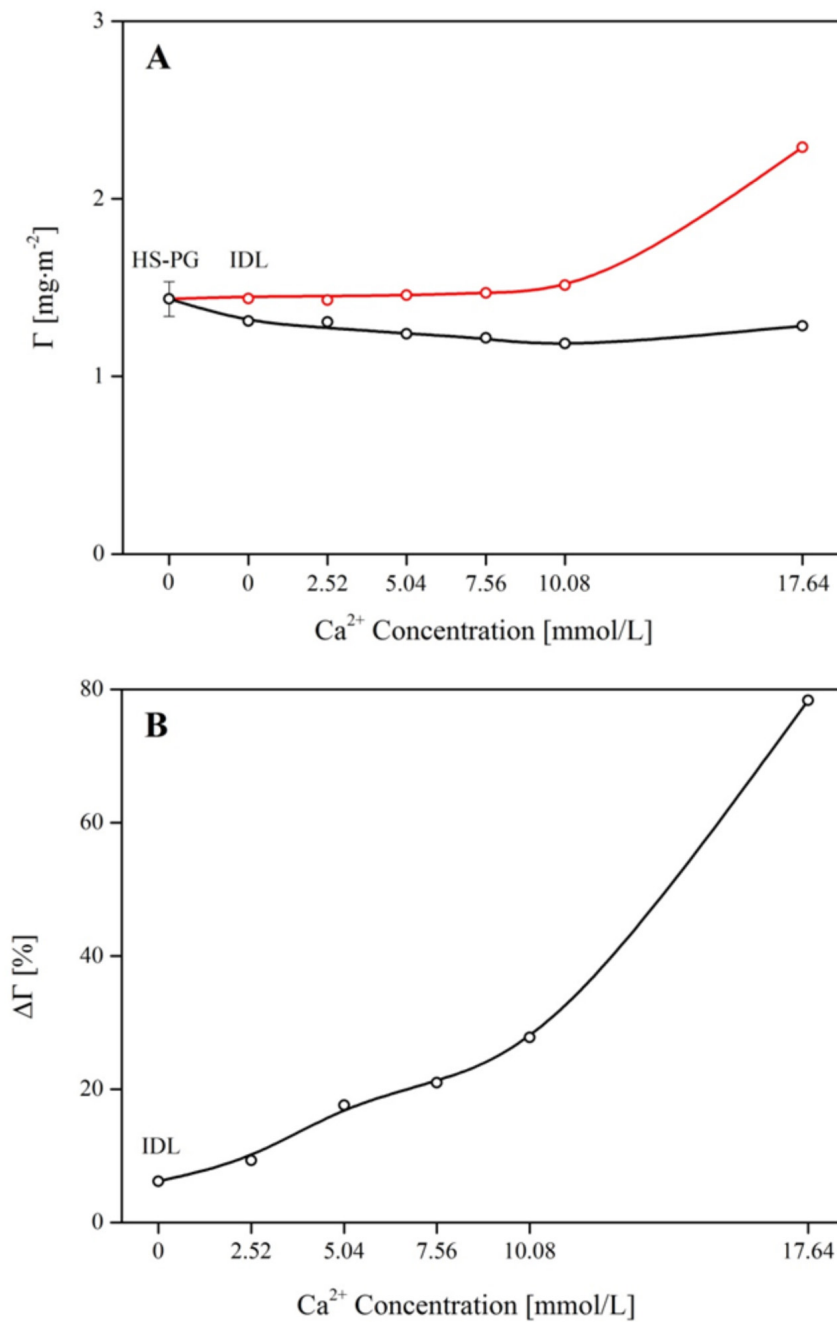


Abbildung 12. (A) Auf HSPG normierte adsorbierte Schichtmenge aus Abbildung 11 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration der Krebslösung. Dargestellt ist der Kurvenverlauf ohne (\bullet) und mit (\circ) Glukosebehandlung. (B) Steigerung der Ca^{2+} -induzierten Veränderung der Schichtmenge (Nanoplaquebildung) aus Abbildung 12 A. Der prozentuale Anstieg ist als Verhältnis zu den Kontrollwerten ohne Glukoseinkubation dargestellt [127].

3.4.2. Arteriosklerotische Nanoplaqueformation mit IDLapoE4/E4 mit und ohne Glukose

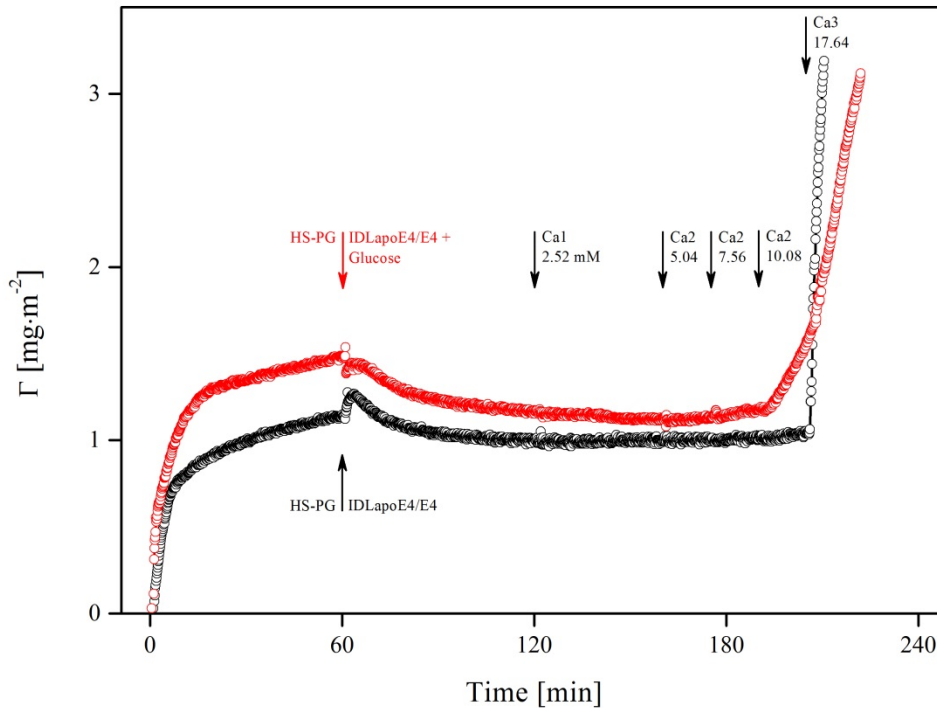


Abbildung 13. Arteriosklerotische Nanoplaqueformation mit IDLapoE4/E4. Adsorbierte Schichtmenge gegenüber der Zeit ohne (●, pH 7,33) und mit (●, pH 7,30) Glukoseapplikation [127].

Die Applikation von genotypisiertem IDLapoE4/E4 resultierte in einer leichten Abnahme der Nanoplaqueformation bis zu einer physiologischen Ca²⁺-Konzentration von 2,52 mmol/L (Abbildung 13). Hierauf folgte eine graduelle Zunahme der Adsorption. Ab einer Ca²⁺-Konzentration von 17,64 mmol/L zeigte sich ein steiler Anstieg der Schichtmenge im Vergleich zur Messung unter IDLapoE3/E3. Die vorherige Inkubation mit Glukose resultierte in einer stetig vergrößerten Zunahme der Nanoplaquebildung ab einer Ca²⁺-Konzentration von 5,04 mmol/L (vgl. Abbildung 14A). Die Nanoplaquebildung nimmt bereits nach Zugabe von IDLapoE4/E4 stetig und ab einer Ca²⁺-Konzentration von 7,56 mmol/L deutlich zu (vgl. Abbildung 14B) [127].

Ergebnisse

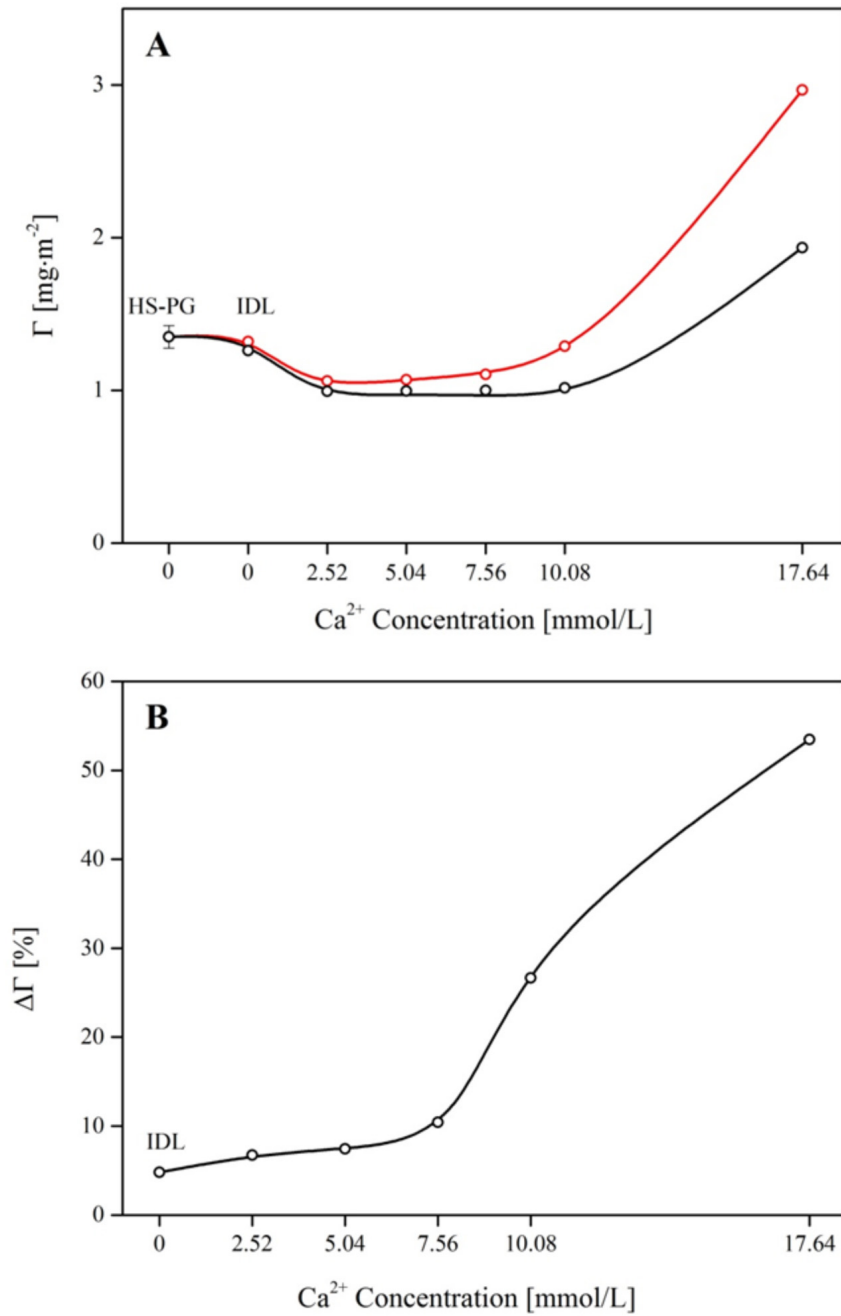


Abbildung 14. (A) Auf HSPG normierte adsorbierte Schichtmenge aus Abbildung 13 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration der Krebslösung. Dargestellt ist der Kurvenverlauf ohne (●) und mit (●) Glukosebehandlung. (B) Steigerung der Ca^{2+} -induzierten Veränderung der Schichtmenge (Nanoplaquebildung) aus Abbildung 14A. Der prozentuale Anstieg ist als Verhältnis zu den Kontrollwerten ohne Glukoseinkubation dargestellt [127].

