

Der Einfluss von akutem psychosozialem Stress auf den
Progress der Atherosklerose –
noradrenalinvermittelte Leukozyteneinwanderung in murine
atherosklerotische Plaques durch akuten psychosozialen Stress

Anna-Sophia Zimmermann

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hendrik Sager
2. apl. Prof. Dr. Andreas Dinkel

Die Dissertation wurde am 11.04.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 19.06.2025 angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	VIII
Abstract	X
I. Einleitung	1
1. Atherosklerose	1
1.1. Definition	1
1.2. Pathogenese	1
1.3. Die Rolle von Monozyten und Makrophagen	4
1.4. Therapeutische Ansätze	6
2. Stress	7
2.1. Definition und Geschichte des Stressbegriffs	7
2.2. Physiologische Stressreaktion	9
2.3. Stress und kardiovaskuläre Erkrankungen	12
3. Wissenschaftliche Tiermodelle	15
3.1. Atherosklerosemodelle	15
3.2. Stressmodelle	16
3.3. Inhibitionsmodelle des sympathischen Nervensystems	16
II. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Dissertation	18
III. Material und Methoden	20
1. Material	20
1.1. Tierhaltung und wissenschaftliche Tiermodelle	20
1.2. Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf	20
1.3. Chemikalien und Reagenzien	21
1.4. Puffer und Lösungen	22
1.5. Enzyme	23
1.6. Antikörper, fluorochromkonjugierte Proteine und Magnetbeads	24
1.7. Primer und Assays	25
1.8. Kommerziell erhältliche Kits	26
1.9. Geräte, Zubehör und Softwares	26

2. Versuchstiere	27
2.1. Mauslinien	27
2.2. Haltung und Zucht	28
3. Tierversuche	28
3.1. Tiermodelle	28
3.2. Versuchsbeschreibungen	30
4. Magnetic cell separation	35
5. Durchflusszytometrie	38
6. Immunhistochemie	44
7. Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qPCR)	47
8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	50
9. Statistische Analyse	51
IV. Ergebnisse	53
1. Stressinduzierte Leukozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques	53
2. Mechanismus der stressinduzierten Plaque-Leukozytenakkumulation	55
2.1. Verstärkte Leukozyteneinwanderung	55
2.2. Aktivierung von Endothelzellen	58
2.3. Vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung	61
V. Diskussion	64
1. Stressinduzierte Leukozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques	64
2. Mechanismus der stressinduzierten Plaque-Leukozytenakkumulation	66
2.1. Verstärkte Leukozyteneinwanderung	66
2.2. Aktivierung von Endothelzellen	67
2.3. Vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung	69
3. Einordnung der Ergebnisse	70
4. Allgemeine Limitationen	73
5. Ausblick	74
VI. Quellen	76
VII. Danksagung	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.....	2
Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Hauptachsen der physiologischen Stressreaktion .	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung stressinduzierter Effekte, die das Auftreten kardiovaskulärer Events triggern können	14
Abbildung 4: Einfluss von akutem psychosozialem Stress auf die Leukozytenzahlen im Blut von Wildtyp-Mäusen	18
Abbildung 5: Einfluss von akutem psychosozialem Stress auf die Zahl aortaler myeloischer Zellen in ApoE-Knockout-Mäusen.....	19
Abbildung 6: Maushalter zur Immobilisation der Versuchstiere	29
Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau des adoptiven Zelltransferexperiments	33
Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau des adoptiven Zelltransferexperiments nach chemischer Sympathektomie	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation mithilfe einer MACS-Trennsäule.....	36
Abbildung 10: Schematische Darstellung der indirekten immunomagnetischen Markierung	37
Abbildung 11: Beispielhaftes Schema des optischen Systems eines Durchflusszytometers zur Detektion der optischen Emissionen	39
Abbildung 12: Prinzip der angewendeten immunhistochemischen Färbung mittels ABC Methode und AEC-Substratumsatz durch Peroxidase	45
Abbildung 13: Schematische Darstellung des TaqMan Prinzips bei der qPCR.....	48
Abbildung 14: Schematische Darstellung der kompetitiven Antikörperbindung bei der Durchführung des ELISAs.....	50
Abbildung 15: Analyse von Aortenproben aus ApoE-Knockout-Mäusen mit versus (vs.) ohne vorherige akute Stressexposition (Räuber-Beute-Stress).....	53
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten aus Aortenwurzeln aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)	54
Abbildung 17: Analyse von Blutproben aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Räuber-Beute-Stress)	56

Abbildung 18: Quantifizierung der Leukozytenzahlen in Blutproben von ApoE-Knockout-Mäusen im zeitlichen Verlauf nach akuter Stressexposition (Immobilisationsstress).....	57
Abbildung 19: Analyse von Aortenproben aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition nach adoptivem Zelltransfer (Injektion von GFP ⁺ neutrophilen Granulozyten und Monozyten, Immobilisationsstress).....	58
Abbildung 20: Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf aortalen Endothelzellen von ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)...	59
Abbildung 21: Quantifizierung der Genexpression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen bzw. Chemokinen in aortalen Endothelzellen aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)	60
Abbildung 22: Lipidbestimmungen in Blutplasmen von ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition	61
Abbildung 23: Quantifizierung von Noradrenalin in Blutplasmen und Aortenbögen von ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)...	62
Abbildung 24: Analyse von Aortenproben aus ApoE-Knockout-Mäusen nach adoptivem Zelltransfer (Injektion von GFP ⁺ neutrophilen Granulozyten und Monozyten) und anschließender akuter Stressexposition (Immobilisationsstress) mit vs. ohne vorherige chemische Sympathektomie	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Produkte für Tierhaltung und wissenschaftliche Tiermodelle.....	20
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf.....	20
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen	22
Tabelle 5: Verwendete Enzyme	23
Tabelle 6: Verwendete Antikörper und fluorochromkonjugierte Proteine	24
Tabelle 7: Verwendete Magnetbeads.....	25
Tabelle 8: Verwendete Primer und Assays.....	25
Tabelle 9: Verwendete kommerziell erhältliche Kits	26
Tabelle 10: Verwendete Geräte und Zubehör	26
Tabelle 11: Verwendete Softwares	27
Tabelle 12: Übersicht über Verwendung der Proben aus Immobilisationsstress-Versuchen	31
Tabelle 13: Verwendete Antikörpermischungen zur Analyse von Leukozytenpopulationen..	41
Tabelle 14: Verwendete Antikörpermischungen zur Analyse von Leukozytenpopulationen nach adoptiven Zelltransferexperimenten	41
Tabelle 15: Verwendete Antikörpermischungen zur Analyse bzw. Isolation von Endothelzellen	41
Tabelle 16: Übersicht über Verdünnung der Probenaliquots zur Zellzählung	43
Tabelle 17: Zusammensetzung qPCR-Reaktionsansatz	49
Tabelle 18: Reaktionsbedingungen qPCR.....	49

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ABC	engl. avidin-biotin complex
ACTH	adrenocortikotropes Hormon
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	Allophycocyanin
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	engl. bovine serum albumin
BV	engl. brilliant violet
CCL	engl. C-C motif chemokine ligand
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. complementary DNA
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	engl. C-X-C motif chemokine ligand
Cy	engl. cyanine
d	Tag(e)
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
EDTA	engl. ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FITC	engl. fluorescein isothiocyanate
FMO	engl. fluorescence minus one
FSC	engl. forward scatter
g	Gramm
<i>g</i>	lokale Fallbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl. green fluorescent protein
h	Stunde(n)
HEPES	engl. N-(2-Hydroxyethyl)piperazineN'-(2-ethanesulfonic acid)
HFD	engl. high-fat-diet

HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
ICAM	engl. intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	engl. low density lipoprotein
Ly6C/ Ly6G	engl. lymphocyte antigen 6 complex, locus C/ G
m	Milli-
μ	Micro-
MACS	engl. magnetic cell separation
MFI	engl. mean fluorescence intensity
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	engl. phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	engl. peridinin-chlorophyll-protein complex
qPCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RBC	engl. red blood cell
RNA	engl. ribonucleic acid
SD	Standardabweichung
SSC	engl. side scatter
TMT	2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin
u.a.	unter anderem
UBC	Ubiquitin C
v.a.	vor allem
VCAM	engl. vascular cell adhesion molecule
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind heutzutage die führenden Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017) und weltweit (World Health Organization 2020). Die Grundlage der meisten kardiovaskulären Erkrankungen ist eine Atherosklerose (Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015) - eine multifaktoriell bedingte, inflammatorische Erkrankung, die durch die Ausbildung atherosklerotischer Plaques im Bereich der arteriellen Gefäßwände charakterisiert ist (Libby 2002). Psychosozialer Stress gilt als kardiovaskulärer Risikofaktor (Nahrendorf 2018; Rosengren et al. 2004) und viele Studien konnten eine Assoziation zwischen akutem psychosozialen Stress und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bzw. Events zeigen (Kivimäki and Steptoe 2018). Die pathophysiologischen Hintergründe sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden und das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von akutem psychosozialen Stress auf Atherosklerose näher zu untersuchen.

Dazu wurde die Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress zu einer Akkumulation von Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt und damit die lokale Inflammation verstärkt, untersucht. Tatsächlich konnte im atherosklerotischen Mausmodell mittels Durchflusszytometrie eine Zunahme der myeloischen Zellen in den murinen Aorten nach akuter Stressexposition nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich auch mittels CD11b-Immunhistochemie bestätigen.