3.4.3. Alzheimer-Nanoplaqueformation mit IDLapoE4/E4 ohne und mit Glukose

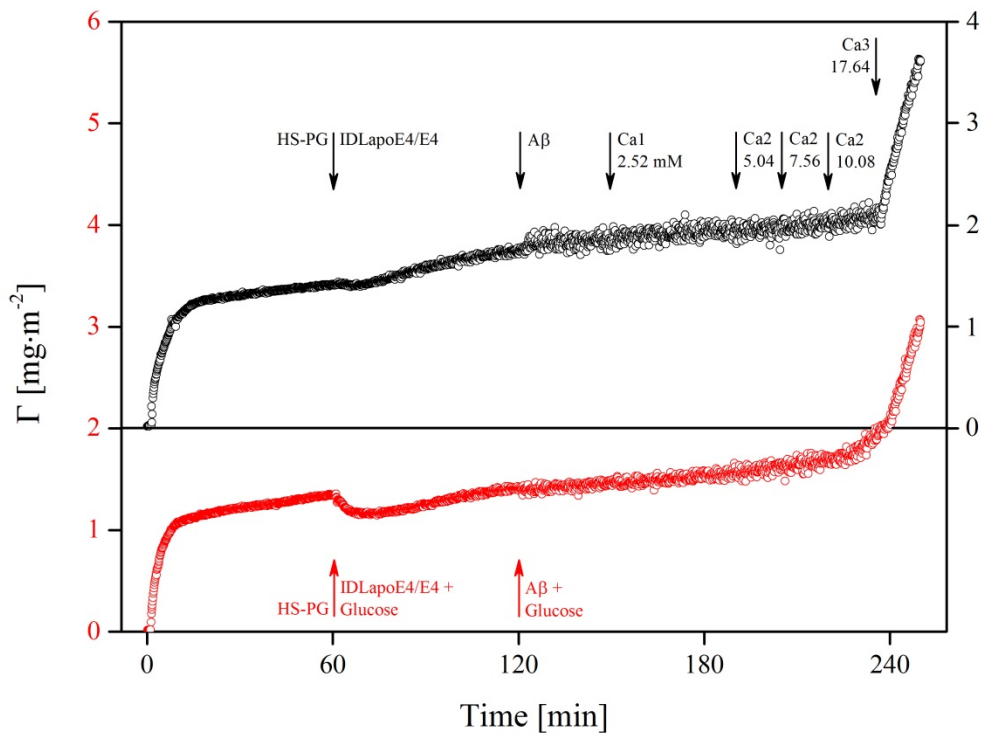


Abbildung 15. Alzheimer Nanoplaqueformation mit IDLapoE4/E4 und A β -42. Adsorbierte Schichtmenge gegenüber der Zeit ohne (\bullet , pH 7,32) und mit (\circ , pH 7,36) Glukoseapplikation.

Abbildung 15 zeigt die Nanoplaqueformation unter Applikation von IDLapoE4/E4 mit zusätzlicher Gabe von A β -42. Zum Zeitpunkt Null erfolgte die Adsorption von HSPG an die Silikatoberfläche. Nach 60 Minuten wurde IDLapoE4/E4 Lösung ohne oder mit vorheriger Glukoseinkubation hinzugefügt. Unter A β -42-Applikation folgte ein stetiger Anstieg der Nanoplaquebildung. Bereits in physiologischer Ca²⁺-Konzentration von 2,52 mmol/L zeigte sich eine deutliche Verstärkung dieses Anstiegs, verglichen mit der Nanoplaquebildung ohne A β -42-Zugabe. Auffällig ist zudem eine prominente Zunahme der Streuung der Messpunkte, Indikator für zunehmende Partikelbildung der ternären und quaternären Komplexe. Die ellipsometrische Bestimmung der Nanoplaqueformation bei Applikation von IDLapoE4/E4, das zuvor eine Glukoseanwendung erfuhr, zeigte bereits ohne Ca²⁺-Zugabe eine deutlich erhöhte Adsorption (vgl. Abbildung 16A). Mit ansteigender Ca²⁺-Konzentration folgte eine weitere Zunahme der Schichtmenge.

Ergebnisse

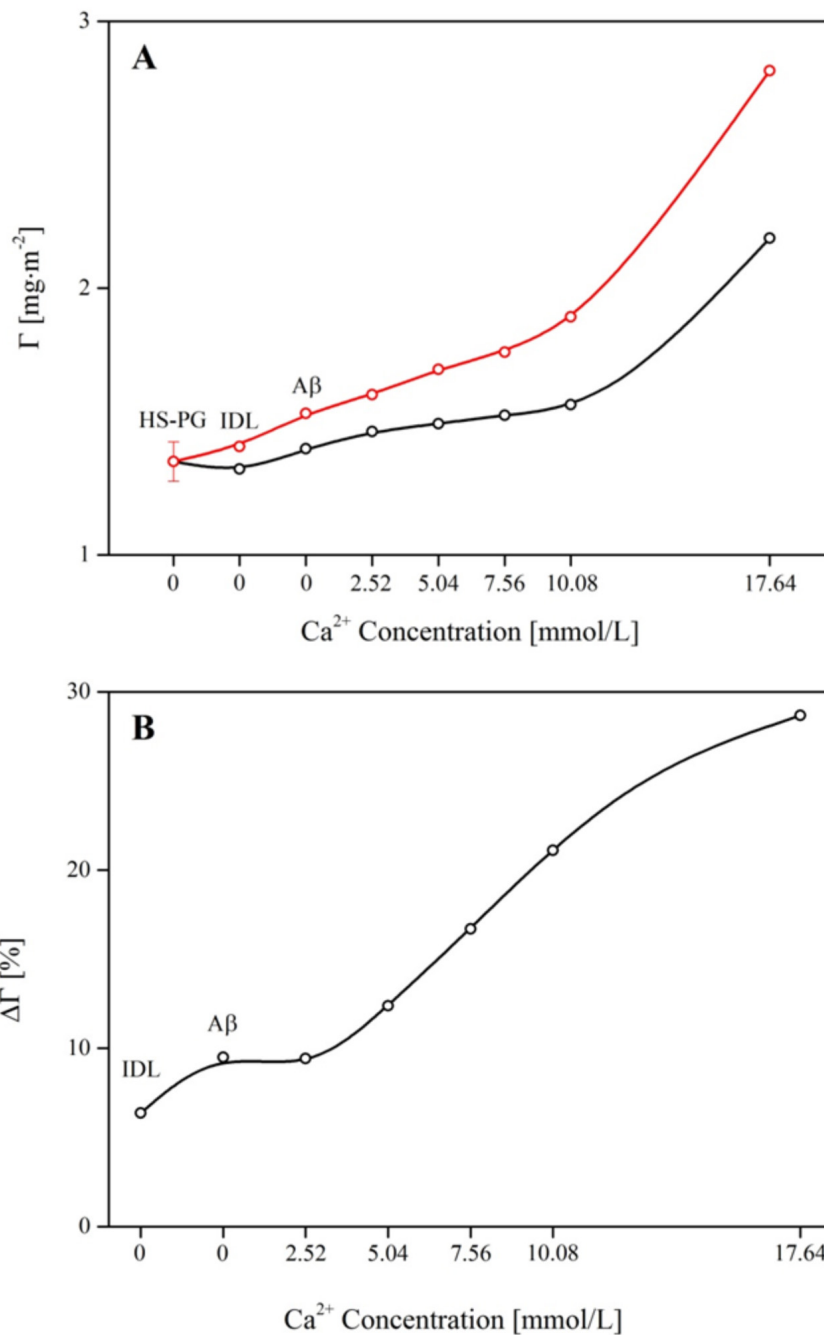


Abbildung 16. Auf HSPG-normierte Alzheimer-Nanoplaquebildung mit IDLapoE4/E4 und A β -42. (A) Adsorbierte Schichtmenge aus Abbildung 15 in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration der Krebslösung. Dargestellt ist der Kurvenverlauf ohne (\bullet) und mit (\circ) Glukosebehandlung. (B) Steigerung der Ca²⁺-induzierten Veränderung der Schichtmenge aus Abbildung 16 A. Der prozentuale Anstieg ist als Verhältnis zu den Kontrollwerten ohne Glukoseinkubation dargestellt.

4. Diskussion

Über subendotheliale Ablagerung und Modulation der flussabhängigen Gefäßdilatation beeinflussen Lipoproteine die physiologische Endothelfunktion. Bestimmte Lipoproteine tragen hierüber direkt und indirekt über die endotheliale Nanoplaqueformation zur Arterioskleroseentstehung bei. Verantwortlich sind teilweise die Rezeptorbindungsaktivitäten der Lipoproteine. Die Untersuchung möglicher pro-arteriosklerotischer Mechanismen, wie Interaktionen von IDL mit adrenergen Rezeptoren, Beeinflussung der intrazellulären Signalkaskaden, isoformspezifische endotheliale Dysfunktion und Nanoplaqueformation, sind Teil dieser Arbeit.