Als Mechanismus der stressinduzierten Leukozytenakkumulation vermuteten wir eine verstärkte Einwanderung zirkulierender Leukozyten in die atherosklerotischen Plaques. Im Mausmodell konnte nach akuter psychosozialer Stressexposition eine Abnahme der Leukozytenzahlen im Blut beobachtet werden. Dies wäre durch eine stressinduzierte Aufnahme der Zellen aus dem Blut ins Gewebe erklärbar. In einem adoptiven Zelltransferexperiment ließ sich hierzu passend eine durch akuten psychosozialen Stress gesteigerte Aufnahme der zirkulierenden Leukozyten in die Aorten atherosklerotischer Mäuse belegen.

Wir untersuchten die weiterführende Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress, vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung, zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt. Es ist allgemein bekannt, dass Stress zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt (Ulrich-Lai and Herman 2009) und die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen induziert (Palkovits 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Noradrenalin-ELISA im atherosklerotischen Mausmodell bestätigt werden, dass akuter psychosozialer Stress zu einer vermehrten lokalen Noradrenalinfreisetzung im Bereich der Aortenbögen führt. Ein entsprechendes Inhibitionsmodell konnte in Übereinstimmung mit der aufgestellten Hypothese belegen, dass eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung die stressinduzierte Einwanderung zirkulierender Leukozyten in murine atherosklerotische Plaques reduziert.

Weiterhin wurde die Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress über eine Aktivierung von Endothelzellen zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt, untersucht. Es konnten Belege für eine stressinduzierte Aktivierung aortaler Endothelzellen mit gesteigerter Expression von Zelladhäsionsmolekülen im Mausmodell erbracht werden. Insbesondere das Zelladhäsionsmolekül VCAM1 scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen.

Insgesamt liefern die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten Belege dafür, dass akuter psychosozialer Stress, vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung, zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in murine atherosklerotische Plaques führt. Dabei scheint es plausibel, dass die im Mausmodell ebenfalls nachgewiesene Aktivierung von Endothelzellen durch akuten psychosozialen Stress der Vermittler dieses Effekts sein könnte. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse über die neuroimmunologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen akutem psychosozialem Stress und Atherosklerose bieten die Chance, in der Zukunft als neue Ansatzpunkte für die Entwicklung zielgerichteter Therapie- und Präventionsstrategien zu dienen.

Teile der Daten aus dieser Dissertation wurden im Rahmen folgender Publikation veröffentlicht:

Hinterdobler, J., S. Schott, H. Jin, A. Meesmann, A. L. Steinsiek, A. S. Zimmermann, J. Wobst, P. Müller, C. Mauersberger, B. Vilne, A. Baecklund, C. S. Chen, A. Moggio, Q. Braster, M. Molitor, M. Krane, W. E. Kempf, K. H. Ladwig, M. Hristov, M. Hulsmans, I. Hilgendorf, C. Weber, P. Wenzel, C. Scheiermann, L. Maegdefessel, O. Soehnlein, P. Libby, M. Nahrendorf, H. Schunkert, T. Kessler, and H. B. Sager. 2021. 'Acute mental stress drives vascular inflammation and promotes plaque destabilization in mouse atherosclerosis', Eur Heart J, 42: 4077-88

Abstract

Cardiovascular diseases are today the leading cause of death in Germany (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017) and worldwide (World Health Organization 2020). The primary underlying cause of many cardiovascular diseases is atherosclerosis (Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015) - a multifactorial inflammatory disease characterized by the formation of atherosclerotic plaques in the arterial vessel walls (Libby 2002). Psychosocial stress is considered a cardiovascular risk factor (Nahrendorf 2018; Rosengren et al. 2004), and many studies have shown an association between acute psychosocial stress and the occurrence of cardiovascular disease or events (Kivimäki and Steptoe 2018). To this date the underlying pathophysiological mechanisms are poorly understood. Therefore, the aim of this dissertation was to further investigate the impact of acute psychosocial stress on atherosclerosis.

It was hypothesized that acute psychosocial stress leads to an accumulation of leukocytes in atherosclerotic plaques. By the use of an atherosclerotic mouse model, flow cytometry demonstrated an increase in myeloid cells in the murine aortas after acute stress exposure. This effect could also be confirmed by CD11b immunohistochemistry.

As a mechanism of stress-induced leukocyte accumulation, we hypothesized an increased migration of circulating leukocytes into atherosclerotic plaques. In the mouse model, a decrease in blood leukocyte counts was observed after acute psychosocial stress exposure. This finding could be explained by stress-induced uptake of cells from blood into tissues. In accordance in an adoptive cell transfer experiment, an increased uptake of circulating leukocytes into the aortas of atherosclerotic mice induced by acute psychosocial stress was demonstrated.