4.1. Beeinflussung der flussabhängigen Dilatation

4.1.1. Flussabhängige Wirkung von IDLapoE-Isoformen

IDL nimmt als LDL-Vorstufe eine Sonderstellung unter den Lipoproteinen mit einem vergleichsweise hohen Gehalt sowohl an Triacylglyceriden, als auch an Cholesterin- und Cholesterinestern ein [17,118]. Auch der Rezeptorbesatz bzw. der Gehalt an den Apolipoproteinen ApoB100 und ApoE bewirkt eine funktionelle Schlüsselposition zwischen VLDL und LDL [17]. Sowohl eine Hypertriglyceridämie, als auch eine Hypercholesterinämie konnten in Tiermodellen und klinischen Studien als inhibierende Faktoren für die flussabhängige Vasodilatation gezeigt werden [8,23,26,27,50,72]. Dies bildet eine initiale Ursache der endothelialen Dysfunktion und nachfolgend der Bildung arteriosklerotischer Insulte [9]. Neben LDL werden auch VLDL und VLDL-Remnants für eine solche herabgesetzte Vasomotion verantwortlich gemacht, während HDL eine Verbesserung der flussabhängigen Vasodilatation bewirken soll [33,67,89,97]. Bestätigende Ergebnisse für diese Hypothesen konnten bisher für HDL und VLDL im hier verwendeten Versuchsaufbau gezeigt werden [70,116]. IDL wurde in wenigen klinischen und experimentellen Studien als beeinträchtigender Vorhersagewert für die endothelabhängige, vasodilatatorische Antwort beschrieben [115,134]. Vielfach angewandte Methoden zur Beurteilung der Endothel-abhängigen Vasodilatation sind die Anwendung von Acetylcholin in Widerstandsgefäßen am Unterarm und die ultraschallgestützte, diskontinuierliche Messung der flussabhängigen Dilatation die eine induzierte Hyperämie an Brachialarterien begleitet [26]. Limitierend für diese Methoden sind die Diskontinuität der erhobenen Messwerte, sowie ihre Beeinflussung durch applizierte Substanzen. In den vorliegenden Versuchen wurde stattdessen die *in vitro* Messung der IDL-induzierten Veränderungen der flussabhängigen Vasodilatation an menschlichen Koronararterien vorgenommen. Dabei wurde auf eine chemische Induktion der Vasodilatation verzichtet. Die *in*

vitro Imitation eines physiologischen, flussabhängigen Gefäßtonus erfolgte durch eine passive, mechanische Vordehnung. Als Versuchslösung wurde IDL in physiologischer Konzentration angewandt. Vergleichbare Studien für VLDL wurden meist mit erhöhten Lipoproteinkonzentrationen durchgeführt [33,67,72].

Eine Superfusion mit IDL *pool* oder IDL in seinen Isoformen resultierte in einer Inhibition der flussabhängigen Vasodilatation der Koronararterien (vgl. Abbildung 2). Für IDL *pool* ergab sich ab einer mittleren Flussrate eine signifikante Verminderung der flussabhängigen Vasodilatation und Membranhyperpolarisation im Vergleich zu Superfusion mit Krebslösung. Bei der höchsten gemessenen Flussrate konnte eine leichte Vasokonstriktion und elektromechanisch gekoppelt, eine Membrandepolarisation festgestellt werden. Ähnliche Studien zeigten, dass eine solche verminderte flussabhängige Vasodilatation bei Superfusion mit Lipoproteinen hauptsächlich endothelabhängig, in geringerem Maße jedoch auch an deendothelialisierten Präparaten gemessen werden kann [116].

Die Klassifikation des IDL als „Triglycerid-reiches Lipoprotein Remnant“, wie sie in einigen Studien vorgenommen wird, weist auf die Bedeutung seines Anteils am Risikofaktor Hypertriglyceridämie hin [22,90,92,93]. Die vorliegenden Ergebnisse bekräftigen die Bedeutsamkeit erhöhter TAG-Level in der Entwicklung arteriosklerotischer Insulte, in diesem Fall über eine Verminderung der flussabhängigen Dilatation [22,88,115].

Die intrazellulären Signalkaskaden, die diesen Gefäßtonusmessungen zugrunde liegen, lassen sich anhand der ebenfalls gemessenen Konzentration zyklischer Nukleotide abschätzen. Im Vergleich zu den Kontrollpräparaten zeigte sich in den Koronarien mit IDL-Applikation eine signifikant verringerte cAMP- und cGMP-Konzentration (vgl. Tabelle 4). Die Messung der zyklischen Nukleotide erfolgte lediglich für die höchste Flussrate von 100 mL/min. Daher konnte keine flussabhängige Veränderung der Konzentration zyklischer Nukleotide bestimmt werden. Verringerte cGMP-Konzentrationen lassen auf eine verminderte NO-Freisetzung der eNOS schließen [87]. Mögliche Mechanismen sind die Bindung des Lipoproteins an den Flusssensor HSPG und weitere membranale Rezeptoren mit Beeinträchtigung der intrazellulären Signalkaskade [131]. Eine solche Bindung wurde bereits für LDL und VLDL nachgewiesen [124,125]. Wie zuvor beschrieben ist HSPG über eine Konformationsänderung für die Transduktion des *shear stress*-Reizes in eine intrazelluläre Signalkaskade verantwortlich [38,129]. Über eine durch IDL gehemmte intrazelluläre Wirkung der Signalübertragung des HSPG könnte eine intrazelluläre Aktivierung der eNOS verhindert werden. Die fehlende NO-Synthese führt letztlich zu einer Depolarisation und verminderten Relaxation der vaskulären

glatten Muskelzellen [16]. Weiterhin kann die Konzentrationsabnahme von NO langfristig pro-arteriosklerotische Prozesse auslösen [16]. So wird die NO-abhängige Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B aufgehoben, welcher die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und Chemokine reguliert [16]. Als Folge könnten die endotheliale Adhäsion arteriosklerotischer Lipoproteine und von Monozyten mit ihrer Immigration in die Gefäßwand begünstigt sein [16,31].

4.1.2. Flussabhängige Wirkungen der ApoE-Isoformen

Das Strukturprotein ApoE vermittelt die Bindung von Lipidpartikeln, IDL und weiteren Lipoproteinen an spezifische Zelloberflächenrezeptoren [75]. Mechanismen des Lipoproteinmetabolismus können durch ApoE-Mutationen oder einen generellen ApoE-Mangel gestört sein [52]. Letzterer wurde bisher in ApoE-Knockout-Mausmodellen untersucht. Zusätzlich stellt der Genotyp ApoE4 den bedeutsamsten genetischen Risikofaktor für die Entstehung einer AD dar [49,127]. Neben A β -abhängigen neuronalen Schädigungen wurde als Erklärung hierfür die Beeinträchtigung des cerebralen Blutflusses durch ApoE4 vorgeschlagen [30]. Bestätigend lässt sich mithilfe der vorliegenden Messungen *in vitro* eine Verminderung der flussabhängigen Vasodilatation durch ApoE4 feststellen.

Im Vergleich zur Superfusion mit Krebslösung oder IDL *pool* bewirkte die Applikation der Isoform IDLapoE4/E4 schon bei niedriger Flussgeschwindigkeit eine signifikante Verminderung der Vasodilatation (vgl. Abbildung 7). Dieses *in vitro* Ergebnis bestätigt die bisherige Studienlage, die eine Beeinträchtigung der flussabhängigen Vasodilatation durch ApoE4 vorschlägt [43,46]. Als Folge kann es zu pathologischen vaskulären Umbauprozessen kommen [127]. Diese tragen nach de la Torre et al. und Kelleher et al. sowohl zur Pathogenese der Arteriosklerose als auch der AD bei [30,60]. Cerebrovaskuläre Schädigungen, die im Rahmen einer AD auftreten, sind eine endotheliale Dysfunktion und ein herabgesetzter Blutfluss [60]. Diese könnten initial auf die hier gemessene, ApoE4-vermittelte, verminderte Vasodilatation zurückzuführen sein. Vorhergehende Studien zeigten ähnliche Messergebnisse des Gefäßtonus und des Membranpotentials für VLDLapoE4 im Vergleich zu VLDL *pool* [116].

Die Messung der Konzentration zyklischer Nukleotide bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse entsprechend einer chemomechanischen Kopplung. Die unter IDLapoE4 Inkubation verminderte flussabhängige Vasodilatation wurde von verringerten cAMP- und cGMP-Konzentrationen begleitet (vgl. Tabelle 5). Aufgrund dieser Nukleotidmessungen ließe sich ein Rückschluss auf eine verringerte endotheliale NO-Produktion bei Inkubation mit der Isoform

ApoE4 ziehen. Marcourakis et al. zeigten im Gegensatz hierzu eine durch ApoE4 erhöhte NOS-Aktivität in Thrombozyten [82]. Eine hierdurch vermehrte Bildung von NO kann die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) erhöhen und so in den cerebrovaskulären Blutfluss eingreifen [82]. An einer endothelialen Zellkultur wiesen Sacre et al. dagegen auf eine im Vergleich zu ApoE3 signifikant verminderte Stimulation der NOS durch ApoE4 und ApoE2 hin [114]. ApoE2 trug demnach zur Hälfte der NO-Freisetzung des ApoE3 bei, während ApoE4 keine signifikante NO-Erhöpfung gegenüber Kontrolllösung zeigte [114]. Als möglicher Mechanismus wurde die isoformabhängige ApoE-Bindung an ApoER2 deklariert. Die intrazelluläre Signalkaskade involviert hiernach PI3-Kinasen und letztlich die Aktivierung der eNOS [114]. Für die vorliegenden Messergebnisse lassen sich ähnliche Wirkmechanismen für ApoE4 diskutieren. Neben einer hemmenden Interaktion des IDLApoE4 mit endotheliale ApoER2 ist ebenso ein inhibierender Kontakt zu HSPG und weiteren membranständigen Rezeptoren möglich.