We further investigated the hypothesis that acute psychosocial stress leads to increased migration of circulating leukocytes into atherosclerotic plaques mediated by increased local norepinephrine release. It is well known that stress leads to activation of the sympathetic nervous system (Ulrich-Lai and Herman 2009) and induces the release of norepinephrine from sympathetic nerve endings (Palkovits 2010). In this work, norepinephrine ELISA confirmed that acute psychosocial stress leads to increased local norepinephrine release in the aortic arch of atherosclerotic mice. In accordance with the proposed hypothesis, it was demonstrated that inhibition of norepinephrine release reduces stress-induced migration of circulating leukocytes into murine atherosclerotic plaques.

Furthermore, we investigated the hypothesis that acute psychosocial stress leads to increased migration of circulating leukocytes into atherosclerotic plaques via activated endothelial cells. Evidence for stress-induced activation of aortic endothelial cells with increased expression of cell adhesion molecules in the mouse model was obtained. In particular, the cell adhesion molecule VCAM1 seems to play an important role in this context.

Overall, the data obtained in this dissertation provide evidence that acute psychosocial stress leads to increased migration of circulating leukocytes into murine atherosclerotic plaques mediated by increased local norepinephrine release. Thereby, it seems plausible that the activation of endothelial cells by acute psychosocial stress, which has also been demonstrated in the mouse model, could be the mediator of this effect. These newly gained insights into the neuroimmunological and pathophysiological connections between acute psychosocial stress and atherosclerosis offer the chance to serve as a starting point for the development of novel targeted therapeutic and preventive approaches in the future.

I. Einleitung

1. Atherosklerose

1.1. Definition

Bei Atherosklerose handelt es sich um eine komplexe, chronisch inflammatorische Erkrankung, die durch die Ausbildung lipidreicher Plaques innerhalb der arteriellen Gefäßwände gekennzeichnet ist. Die atherosklerotischen Plaques entwickeln sich v.a. im Bereich von Gefäßabgängen und -bifurkationen, also in Gefäßabschnitten, in denen der laminare Blutfluss gestört ist. (Libby 2002)

Als entscheidender Risikofaktor der Atherosklerose gelten Dyslipidämien, insbesondere eine Erhöhung der Low-Density Lipoproteine (LDL) im Blut. Diese sind aber nicht allein für die Entstehung der Atherosklerose verantwortlich. Die Atherosklerose ist in den meisten Fällen multifaktoriell bedingt und wird durch das Zusammenwirken verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren begünstigt. (Bentzon et al. 2014; Lüscher 2000)

Zu diesen Risikofaktoren zählen neben Dyslipidämien u.a. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Rauchen, positive Familienanamnese (Bentzon et al. 2014; Nahrendorf 2018; Lüscher 2000) und männliches Geschlecht (Bentzon et al. 2014; Lüscher 2000). Auch psychosozialer Stress gilt heute als kardiovaskulärer Risikofaktor (Nahrendorf 2018).

Die Entwicklung einer Atherosklerose bleibt primär asymptomatisch (Bentzon et al. 2014). Sie kann jedoch im Verlauf durch einen Progress der atherosklerotischen Läsionen zu symptomatischen Gefäßstenosen oder akuten thrombotischen Gefäßverschlüssen führen (Lüscher 2000; Bentzon et al. 2014). Klinisch manifestiert sich dies in Form von kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder koronarer Herzkrankheit (KHK) samt akutem Myokardinfarkt (Bentzon et al. 2014). Diese kardiovaskulären Erkrankungen stellen die führenden Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017) und weltweit (World Health Organization 2020) dar, was die besondere Relevanz der Thematik widerspiegelt.

1.2. Pathogenese

Früher galt Atherosklerose als hauptsächlich metabolische Erkrankung, die sich durch die Ausbildung intramuraler Lipidablagerungen manifestiert (Ross and Harker 1976). Dank umfangreicher Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte wissen wir heute, dass dies zu kurz greift und Atherosklerose als komplexe inflammatorische Erkrankung verstanden werden muss (Libby 2002). Dies ist heute allgemein anerkannt, die genaue Pathogenese der Atherosklerose aber weiterhin nicht vollständig geklärt (Libby 2002; Libby, Ridker, and Hansson 2011; Geovanini and Libby 2018).