Im Vergleich zur Inkubation mit Krebs-, IDL *pool*- und IDLApoE4/E4-Lösungen ergab sich unter Superfusion mit IDLApoE0/E0 erstmals eine signifikante, starke Vasokonstriktion der Gefäßpräparate [127]. Die Lipidlösung konnte von einem der weltweit zwei genotypisierten Patienten mit inaktivem ApoE gewonnen werden [37]. Klinisch imponierte der ApoE-Mangel bei Erstuntersuchung in atypischer, generalisierter Xanthomatosis und Typ3-Hyperlipidämie (HLP3) mit erhöhtem Plasmacholesterinspiegel und erhöhten Triacylglyceridkonzentrationen [37]. In den vorliegenden Messungen zeigte sich zudem bereits nach kürzester Inkubationszeit bei einer Flussrate von 3 mL/min eine signifikant verminderte Vasodilatation im Vergleich zu IDL *pool* und Krebslösung. Nachfolgend ließ sich eine zunehmende Kontraktion bis zu einem annähernd horizontalen Kurvenverlauf ab einer Flussrate von 40 mL/min feststellen (vgl. Abbildung 8). Gemäß der chemomechanischen Kopplung zeigte sich eine signifikant verminderte Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP (vgl. Tabelle 5). Die Applikation eines synthetischen ApoE3 verhinderte die Vasokonstriktion bis zu einer Flussrate von 5 mL/min und einer Inkubationszeit von 30 Minuten (vgl. Abbildung 9) [127]. Daraufhin folgte jedoch ebenfalls eine Vasokonstriktion der Gefäßpräparate. Mögliche Mechanismen lassen sich anhand der zuvor beschriebenen ApoE3-induzierten, endothelialen NO-Freisetzung mutmaßen [114]. Eine defizitäre Bindung an membranständige Rezeptoren, die eine intrazelluläre NO-synthetisierende Signalkaskade auslösen, könnte für die verminderte Vasodilatation verantwortlich sein. Diese Defizienz kann durch Hinzugabe des synthetischen ApoE3 bis zu einer bestimmten Inkubationszeit und Flussrate ausgeglichen werden. Die

darauffolgende Vasokonstriktion lässt einen zusätzlichen, kontrahierenden Effekt des IDLapoE0/E0 vermuten. Möglicher Mechanismus könnte die Deposition des Lipoproteins trotz kontinuierlicher Strömung der Lipidlösung sein. Für VLDLapoE0/E0 zeigte sich bestätigend bereits bei alleiniger Gabe ein direkter Anstieg der Komplexbildung mit HSPG [80,127]. Dieser Effekt wurde durch die Applikation von A β -42 und Ca²⁺ zur Imitation einer Nanoplaquebildung unter ähnlichen Konditionen einer AD noch verstärkt [80]. Die Addition des synthetischen ApoE3 konnte auch hier die VLDLapoE0/E0 Effekte vermindern [80]. Zur weiteren Analyse dieses möglicherweise therapeutischen Ansatzes des ApoE3-Supplements sind umfassende Studien nötig.

Ein absoluter ApoE-Mangel wird im Knockout-Mausmodell ApoE^{-/-} zur Imitation der Arteriosklerose verwendet. Charakteristika sind ein erhöhter Plasmacholesterolspiegel, eine vermehrte arterielle Lipidablagerung sowie eine Stoffwechsellage ähnlich der HLP3 [37]. Hinsichtlich der endothelialen Dysfunktion wurden in diesem Mausmodell bisher kontroverse Ergebnisse erzielt [87]. Abhängig von Alter, Geschlecht und Diät zeigten sich unterschiedlich ausgeprägte arteriosklerotische Schädigungen mit nachfolgend verminderter oder unveränderter, endothelabhängiger und endothelunabhängiger Vasodilatation [87]. Unsere Messungen bestätigen eine Beeinträchtigung der flussabhängigen Vasodilatation durch IDLapoE0/E0. Limitierend lässt sich für dieses Ergebnis die geringe Versuchszahl (n=3) anführen, die auf die limitierte Probenentnahmemöglichkeit zurückzuführen ist.

4.1.3. Wirkung von IDL an den vaskulären Adrenorezeptoren

Vorhergehende Kontrollmessungen ergaben für Phentolamin und Propranolol keine signifikante Veränderung der flussabhängigen Vasoaktivität und der Konzentration zyklischer Nukleotide unter Superfusion mit Krebslösung [59,70,116]. Eine intrinsische Antagonisierung lässt sich demnach ausschließen.

Die Inhibition der flussabhängigen Dilatation von IDL *pool* wird durch Gabe von Phentolamin und Propranolol verstärkt. Eine gemeinsame Antagonisierung der α - und β -Adrenorezeptoren führte zu einer signifikanten Vasokonstriktion gegenüber Krebslösung, IDL und der einzelnen Gabe der Rezeptorblocker. Schon zu Beginn des Versuches, nach fünfminütiger Inkubationszeit mit IDL *pool* und beiden Adrenorezeptorblockern, zeigte sich ein signifikant erhöhter, basaler Vasotonus. Innerhalb der ersten zehn Minuten Inkubation mit IDL *pool*, Phentolamin und Propranolol erfolgte allerdings eine kurzfristige Vasodilatation der Gefäßpräparate. Dies ist möglicherweise, wie schon zuvor in ähnlichen Messungen aufgetreten, auf eine verspätete Diffusion des Soluten an die vaskulären glatten Muskelzellen zurückzuführen [70]. Entsprechend

der elektromechanischen Kopplung zeigte sich zunächst eine verringerte Hyperpolarisation, die analog zum Anstieg der Gefäßtonuswerte in eine Depolarisation umschlug (vgl. Abbildung 5). Dieses Ergebnis ließ sich durch die signifikant verringerten Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP bestätigen.

Die Einzelgabe von Phentolamin, dem Antagonisten der α -AR, ergab ebenfalls eine verringerte flussabhängige Vasodilatation. Analog hierzu verhielt sich die Membranpotentialänderung mit einer verringerten Hyperpolarisation (vgl. Abbildung 3). Die Applikation von Propranolol zur IDL *pool*-Lösung zeigte ebenfalls eine signifikant verringerte flussabhängige Vasodilatation im Vergleich zur Krebslösung (vgl. Abbildung 4). Die Vasomechanik und die Membranpotentiale ähnelten sehr stark den Ergebnissen bei Gabe von Phentolamin. Die cAMP- und cGMP-Konzentrationen unterschieden sich für die mit Phentolamin oder Propranolol inkubierten Präparate kaum (vgl. Tabelle 4). Gegenüber den Gefäßpräparaten der Kontrolllösung zeigte sich für die höchste Flussrate ein annähernd additiver Effekt bei gleichzeitiger Anwendung von Phentolamin und Propranolol in der IDL *pool*-Lösung.

4.1.4. Möglicher vaskulärer Wirkmechanismus

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich eine Wirkung von IDL *pool* über eine Interaktion mit den vaskulären AR vermuten. Ein solches Zusammenspiel resultiert den Messungen zufolge in einer Änderung des Gefäßtonus, Membranpotentials und der Konzentration der zyklischen Nukleotide. Es lässt sich eine basal verminderte, flussabhängige Vasodilatation für IDL *pool* festhalten. Über die vaskuläre Regulation durch die Adrenorezeptoren scheint diese endotheliale Dysfunktion teilweise herabgesetzt. Die Antagonisierung der α - und β -AR durch gleichzeitige Applikation von IDL *pool* mit Phentolamin und Propranolol führte dementsprechend zu einer übermäßigen Vasokonstriktion. Bei isolierter Hinzugabe von IDL *pool* mit Phentolamin oder Propranolol war die flussabhängige Vasodilatation weit weniger, jedoch noch immer signifikant eingeschränkt. Möglich wäre eine Induktion der intrazellulären NO-Synthese über die Interaktion des IDL *pool* mit den endothelialen β -Rezeptoren. Diese Hypothese wird durch die verminderten cAMP-Werte, begleitet von einer Vasokonstriktion bei Antagonisierung der β -Rezeptoren bekräftigt (vgl. Tabelle 4). Daraufhin könnte, gemäß zuvor beschriebener Signaltransduktion, über den Signaltransduktor NO eine Hyperpolarisation mit sich anschließender Vasodilatation folgen.

Neben der bisher beschriebenen vasokonstriktorischen Wirkung der α -AR wurde für endothelial lokalisierte α_2 -Adrenorezeptoren im Mausmodell eine vasodilatierende Wirkung gezeigt [119]. Phentolamin als unspezifischer α -AR-Antagonist könnte die Interaktion von IDL *pool* am α_2 -AR

inhibieren und so eine Vasodilatation blockieren. Allerdings stehen entsprechende Ergebnisse für die Signaltransduktion von humanen α_2 -Adrenorezeptoren noch aus. Der weniger endothelial sondern vielmehr auf glatten Muskelzellen zu findende, vasokonstriktorisch wirksame α_1 -AR könnte hingegen über Interaktionen mit IDL *pool* inhibiert werden.

Unklar bleiben bei diesen *in vitro* gewonnenen Ergebnissen Interaktionen des IDL *pool* mit weiteren vasoaktiven Substanzen, wie z.B. anderen Lipoproteinen.

4.2. Effekt von Glukose auf die Nanoplaqueformation

Epidemiologisch wurde eine Korrelation zwischen IDL und klinisch manifesten, arteriosklerotischen Erkrankungen, wie Koronargefäßerkrankungen und ihrer Progression, gefunden [48,64,84,108,139]. Auch in Tier-Modellen, den St. Thomas- und Watanabe-Heritable Hyperlipidemia-Kaninchen, stellte sich IDL als Prädiktor für das Ausmaß arteriosklerotischer Insulte dar [98,99]. Die molekularen Hintergründe für die atherogene Wirkung des IDL sind im Vergleich zum Forschungsstand bei anderen Lipoproteinklassen, nicht hinreichend untersucht [4]. Besonders bei hohem Calcium-Spiegel besitzt IDL, neben LDL und VLDL, ein erhöhtes arteriosklerotisches Potential [1,122].