Ihr Ausgangspunkt scheint in einer Dysfunktion des Gefäßendothels zu liegen. Diese wird durch verschiedene Stimuli, wie Hyperglykämie, arterielle Hypertonie oder erhöhte LDL getriggert und führt zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und einer erhöhten Permeabilität des Endothels. (Ross 1999; Libby, Ridker, and Hansson 2011)

Lipoproteine, insbesondere LDL, lagern sich in der Tunica intima der Gefäßwände ab und unterliegen dort verschiedenen modifizierenden Prozessen wie Oxidation oder Lipolyse. V.a. oxidiertes-LDL scheint eine entscheidende Rolle in der Atherogenese zu spielen. Es wirkt proinflammatorisch und führt zu einer Aktivierung von Endothelzellen. In der Folge wird die Produktion von Chemokinen sowie die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen gesteigert, was zu einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten in die Intima führt (siehe Abbildung 1 a/ b). (Lusis 2000; Weber and Noels 2011)

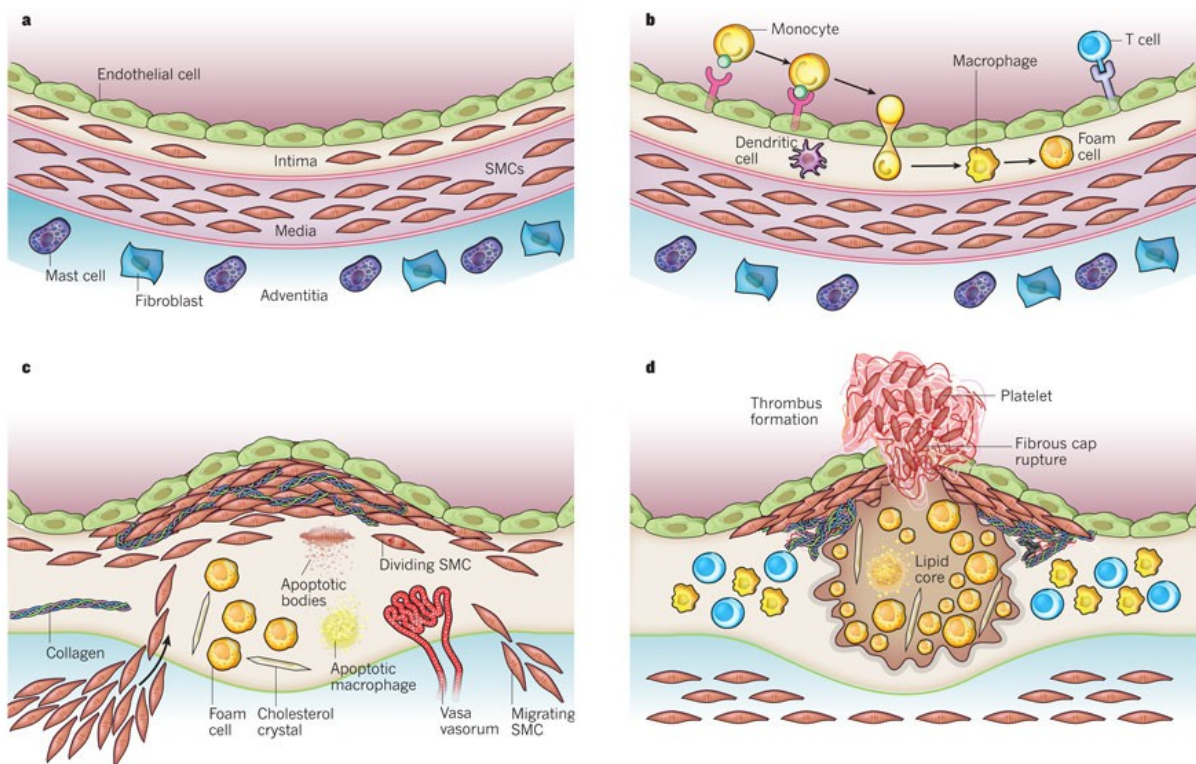


Abbildung 1: Überblick über die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen

a) Darstellung des physiologischen Aufbaus einer muskulären Arterie bestehend aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia.

b) Initiale Schritte der Läsionsentstehung: Leukozyten adhären an aktivierte Endothelzellen und wandern in die Intima ein. Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen und entwickeln sich durch die Aufnahme von modifizierten Lipoproteinpartikeln zu Schaumzellen.

c) Die Progression der Läsion schreitet voran: Glatte Muskelzellen migrieren in die Intima, proliferieren und produzieren eine kollagenreiche Extrazellulärmatrix. Glatte Muskelzellen und Makrophagen können zugrunde gehen und mit angesammelten Lipiden zur Entstehung eines nekrotischen Zentrums führen. Zum Teil finden sich Cholesterolkristalle und Mikrogefäße in den Läsionen.

d) Das Auftreten von thrombotischen Komplikationen: Die fibröse Kappe einer fortgeschrittenen Plaque mit vielen Leukozyten und lipidreichem Zentrum rupturiert. In der Folge bildet sich ein Thrombus im Lumen des Blutgefäßes, der zu einer Behinderung des Blutflusses führen kann.