Im vorliegenden Biosensormodell wurde die initiale ternäre Aggregationsbildung von genotypisiertem IDLapoE3 mit HSPG und Ca^{2+} untersucht (vgl. Abbildung 11). Vorangegangene Messungen der sogenannten arteriosklerotischen Nanoplaquebildung bei IDL *pool*-Inkubation konnten bestätigt werden [122]. HSPG lagert sich mit seiner transmembranalen hydrophoben Domäne auf einer methylierten Silikatoberfläche ab [17,122]. Pro Disaccharideinheit finden sich eine bis vier Sulfatgruppen in den GAG-Seitenketten des HSPG [17,127]. Diese negative Fixladung besitzt eine große Kapazität zur spezifischen Bindung positiver Gegenionen wie Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen [17,127]. Dies bildet die Grundlage für eine Interaktion des Proteoglykans mit positiven Ladungen und positiven Aminosäureresten von Lipoproteinen [122]. Nachdem die HSPG-Adsorption, typischerweise bei $1,2 \text{ mg/m}^2$, ihre Sättigung erreicht hatte, wurde IDL appliziert. Die alleinige Hinzugabe von IDLapoE3 resultierte, ähnlich wie in vorhergehenden Versuchen beobachtet, in einer Nanoplaquebildung [125]. Die Ca^{2+} -getriebene Zunahme der Nanoplaquebildung, wie sie bisher gezeigt werden konnte, wurde in den vorliegenden Messungen bestätigt [81]. Allerdings wurde ab einer Ca^{2+} -konzentration von $17,64 \text{ mmol/L}$ eine stärkere, ternäre Aggregatbildung beobachtet.

Diskussion

Diabetes mellitus mit seinem klinischen Symptom, der Hyperglykämie bildet einen unabhängigen Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer Arteriosklerose [11]. Vermutete Mechanismen, die diesem zugrunde liegen, sind vaskuläre Schäden durch eine verminderte Insulinwirkung und Hyperglykämie [105]. Letzere induziert möglicherweise über oxidativen Stress eine vermehrte Lipidaufnahme in vaskuläre Makrophagen [105,106,150]. Die membranständigen Lipoproteinrezeptoren der Makrophagen können zudem direkt durch Glukose induziert werden [106]. Eine Glykierung der Extrazellulärmatrix und Beeinflussung aller Zelltypen der Gefäßwände führen letztlich zu einer endothelialen Dysfunktion [106].

Mit den vorliegenden Messungen konnte stark vereinfacht der Einfluss von Glukose auf die arteriosklerotische Wirkung des IDL gezeigt werden. Ohne enzymatische Aktivität wurde IDL für 24 Stunden durch Inkubation in 300 mg/dL Glukoselösung glykiert. Diese Stimulation resultierte in einer starken Induktion der Nanoplaqueformation [127]. Die Anlagerung des IDL an das ternäre Aggregat scheint durch die Glykierung verändert. Die leichte Abnahme der IDLapoE3-Ablagerung ohne vorherige Glukosebehandlung wurde aufgehoben. Stattdessen zeigte sich eine Ca^{2+} -gesteuerte Zunahme der IDLapoE3-Adsorption. Mögliche Mechanismen der Schädigung durch Hyperglykämie sind bisher für LDL beschrieben [150]. Obwohl die Lipoproteinoxidation in den vorliegenden Messungen durch kontinuierliche Infusion eines N_2/CO_2 -Gemisches verhindert wurde, sollte der zugrunde liegende Pathomechanismus bei der Beurteilung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden. Unter Sauerstoffpräsenz kann eine Autooxidation der Glukose stattfinden. Die in diesem Prozess entstehenden ROS, wie Hydroxylradikale und Superoxidanionen, können nachgewiesen eine LDL-Oxidation hervorrufen. Die Aufnahme des oxidierten LDL (oxLDL) führt zu einer endothelialen Cholesterolablagerung mit Bildung arteriosklerotischer Insulte [56]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte die pro-arteriosklerotische Wirkung des IDL unter Glukoseinkubation bewirken. So wurde in Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie das Vorkommen von Cholesterylester-Hydroperoxiden in IDL-Partikeln bestätigt [121]. Diese sind neben Lipid-Hydroperoxiden als Reaktionsprodukte der Lipoproteinoxidation, vor allem des oxLDL, und in arteriosklerotischen Läsionen charakterisiert worden [121].

Bisher bekannter vaskulärer Schädigungsmechanismus durch ständige Hyperglykämie-Exposition ist außerdem eine beeinträchtigte NO-Bioverfügbarkeit [105]. NO wird durch akkumulierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) inaktiviert und zu reaktivem Peroxynitrit (ONOO^\cdot) umgewandelt, welches weitere Proteine nitrosyliert [105]. Wie zuvor beschrieben, ist NO wichtigster Bestandteil der Vasoreagibilität. Auf seine Inaktivierung, Risikofaktor für ein schlechteres kardiovaskuläres Outcome, folgt eine endotheliale Dysfunktion

[105]. Auch die in dieser Studie untersuchte flussabhängige Vasodilatation kann durch eine Exposition der Gefäßpräparate gegenüber einer Hyperglykämie beeinträchtigt sein. Zusätzlich scheint durch eine Hyperglykämie, im Rahmen eines „vaskulären Gedächtnisses“, eine pro-arteriosklerotische Beeinflussung der HSPG-Expression und eine vermehrte mitochondriale ROS-Akkumulation ausgelöst zu werden [74,105,127].

Die Applikation von genotypisiertem IDLapoE4/E4 führte bereits ohne vorherige Glukoseinkubation zu einer verstärkten Lipoproteinadsorption. Bei Inkubation beider IDLapoE-Isoformen zeigte sich insgesamt ein ähnlicher Adsorptionsverlauf. Allerdings ließ sich in der Messung der Nanoplaquebildung für IDLapoE4/E4 früher ein Ca^{2+} -abhängiger Adsorptionsanstieg, bereits ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 7,56 mmol/L, feststellen. Aus der Aminosäuresequenz der Isoform ApoE4 resultiert eine veränderte Rezeptorbindungsaffinität [76]. Diese ist möglicherweise Grund für die Erhöhung der Ca^{2+} -abhängigen Adsorption der Lipoproteinpartikel. Der Isoform ApoE3 wird im Lipoproteinmetabolismus allgemein eine protektive Rolle gegenüber Arteriosklerose zugeschrieben [29,75,78]. Diese wird unter anderem auf ihre Wirkung als Antioxidans zurückgeführt [29]. Protektive Aspekte scheinen durch die genetische Variation der Isoform ApoE4 aufgehoben zu sein. Zusätzlich verstärkt die Glukosebehandlung der Lipoproteine in den vorliegenden Messungen die Plaqueformation bei Anwendung der Isoform IDLapoE4/E4 [127].

4.2.1. Bedeutung von IDL für die Alzheimer Nanoplaqueformation

Vaskuläre Risikofaktoren, wie Hypertonie, Arteriosklerose und T2DM sind vorgeschlagene Störfaktoren des physiologischen cerebralen Blutflusses [20,30,146]. Durch sie hervorgerufene Endothelzellschäden in den cerebralen Gefäßabschnitten beeinträchtigen die Substratversorgung des Gehirns und können die Signaltransduktion zwischen Astrozyten und Neuronen vermindern [30]. Außerdem könnte die beeinträchtigte junktionale Barrierefunktion des Endothelzellverbandes den Influx und die Ablagerung von $\text{A}\beta$ in das ZNS ermöglichen [30]. Hierdurch wird invers die vaskuläre Dysfunktion in gehirnversorgenden Gefäßen getriggert. Die Addition einer vierten Komponente, des $\text{A}\beta$, zum oben beschriebenen Modell der arteriosklerotischen Nanoplaquebildung, ergibt eine stark vereinfachte Imitation cerebrovaskulärer Dysregulation. Die Schlüsselkomponenten Lipoproteine, HSPG, Calcium und $\text{A}\beta$ -42 sind in der Plaque-Genese der AD-Entstehung präsent [127]. $\text{A}\beta$ zeigt keine eigene Adsorption an die HSPG-beschichtete Oberfläche, sondern induziert die Ca^{2+} -gesteuerte Adsorption der Lipoproteine [81].

Neben LDLapoE4/E4 zeigte auch IDLapoE4/E4 in vorangegangenen Studien eine vermehrte, Ca^{2+} -getriebene Deposition auf methylierter Silikatoberfläche [80]. ApoE4 als genetischer Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer AD führte zu einer vermehrten Nanoplaqueformation, vor allem bei zusätzlicher Applikation von A β -42 [80]. Die Addition von löslichem A β -42 zum beschriebenen Biosensormodell befördert auch in den vorliegenden Messungen die Nanoplaquebildung unter IDLapoE4/E4-Inkubation [127]. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Applikation von homozygotem VLDLapoE4/E4 [116]. Das untersuchte System stellt eine stark vereinfachte Form der komplexen Hintergründe der cerebrovaskulären Dysregulation dar. Es gibt jedoch Aufschluss über die initialen, oberflächenabhängigen Interaktionen der typischen Komponenten bei der Nanoplaquebildung. In diesem begrenzten Rahmen scheinen die untersuchten Akteure A β , IDL als beispielhaftes Lipoprotein und ApoE4 den klinischen Betrachtungen gerecht zu werden. Weiterhin erfolgte die Anwendung des Biosensormodells auf die klinische Situation der Hyperglykämie bei Diabetes mellitus. Die Zugabe der vorbehandelten, glykierten IDLapoE4-Partikel resultierte in einem weiteren Anstieg der Nanoplaqueformation. Diese erfolgte Ca^{2+} -gesteuert und überstieg bereits bei physiologischen Calciumkonzentrationen die Adsorption des nicht glykierten IDLapoE4/E4 [127]. Trotz der starken Vereinfachung bestätigt auch dieses Ergebnis die aktuelle Studienlage zum Risikofaktor Diabetes mellitus für die Entstehung einer AD.

4.3. Eigenschaften des Studiendesigns

Als sicherlich größte Limitation der vorliegenden Studie lässt sich die geringe Probandenzahl nennen. Diese ist, neben der zeitlichen Begrenzung dieser Studie auf die aktuell sinkende Rate an Herztransplantationen in Deutschland zurückzuführen [35].

Unterschiedliche Eigenschaften innerhalb des Patientenkollektivs, vor allem die Vormedikation und koronare Diagnosen, beeinflussen möglicherweise als Störfaktoren die Verwertbarkeit der erhobenen Ergebnisse. Aufgrund der geringen Probandenzahl lassen sich die Studienergebnisse jedoch nicht anhand dieser Eigenschaften, des Alters und des Geschlechts weiter analysieren. Ein jüngeres Alter der Transplantationspatienten ergab in vorangegangenen Studien einen geringeren vaskulären Grundtonus [59]. Auch der Einfluss des Geschlechts wirkt sich über endotheliale Faktoren, wie eine verringerte endothelabhängige Dilatation bei männlichen Probanden, auf den Gefäßtonus aus [21]. Allerdings konnte in vorhergehenden Studien gezeigt werden, dass die Vasoaktivität der untersuchten Koronarpräparate nicht signifikant von der Prämedikation des jeweiligen Transplantationspatienten abhängt [59]. Zusätzlich erfolgte eine

Äquibrierung der Koronarpräparate. Hierdurch wurde das Risiko möglicher anhaftender, vasoaktiver Substanzen, wie von Katecholaminen, verringert. Vorteil des gewählten Studienkollektivs gegenüber ähnlichen Studien ist die Verwendung von Koronarpräparaten des Menschen. In Tiermodellen zeigte sich ein im Vergleich zur humanen Verteilung der Adrenorezeptoren vielfach differenter Rezeptorbesatz [116,138].

In dieser Studie wurden pathologisch veränderte Gefäßabschnitte lediglich mittels makroskopischer Beurteilung ausgeschlossen. Diese sind häufig durch arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen charakterisiert und dementsprechend in ihrer Vasoaktivität, ihrem Adrenorezeptorbesatz und ihren sekundären Signalmechanismen beeinträchtigt. Etwaige nicht detektierte mikroskopische Läsionen könnten die Messungen beeinträchtigt haben.

4.4. Bedeutung von IDL für die klinische Verwendung

Die individuelle IDL-Plasmakonzentration scheint hauptsächlich durch eine genetisch bedingte Komponente bestimmt zu sein [118]. Eine Senkung des in der vorliegenden Arbeit als por-arteriosklerotisch deklarierten IDL durch Ernährung und regelmäßige körperliche Aktivität ist nur in geringem Maße möglich [118].

Therapeutische Ansätze für eine erhöhte Plasmakonzentration des IDL sind bisher nur wenig erforscht. Allerdings werden bereits einige IDL-beeinflussende Behandlungsoptionen für andere arteriosklerotische Erkrankungen eingesetzt. So können Statine, neben ihren vielfachen pleiotropen Effekten, die Konzentration von IDL in messbarem Ausmaß senken [118,136]. Weiterhin zeigten sich effektiv verminderte Triacylglyceridlevel nach täglicher Einnahme von Nikotinsäure. Eine entsprechende Wirkung auf den Plasmaspiegel des IDL wird für die gemeinsame Gabe von Nikotinsäure und Statinen vermutet. Zusätzlich können Fibrate die IDL-Konzentration senken [131].

Besonders die diagnostische Erfassung des IDL in Risikofällen, wie Patienten mit T2DM, gewinnt vor diesem Hintergrund an Bedeutung. So könnte aus einer entsprechenden Behandlung mit den bisher bekannten therapeutischen Möglichkeiten eine Senkung des Risikos für CVD resultieren.

4.5. Bewertung des Gesamtmodells

Die Applikation von IDL an humanen Koronararterien resultierte in einer verringerten flussabhängigen Vasodilatation. Eine elektromechanische Kopplung dieses Ergebnisses konnte durch eine analog verminderte Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen verifiziert werden. Zudem deuten die veränderten Konzentrationen der intrazellulären, zyklischen

Diskussion

Nukleotide auf eine chemomechanische Kopplung der endothelialen IDL-Wirkung hin. Die hier diskutierten Mechanismen gehen größtenteils von einer rezeptorvermittelten Reaktion der Gefäßwand auf die Lipoproteinlösung aus. Die zusätzlich untersuchte Adsorption von IDL an HSPG bestätigt eine oberflächenabhängige Interaktion. Eine gravierende Beeinflussung des endothelialen IDL-Kontaktes erfolgte durch verschiedene ApoE-Isoformen, A β -42 und eine Glykierung der interagierenden Komponenten. Trotz der vereinfachten Darstellung der komplexen pathophysiologischen Vorgänge, lässt sich anhand der Ergebnisse ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen einer Hyperglykämie, dem Vorkommen bestimmter Apolipoprotein-Isoformen des IDL und der endothelialen Ablagerung des Lipoproteins vorschlagen. Weiterhin vermindert IDL, getriggert durch eine adrenerge Blockade, die flussabhängige Vasoaktivität und trägt hierdurch möglicherweise zu einer endothelialen Dysfunktion bei.

5. Literaturverzeichnis

1. Abletshaus C, Klussendorf D, Schmidt A, Winkler K, Marz W, Buddecke E, Malmsten M, Siegel G. Biosensing of arteriosclerotic nanoplaque formation and interaction with an HMG-CoA reductase inhibitor. *Acta physiologica Scandinavica* 2002;176:131-45.
2. Al-Haideri M, Goldberg IJ, Galeano NF, Gleeson A, Vogel T, Gorecki M, Sturley SL, Deckelbaum RJ. Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E-triglyceride-rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry* 1997;36:12766-72.
3. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995;25:155-61.
4. Anber V, Millar JS, McConnell M, Shepherd J, Packard CJ. Interaction of very-low-density, intermediate-density, and low-density lipoproteins with human arterial wall proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2507-14.
5. Anderson KM, Odell PM, Wilson PW, Kannel WB. Cardiovascular disease risk profiles. *Am Heart J* 1991;121:293-8.
6. Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2009;73:1983-92.
7. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J* 1988;116:1713-24.
8. Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11:2-14.
9. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998;81:7b-12b.
10. Azzam RMA, Bashara NM. *Ellipsometry and Polarized Light*. Amsterdam; New York: North-Holland Elsevier Science Pub. Co; 1989.
11. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *Eur Heart J* 2013;34:2444-52.
12. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L, Held A, Maxam G, Seidler L, Häcker B, Jarosch B. *Biosynthese der Membranlipide und Steroide*. Stryer Biochemie: Springer Berlin Heidelberg; 2013.

Literaturverzeichnis

13. Berger JS, McGinn AP, Howard BV, Kuller L, Manson JE, Otvos J, Curb JD, Eaton CB, Kaplan RC, Lynch JK, Rosenbaum DM, Wassertheil-Smoller S. Lipid and lipoprotein biomarkers and the risk of ischemic stroke in postmenopausal women. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2012;43:958-66.
14. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002;43:1363-79.
15. Bowry AD, Lewey J, Dugani SB, Choudhry NK. The Burden of Cardiovascular Disease in Low- and Middle-Income Countries: Epidemiology and Management. *The Canadian journal of cardiology* 2015;31:1151-9.
16. Brandes R., Busse R. Kreislauf. In: Schmidt R., Lang F., Heckmann M., eds. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31st ed. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2010:572-628.
17. Brix J, Koch ,HG., Heinrich ,P Regulation der Transkription - Aktivierung und Inaktivierung der Genexpression. In: Heinrich P., Müller M., Graeve L., eds. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*;. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer- Lehrbuch; 2014:598.
18. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2013. Deutsches Statistisches Bundesamt, 2015. (Accessed July 6th, 2015, at https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursache_n2120400137004.pdf?__blob=publicationFile.)
19. Busse R, Trogisch G, Bassenge E. The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic research in cardiology* 1985;80:475-90.
20. Carlsson CM. Type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 2010;20:711-22.
21. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *Journal of the American College of Cardiology* 1994;24:471-6.
22. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozoglul, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011;32:1345-61.
23. Cohen RA, Zitnay KM, Haudenschild CC, Cunningham LD. Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circulation research* 1988;63:903-10.

Literaturverzeichnis

24. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, NY)* 1993;261:921-3.
25. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989;80:458-65.
26. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990;86:228-34.
27. Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol* 2000;86:943-9.
28. Davidson MH. Apolipoprotein measurements: is more widespread use clinically indicated? *Clinical cardiology* 2009;32:482-6.
29. Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 1999;286:115-43.
30. de la Torre JC. Cerebral hemodynamics and vascular risk factors: setting the stage for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2012;32:553-67.
31. Deussen A. Herzstoffwechsel und Koronardurchblutung. In: Schmidt R., Lang F., Heckmann M, eds. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* 31st ed. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2010 565-71.
32. Di Scala C, Chahinian H, Yahi N, Garmy N, Fantini J. Interaction of Alzheimer's beta-amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation. *Biochemistry* 2014;53:4489-502.
33. Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, Nakano T, Nakajima K, Yasue H. Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis* 1998;137:341-9.
34. Ehmke H. Das Kreislaufsystem. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, eds. *Physiologie*. 7 ed: Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Delhi, Rio; 2014.
35. Eurotransplant Annual Report 2014. Eurotransplant. (Accessed July 6th 2015, at http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2014.pdf)
36. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

37. Feussner G, Dobmeyer J, Grone HJ, Lohmer S, Wohlfeil S. A 10-bp deletion in the apolipoprotein epsilon gene causing apolipoprotein E deficiency and severe type III hyperlipoproteinemia. *American journal of human genetics* 1996;58:281-91.
38. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation research* 2003;93:e136-42.
39. Fogelstrand P, Boren J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2012;22:1-7.
40. Gabelli C, Gregg RE, Zech LA, Manzato E, Brewer HB. Abnormal low density lipoprotein metabolism in apolipoprotein E deficiency. *J Lipid Res* 1986;27:326-33.
41. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 1998;27:503-19.
42. Gotto AM, Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998;82:22q-5q.
43. Guangda X, Yuhua W. Apolipoprotein e4 allele and endothelium-dependent arterial dilation in Type 2 diabetes mellitus without angiopathy. *Diabetologia* 2003;46:514-9.
44. Gulbins E., Lang F. Signaltransduktion. In: Schmidt R., Lang F., Heckmann M., eds. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31st ed. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2010:24-35.
45. Haas C, Cazorla P, Miguel CD, Valdivieso F, Vazquez J. Apolipoprotein E forms stable complexes with recombinant Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein. *The Biochemical journal* 1997;325 (Pt 1):169-75.
46. Haraki T, Takegoshi T, Kitoh C, Wakasugi T, Saga T, Hirai JI, Aoyama T, Inazu A, Mabuchi H. Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilation in asymptomatic Japanese male subjects amongst apolipoprotein E phenotypes. *J Intern Med* 2002;252:114-20.
47. Harke M, Teppner R, Schulz O, Motschmann H, Orendi H. Description of a single modular optical setup for ellipsometry, surface plasmons, waveguide modes, and their corresponding imaging techniques including Brewster angle microscopy. *Review of Scientific Instruments* 1997;68:3130-4.
48. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Liu C, Selzer RH, Krauss RM. Intermediate-density lipoproteins and progression of carotid arterial wall intima-media thickness. *Circulation* 1997;95:2022-6.
49. 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;349:151-4.