(Libby, Ridker, and Hansson 2011 Figure 1)

Die Rekrutierung der Leukozyten ins Gewebe verläuft dabei kaskadenartig (Weber and Noels 2011). Die sogenannte Kaskade der Leukozytenadhäsion wird klassischerweise als Abfolge aus Endothelrollen, Aktivierung und fester Adhäsion beschrieben (Ley et al. 2007; Butcher 1991). Laut Ley et al. (2007) muss die Kaskade jedoch um folgende Schritte ergänzt werden: *Einfangen - langsames Rollen - Rollen - Aktivierung - Adhäsion - Adhäsionsstärkung, Kriechen und para- und transzelluläre Migration*. Die Autoren betonen, dass für jeden dieser Schritte andere Moleküle eine Schlüsselrolle zu spielen scheinen. Für das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels beispielsweise sind laut Ley et al. Selectine wie E- oder P-Selectin bzw. die Interaktion mit ihren entsprechenden Liganden auf der Oberfläche der Leukozyten von großer Bedeutung. Die Adhäsion der Zellen hingegen schreiben sie v.a. der Bindung von leukozytären Integrinen an Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie auf der Oberfläche der Endothelzellen zu. Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) oder Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1) sind als wichtige Beispiele dieser endothelialen Zelladhäsionsmoleküle zu nennen (Ley et al. 2007) und speziell im Rahmen der Atherogenese von großer Bedeutung (Collins et al. 2000; Cybulsky et al. 2001). Die Integrin-vermittelte Adhäsion der Leukozyten wird dabei vornehmlich durch Chemokine aktiviert (Ley et al. 2007). Chemokine können zudem einen chemotaktischen Gradienten bilden, entlang dessen die Leukozyten ins Gewebe migrieren (Zernecke and Weber 2010; Libby 2002). Welche Chemokine hierbei die maßgebliche Rolle spielen, scheint je nach Leukozytensubpopulation und Entwicklungsstadium der atherosklerotischen Plaques zu differieren (Zernecke and Weber 2010). Bei der Rekrutierung von Monozyten z.B. wird dem Chemokin C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) eine große Bedeutung zugeschrieben (Libby 2002; Gu et al. 1998). Auch das Chemokin C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1), das an die Oberfläche aktivierter Endothelzellen gebunden wird (Weber 2003), scheint eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von Monozyten in atherosklerotische Läsionen zu spielen (Huo et al. 2001; Boisvert et al. 2006).

Die Einwanderung von Leukozyten in die Tunica intima ist ein entscheidendes Element in der Atherogenese. Die rekrutierten Monozyten differenzieren im Gewebe zu Makrophagen. Diese wiederum nehmen mithilfe ihrer Scavenger-Rezeptoren die abgelagerten modifizierten Lipoproteinpartikel auf und entwickeln sich zu sogenannten Schaumzellen. Schaumzellen sind ein Merkmal früher atherosklerotischer Läsionen, der fatty streaks. Die Makrophagen bzw. Schaumzellen produzieren u.a. verschiedene proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, reaktive Sauerstoffspezies und Matrix-Metalloproteasen (MMP). (Libby 2002)

Diese tragen entscheidend zu einem inflammatorischen Milieu bei (Libby 2002) und fördern die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in die Intima (Lusis 2000). Dies führt zu einer Progression der atherosklerotischen Läsion (Libby 2002; Lusis 2000). Neben Monozyten und Makrophagen tragen auch andere Leukozyten wie T-/ B-Lymphozyten, Mastzellen, neutrophile Granulozyten oder dendritische Zellen in unterschiedlichem Ausmaß zur

Atherogenese und -progression bei (Weber and Noels 2011). Es entwickelt sich eine fibröse Plaque mit einem lipidreichen, nekrotischen Kern, der von einer fibrösen Kappe bestehend aus kollagenreicher Extrazellulärmatrix und glatten Muskelzellen umgeben wird (Weber and Noels 2011; Lusis 2000; Libby 2002) (siehe Abbildung 1 c).

Wachsende fibröse Plaques können zu einer Stenose der Gefäße führen. Die größte Gefahr besteht jedoch im Auftreten thrombotischer Komplikationen in Folge einer Plaqueruptur (siehe Abbildung 1 d). Reißt die fibröse Kappe einer atherosklerotischen Plaque ein, wird durch den Kontakt des Blutstroms mit prothrombotisch wirkenden Bestandteilen des Plaqueinneren eine Thrombusbildung ausgelöst, die zu einem akuten Gefäßverschluss führen kann. (Libby 2002)

Atherosklerotische Plaques, die als besonders anfällig für das Auftreten thrombotischer Komplikationen gelten, werden dabei gemeinhin als vulnerabel bezeichnet (Virmani et al. 2002).