50. Holzmann S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *Journal of cyclic nucleotide research* 1982;8:409-19.
51. Huang Y. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in molecular medicine* 2010;16:287-94.
52. Huang Y. Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Current opinion in lipidology* 2010;21:337-45.
53. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of disease* 2014;72 Pt A:3-12.
54. Huang Y, Rall SC, Jr., Mahley RW. Genetic factors precipitating type III hyperlipoproteinemia in hypolipidemic transgenic mice expressing human apolipoprotein E2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2817-24.
55. Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2004;23:189-204.
56. Itabe H, Obama T, Kato R. The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis. *Journal of lipids* 2011;2011:418313.
57. Ito K, Yoshida H, Yanai H, Kurosawa H, Sato R, Manita D, Hirowatari Y, Tada N. Relevance of intermediate-density lipoprotein cholesterol to Framingham risk score of coronary heart disease in middle-aged men with increased non-HDL cholesterol. *Int J Cardiol* 2013;168:3853-8.
58. Jänig W. Vegetatives Nervensystem. In: Schmidt R., Lang F., Heckmann M, eds. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31st ed. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2010:403-34.
59. Jumar A. Die Wirkung von Katecholaminen auf die Koronararterien des Menschen: Diss. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2012.
60. Kelleher RJ, Soiza RL. Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder? *American journal of cardiovascular disease* 2013;3:197-226.
61. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009;63:287-303.
62. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American journal of physiology Renal physiology* 2003;285:F178-90.

63. Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998;81:13B-7B.
64. Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 1987;113:578-82.
65. Krauss RM, Lindgren FT, Williams PT, Kelsey SF, Brensike J, Vranizan K, Detre KM, Levy RI. Intermediate-density lipoproteins and progression of coronary artery disease in hypercholesterolaemic men. *Lancet* 1987;2:62-6.
66. Krohn S. Zur Wirkung vaskulärer Adrenorezeptoren in der High-Density-Lipoprotein-induzierten Relaxation menschlicher Koronararterien: Diss. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2016.
67. Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, Soejima H, Misumi K, Kawano H, Nakagawa O, Yoshimura M, Ogawa H, Matsumura T, Sugiyama S, Nakano T, Nakajima K, Yasue H. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 1998;97:2519-26.
68. Kuipers F, Jong MC, Lin Y, Eck M, Havinga R, Bloks V, Verkade HJ, Hofker MH, Moshage H, Berkel TJ, Vonk RJ, Havekes LM. Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes. *J Clin Invest* 1997;100:2915-22.
69. Kuo L, Davis MJ, Cannon MS, Chilian WM. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium-dependent responses by L-arginine. *Circulation research* 1992;70:465-76.
70. Lendner J. Die Interaktion von VLDL mit adrenergen Rezeptoren bei der flussabhängigen Dilatation an Koronararterien des Menschen: Diss. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2015.
71. Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology* 2012;122:55-68.
72. Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP. Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine is impaired in hypertriglyceridemic humans with normal levels of plasma LDL cholesterol. *Journal of the American College of Cardiology* 1999;33:805-12.
73. Löffler G. Lipoproteine - Transportformen der Lipide im Blut. In: Heinrich P., Müller M., Graeve L., eds. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* Springer, Berlin, Heidelberg; Springer- Lehrbuch; 2014:300- 7.
74. Madonna R, De Caterina R. Potential roles of vessel wall heparan sulfate proteoglycans in atherosclerosis. *Vascular pharmacology* 2014;60:49-51.

Literaturverzeichnis

75. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, NY)* 1988;240:622-30.
76. Mahley RW. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Israel journal of medical sciences* 1996;32:414-29.
77. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Lipoproteins of special significance in atherosclerosis. Insights provided by studies of type III hyperlipoproteinemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1985;454:209-21.
78. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-37.
79. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S183-8.
80. Malmsten M, Kassner U, Winkler K, Schmidt A, Buddecke E, Saunders R, Siegel G. An ellipsometry-based Alzheimer plaque mimic: Effect of beta-amyloid, lipoprotein identity and apolipoprotein E isoform. *Journal of colloid and interface science* 2004;276:503-6.
81. Malmsten M, Siegel G, Wood WG. Ellipsometry Studies of Lipoprotein Adsorption. *Journal of colloid and interface science* 2000;224:338-46.
82. Marcourakis T, Bahia VS, Kawamoto EM, Munhoz CD, Gorjao R, Artes R, Kok F, Caramelli P, Nitrini R, Curi R, Scavone C. Apolipoprotein E genotype is related to nitric oxide production in platelets. *Cell biochemistry and function* 2008;26:852-8.
83. Mendivil CO, Rimm EB, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein E in VLDL and LDL With Apolipoprotein C - III is Associated With a Lower Risk of Coronary Heart Disease. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 2013;2:e000130.
84. Meyer BJ, Caslake MJ, McConnell MM, Packard CJ. Two subpopulations of intermediate density lipoprotein and their relationship to plasma triglyceride and cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2000;153:355-62.
85. Meyer BJ, Duvillard L, Owen A, Packard CJ, Caslake MJ. Fractionation of cholesteryl ester rich intermediate density lipoprotein subpopulations by chondroitin sulphate. *Atherosclerosis* 2007;195:e28-34.
86. Meyer-Rath KG. Der Einfluß von endothelständigen Proteoglycanen und subendothelialer Matrix auf die flußabhängige Gefäßmodulation isolierter gesunder und arteriosklerotischer Koronararterien des Menschen Diss. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2006.

87. Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in health and disease* 2011;10:211.
88. Miller M, Cannon CP, Murphy SA, Qin J, Ray KK, Braunwald E. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2008;51:724-30.
89. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research* 2006;98:1352-64.
90. Murano T, Kiuchi M, Moteki M, Miyashita Y, Watanabe H, Hiruta N, Shirai K. [Remnant lipoprotein cholesterol level measured by homogeneous assay reflects the quantity of intermediate-density lipoprotein]. *Rinsho byori The Japanese journal of clinical pathology* 2008;56:367-72.
91. Musliner TA, Giotas C, Krauss RM. Presence of multiple subpopulations of lipoproteins of intermediate density in normal subjects. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1986;6:79-87.
92. Myant NB. *Cholesterol Metabolism, LDL, and the LDL Receptor*. San Diego, California 92101: Academic Press, Inc. ; 1990.
93. Myant NB. Cholesterol transport through the plasma. *Clinical science (London, England : 1979)* 1982;62:261-71.
94. Nestel PJ, Fidge NH, Tan MH. Increased lipoprotein-remnant formation in chronic renal failure. *N Engl J Med* 1982;307:329-33.
95. Nichols M TN, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M. *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*. European Heart Network AISBL, Brussels, & European Society of Cardiology, Sophia Antipolis; 2012.
96. Niemi J, Makinen VP, Heikkonen J, Tenkanen L, Hiltunen Y, Hannuksela ML, Jauhiainen M, Forsblom C, Taskinen MR, Kesaniemi YA, Savolainen MJ, Kaski K, Groop PH, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Estimation of VLDL, IDL, LDL, HDL2, apoA-I, and apoB from the Friedewald inputs--apoB and IDL, but not LDL, are associated with mortality in type 1 diabetes. *Annals of medicine* 2009;41:451-61.
97. Nofer JR, van der Giet M, Tolle 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;113:569-81.
98. Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Mortensen A, Fischer Hansen B, Fischer Hansen J, Ibsen P, Kjeldsen K. Intermediate density lipoprotein cholesterol as the best lipoprotein predictor of atherosclerosis severity in the Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis* 1997;132:119-22.

99. Nordestgaard BG, Lewis B. Intermediate density lipoprotein levels are strong predictors of the extent of aortic atherosclerosis in the St. Thomas's Hospital rabbit strain. *Atherosclerosis* 1991;87:39-46.
100. Nordestgaard BG, Nielsen LB. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Current opinion in lipidology* 1994;5:252-7.
101. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Lewis B. Influx in vivo of low density, intermediate density, and very low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentrations, extent of aortic lesion, and lipoprotein particle size as determinants. *Arterioscler Thromb* 1992;12:6-18.
102. Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 2005;258:395-410.
103. Cardiovascular Diseases (CVDs) Fact Sheet N°317. World health organization, 2013. (Accessed June 6th, 2015, at <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.)
104. Dementia Fact sheet N°362. World Health Organization. (Accessed July 6th, 2015, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>.)
105. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013;34:2436-43.
106. Pasterkamp G. Methods of accelerated atherosclerosis in diabetic patients. *Heart (British Cardiac Society)* 2013;99:743-9.
107. Pastor P, Roe CM, Villegas A, Bedoya G, Chakraverty S, Garcia G, Tirado V, Norton J, Rios S, Martinez M, Kosik KS, Lopera F, Goate AM. Apolipoprotein Epsilon4 modifies Alzheimer's disease onset in an E280A PS1 kindred. *Annals of neurology* 2003;54:163-9.
108. Patsch JR. Lipoprotein of the density 1.006-1.020 in the plasma of patients with type III hyperlipoproteinaemia in the postabsorptive state. *European journal of clinical investigation* 1975;5:45-55.
109. Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993;88:2762-70.
110. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987;50:831-40.
111. Rader D, Hobbs H. Disorders of Lipoprotein Metabolism. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. New York: McGraw Hill; 2008:2416-29.

Literaturverzeichnis

112. Rodriguez M, Ringstad L, Schafer P, Just S, Hofer HW, Malmsten M, Siegel G. Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by Ginkgo biloba (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients. *Atherosclerosis* 2007;192:438-44.
113. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
114. Sacre SM, Stannard AK, Owen JS. Apolipoprotein E (apoE) isoforms differentially induce nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS letters* 2003;540:181-7.
115. Savoiu G, Dragan S, Cristescu C, Serban C, Noveanu L, Ionescu D, Nicola T, Duicu O, Raducan A, Voicu M. The protective effect of superoxide dismutase on isolated human mammary arteries preincubated with triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi* 2009;113:1170-5.
116. Schlangen J. Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an Koronararterien des Menschen: Diss. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2010.
117. Schwandt P. Störungen des Stoffwechsels triglyzeridreicher Lipoproteine und kombinierte Störungen. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention*. 3rd ed. Schattauer Verlag 2012:146-215.
118. Segrest JP. The role of non-LDL:non-HDL particles in atherosclerosis. *Current diabetes reports* 2002;2:282-8.
119. Shafaroudi MM, McBride M, Deighan C, Wokoma A, Macmillan J, Daly CJ, McGrath JC. Two "knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via alpha2a-adrenoceptors located on the endothelium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005;314:804-10.
120. Shaikh M, Wootton R, Nordestgaard BG, Baskerville P, Lumley JS, La Ville AE, Quiney J, Lewis B. Quantitative studies of transfer in vivo of low density, Sf 12-60, and Sf 60-400 lipoproteins between plasma and arterial intima in humans. *Arterioscler Thromb* 1991;11:569-77.
121. Shrestha R, Hui SP, Sakurai T, Yagi A, Takahashi Y, Takeda S, Jin S, Fuda H, Chiba H. Identification of molecular species of cholesteryl ester hydroperoxides in very low-density and intermediate-density lipoproteins. *Ann Clin Biochem* 2014;51:662-71.
122. Siegel G, Abletshauser C, Malmsten M, Schmidt A, Winkler K. Reduction of arteriosclerotic nanoplaque formation and size by fluvastatin in a receptor-based biosensor model. *Cardiovasc Res* 2003;58:696-705.
123. Siegel G, Malmsten M. Molecular model for athero/arteriosclerosis, patent EP 0 946 876. 2005.

124. Siegel G, Malmsten M, Ermilov E. Anionic biopolyelectrolytes of the syndecan/perlecan superfamily: physicochemical properties and medical significance. *Advances in colloid and interface science* 2014;205:275-318.
125. Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Leonhardt W. Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999;144:59-67.
126. Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Walter A, Schnalke F, Kauschmann A. Blood-flow sensing by anionic biopolymers. *Journal of the autonomic nervous system* 1996;57:207-13.
127. Siegel G, Mockenhaupt, F.H.M.E., Behnke, A.-L., Ermilov, E., Winkler, K., Pries, A.R., Malmsten, M., Hetzer, R., Saunders, R., Lindman, B. Lipoprotein binding to anionic biopolyelectrolytes and the effect of glucose on nanoplague formation in arteriosclerosis and Alzheimer's disease. *Adv Coll Interface Sci* 2016;232:25-35.
128. Siegel G, Ruckborn K, Schnalke F, Muller J. Endothelial dysfunction in human atherosclerotic coronary arteries. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl I:99-103.
129. Siegel G, Walter A, Kauschmann A, Malmsten M, Buddecke E. Anionic biopolymers as blood flow sensors. *Biosensors & bioelectronics* 1996;11:281-94.
130. Sniderman A, McQueen M, Contois J, Williams K, Furberg CD. Why is non-high-density lipoprotein cholesterol a better marker of the risk of vascular disease than low-density lipoprotein cholesterol? *J Clin Lipidol* 2010;4:152-5.
131. Sprecher DL. Raising high-density lipoprotein cholesterol with niacin and fibrates: a comparative review. *Am J Cardiol* 2000;86:461-501.
132. Srisawasdi P, Vanavanan S, Rochanawutanon M, Pornsuriyasak P, Tantrakul V, Kruthkul K, Kotani K. Heterogeneous properties of intermediate- and low-density lipoprotein subpopulations. *Clinical biochemistry* 2013;46:1509-15.
133. Staiger H., Stefan N., Kellerer M., Häring H.-U. Glucagon und Katecholamine - Gegenspieler des Insulins. In: Heinrich P., Müller M., Graeve L., eds. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2014:458-65.
134. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, McBride PE, Wiebe DA, Otvos JD, Sosman JM. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104:257-62.
135. Steiner G, Schwartz L, Shumak S, Poapst M. The association of increased levels of intermediate-density lipoproteins with smoking and with coronary artery disease. *Circulation* 1987;75:124-30.
136. Sutherland WH, Restieaux NJ, Nye ER, Williams MJ, de Jong SA, Robertson MC, Walker HL. IDL composition and angiographically determined progression of atherosclerotic lesions during simvastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:577-83.

Literaturverzeichnis

137. Tai LM, Ghura S, Koster KP, Liakaite V, Maienschein-Cline M, Kanabar P, Collins N, Ben-Aissa M, Lei AZ, Bahroos N, Green SJ, Hendrickson B, Van Eldik LJ, LaDu MJ. APOE-modulated Abeta-induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *Journal of neurochemistry* 2015;133:465-88.
138. Takahashi M, Yui Y, Yasumoto H, Aoyama T, Morishita H, Hattori R, Kawai C. Lipoproteins are inhibitors of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *The American journal of physiology* 1990;258:H1-8.
139. Tatami R, Mabuchi H, Ueda K, Ueda R, Haba T, Kametani T, Ito S, Koizumi J, Ohta M, Miyamoto S, Nakayama A, Kanaya H, Oiwake H, Genda A, Takeda R. Intermediate-density lipoprotein and cholesterol-rich very low density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease. *Circulation* 1981;64:1174-84.
140. Vaziri ND, Norris KC. Reasons for the lack of salutary effects of cholesterol-lowering interventions in end-stage renal disease populations. *Blood purification* 2013;35:31-6.
141. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology* 2011;10:241-52.
142. Williams PT, Feldman DE. Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. *Atherosclerosis* 2011;214:196-202.
143. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science (New York, NY)* 1991;252:1817-22.
144. Wisniewski T, Castano EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *The American journal of pathology* 1994;145:1030-5.
145. Xu Q, Bernardo A, Walker D, Kanegawa T, Mahley RW, Huang Y. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006;26:4985-94.
146. Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience* 2013;250:140-50.
147. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.

Literaturverzeichnis

148. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001;104:2746-53.
149. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *American journal of human genetics* 1981;33:11-24.
150. Zeadin MG, Petlura CI, Werstuck GH. Molecular mechanisms linking diabetes to the accelerated development of atherosclerosis. *Canadian journal of diabetes* 2013;37:345-50.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Felicitas Mockenhaupt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „IDLapoE-isoformspezifische Wirkung auf die flussabhängige Vasodilatation und Bindung an anionische Biopolyelektrolyte“ 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) 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.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Mockenhaupt, F., Winkler, K., Ermilov, E., Hetzer, R., Siegel, G., Abstract 416: IDL-Apolipoprotein E Isoform Navigates Human Coronary Artery Tone. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2014. 34(Suppl 1): p. A416.

Behnke, A.-l., Mockenhaupt, F., Willy, K., Winkler, K., Hetzer, R., Ermilov, E., Siegel, G., Abstract 31: High-density Lipoprotein, a Feed-forward Forechecking Loop. *Circulation Research*, 2015. 117(Suppl 1): p. A31.

Siegel, G., Mockenhaupt, F.H.M.E., Behnke, A.-L., Ermilov, E., Winkler, K., Pries, A.R., Malmsten, M., Hetzer, R., Saunders, R., Lindman, B.: Lipoprotein binding to anionic biopolyelectrolytes and the effect of glucose on nanoplaque formation in arteriosclerosis and Alzheimer's disease. *Adv. Coll. Interface Sci.* 232, 25-35 (2016).

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Felicitas Mockenhaupt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Mockenhaupt, F., K. Winkler, E. Ermilov, R. Hetzer, and G. Siegel, Abstract 416: IDL-Apolipoprotein E Isoform Navigates Human Coronary Artery Tone. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2014. 34(Suppl 1): p. A416.

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung; Präparation der Koronararterien mit Erfassung der klinischen Daten; Feinpräparation der Gefäße; Vorbereitung und Durchführung der elektromechanischen Messungen; Vorbereitung und Durchführung der Messungen der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide; Auswertung und Datenanalyse; Verfassung des Textes und Ergebnispräsentation.

Behnke, A.-L., F. Mockenhaupt, K. Willy, K. Winkler, R. Hetzer, E. Ermilov, and G. Siegel, Abstract 31: High-density Lipoprotein, a Feed-forward Forechecking Loop. *Circulation Research*, 2015. 117(Suppl 1): p. A31.

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung, Präparation der Koronararterien mit Erfassung der klinischen Daten in Zusammenarbeit mit A.-L. Behnke und K. Willy; Feinpräparation der Gefäße; Vorbereitung und Durchführung der elektromechanischen Messungen und der Messungen der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide in Zusammenarbeit mit A.-L. Behnke und K. Willy; Verfassung des Textes in Zusammenarbeit mit den genannten Autoren.

Siegel, G., Mockenhaupt, F.H.M.E., Behnke, A.-L., Ermilov, E., Winkler, K., Pries, A.R., Malmsten, M., Hetzer, R., Saunders, R., Lindman, B.: Lipoprotein binding to anionic biopolyelectrolytes and the effect of glucose on nanoplaque formation in arteriosclerosis and Alzheimer's disease. *Adv. Coll. Interface Sci.* 232, 25-35 (2016).

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung; Präparation der Koronararterien mit Erfassung der

Anteilserklärung

klinischen Daten; Feinpräparation der Gefäße; Vorbereitung und Durchführung der elektromechanischen Messungen; Vorbereitung und Durchführung der Messungen der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide; Vorbereitung der ellipsometrischen Messungen; Auswertung und Datenanalyse; Verfassung des Textes in Zusammenarbeit mit den genannten Autoren.

Danksagung

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.