Das Vorliegen einer dünnen fibrösen Kappe gilt als prädisponierend für eine Plaqueruptur. Inflammatorische Prozesse, zu einem großen Teil ausgelöst durch Leukozyten, fördern die Instabilität der fibrösen Kappe. Sie führen zum Abbau des die fibröse Kappe stabilisierenden Kollagens und hemmen die Kollagenneuproduktion der glatten Muskelzellen. (Lusis 2000; Libby 2002)

Neben einer Plaqueruptur kann auch eine oberflächliche Erosion der Plaques zu thrombotischen Komplikationen führen (Lusis 2000; Libby 2002). Die zugrundeliegenden Mechanismen der oberflächlichen Erosion sowie der Anteil durch sie ausgelöster klinisch manifester Thrombosen sind Gegenstand aktueller Diskussion und Forschung (Libby 2002; Libby et al. 2019).

1.3. Die Rolle von Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen gelten als wichtige Protagonisten in der Entstehung und Progression der Atherosklerose (Libby 2002; Geovanini and Libby 2018). Wie unter 1.1.2 bereits ausführlich dargestellt, wandern während der Entwicklungsphase atherosklerotischer Läsionen Monozyten in die arterielle Tunica intima ein und differenzieren dort zu Makrophagen, die modifizierte Lipoproteinpartikel aufnehmen und progressionsfördernde inflammatorische Prozesse auslösen (Libby 2002). Innerhalb der atherosklerotischen Plaques zeigt sich, in Korrelation zu ihrer Progression, eine Akkumulation der Monozyten bzw. Makrophagen (Woollard and Geissmann 2010; Swirski et al. 2006). Diese ist einerseits auf eine lokale Proliferation der Makrophagen und andererseits auf eine kontinuierliche Einwanderung und Differenzierung von Monozyten zurückzuführen (Robbins et al. 2013; Nahrendorf 2018; Woollard and Geissmann 2010). Eine Erhöhung des LDL-Spiegels kann beispielsweise durch eine Induktion von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen die Migration der Monozyten aus dem Blut fördern (Pritchard et al. 1991; Smalley et al. 1996; Verna, Ganda, and Stemerman 2006; Lin et al. 1996).

Neben ihrer Schlüsselrolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose fördern die akkumulierten Makrophagen auch das Auftreten thrombotischer Komplikationen. Sie produzieren u.a. MMPs, die zum Abbau des stabilitätsfördernden Kollagens in der fibrösen Kappe führen und dadurch die Anfälligkeit der Plaque für eine Ruptur erhöhen. Zudem wird von den Makrophagen Tissue Factor freigesetzt, der im Falle einer Plaqueruptur einen entscheidenden prothrombotischen Trigger im Plaqueinneren und möglichen Ausgangspunkt einer fulminanten thrombotischen Gefäßokklusion darstellt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Monozyten bzw. Makrophagen in allen Phasen der Atherosklerose eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. (Libby 2002; Geovanini and Libby 2018)

In verschiedenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Monozyten und Makrophagen nicht als homogene Zellpopulationen betrachtet werden dürfen. Sie bestehen aus verschiedenen Subpopulationen, die sich in ihrem Expressionsprofil und ihrer Funktion teils deutlich unterscheiden. (Hilgendorf, Swirski, and Robbins 2015)

Humane Monozyten werden heute typischerweise in drei Subpopulationen unterteilt: Klassische cluster of differentiation (CD) 14^{++} CD 16^{-} , intermediäre CD 14^{++} CD 16^{+} und nicht klassische CD 14^{+} CD 16^{++} Monozyten (Hristov and Heine 2015; Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Die Einteilung muriner Monozyten erfolgt in der Regel nur in zwei Subpopulationen: Lymphocyte antigen 6 complex locus C (Ly6C) high und Ly6C low Monozyten (Hristov and Heine 2015; Geissmann, Jung, and Littman 2003; Hilgendorf, Swirski, and Robbins 2015). Murine Ly6C high Monozyten scheinen den klassischen Monozyten des Menschen zu ähneln, akkumulieren üblicherweise im Bereich inflammatorisch veränderter Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen (Hilgendorf, Swirski, and Robbins 2015; Hristov and Weber 2011). Murine Ly6C low Monozyten hingegen gelten als Äquivalent zu den nicht klassischen humanen Monozyten und fungieren u.a. als Gefäßpatrouille im gesunden Gewebe (Hilgendorf, Swirski, and Robbins 2015; Auffray et al. 2007). Dabei ist die genaue Rolle der einzelnen Monozytensubpopulationen im Rahmen der Atherosklerose noch nicht vollständig geklärt und erfordert weitere Forschung (Hristov and Heine 2015).

Anders als bei den Monozyten konnte sich hinsichtlich der Makrophagen und ihrer Subpopulationen bisher keine einheitliche Einteilung bzw. Nomenklatur durchsetzen. Zwar wurden in der Vergangenheit verschiedene Makrophagen-Klassifikationen vorgeschlagen, diese scheinen aus heutiger Sicht aber nicht differenziert genug, um der Komplexität der Makrophagen und der ihrer Funktion gerecht zu werden. Mithilfe neuer technischer Verfahren konnten weitergehende Erkenntnisse über die Heterogenität der Makrophagen gewonnen und neue Subpopulationen identifiziert werden. (Willemsen and de Winther 2020; Cochain et al. 2018; Nahrendorf and Swirski 2016)

Dennoch bedarf es auch hier weiterer Forschung, um die Funktionen der einzelnen Subpopulationen im Detail zu klären und ihre Rolle im Rahmen der Atherosklerose zu verstehen. Dies könnte die Grundlage für neue therapeutische Ansatzpunkte schaffen. (Willemsen and de Winther 2020)

1.4. Therapeutische Ansätze

Therapie und Prävention der Atherosklerose beruhen heute v.a. auf der Erfassung und Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren (Nahrendorf 2018) (siehe I.1.1). Je nach Ausprägung werden zur Einstellung der Risikofaktoren Veränderungen des Lebensstils (z.B. mehr Bewegung, gesündere Ernährung und Verzicht auf Rauchen) alleine oder in Kombination mit einer medikamentösen Behandlung empfohlen (Libby and Everett 2019). Thrombotische Komplikationen der Atherosklerose werden darüber hinaus gemäß spezifischer Therapieschemata behandelt, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

Eine Erhöhung des LDL-Spiegels im Blutplasma gilt als entscheidender Risikofaktor der Atherosklerose, sodass seine Senkung einen Schwerpunkt der Atherosklerosetherapie darstellt (Libby and Everett 2019; Ridker 2016; Geovanini and Libby 2018). Hierzu wird oft eine medikamentöse Therapie mit Statinen eingeleitet (Geovanini and Libby 2018; Larsen et al. 2019). Statine bewirken durch eine Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase eine Senkung des LDL-Spiegels und besitzen zudem eine lipidunabhängige anti-inflammatorische Wirkung (Bu et al. 2010; Ray and Cannon 2005). In Studien wurde gezeigt, dass eine Therapie mit Statinen sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprävention das Auftreten kardiovaskulärer Events reduzieren kann (Fulcher et al. 2015). Neben Statinen können auch andere Medikamentengruppen wie Cholesterinresorptionshemmer oder Proprotein-konvertase Subtilisin/ Kexin Typ 9 (PCSK9)-Inhibitoren zur Senkung des LDL-Spiegels eingesetzt werden (Larsen et al. 2019).

Instrumente zur Senkung des LDL-Spiegels sind (Larsen et al. 2019), genau wie anti-atherosklerotische Therapieoptionen generell (Libby and Everett 2019), bis heute Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten und es konnten bereits große Fortschritte erzielt werden. Ungeachtet dessen zeigt sich jedoch weiterhin ein substantielles Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, sodass auch an neuen therapeutischen Ansätzen zur Behandlung der Atherosklerose geforscht wird (Ridker 2016; Libby and Everett 2019).

Anti-inflammatorische Therapieansätze scheinen vor dem Hintergrund, dass Atherosklerose heute als inflammatorischer Prozess verstanden wird, besonders vielversprechend. Eine Bestätigung für die Wirksamkeit anti-inflammatorischer Therapieansätze in der Atherosklerosebehandlung konnte die Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study, kurz CANTOS, liefern. (Libby and Everett 2019; Nahrendorf 2018)

In dieser Studie von Ridker et al. (2017) wurde die Wirkung des Anti-Interleukin(IL)1 β Antikörpers Canakinumab in der Sekundärprävention nach Myokardinfarkt bei Patienten mit erhöhter Plasmakonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) untersucht (high-sensitive CRP ≥ 2 mg/ l). Die Therapie mit Canakinumab führte hierbei zu einer Reduktion der kardiovaskulären Events im Vergleich zur Placebobehandlung. Patienten, deren high-sensitive CRP-Spiegel durch die Canakinumab-Therapie unter 2 mg/ l fiel, schienen besonders von der Therapie zu profitieren und wiesen eine signifikant geringere kardiovaskuläre Mortalität auf (Ridker et al. 2018). Die Therapie mit Canakinumab führte allerdings auch zu einem vermehrten Auftreten tödlicher Infektionen (Ridker et al. 2017). Die CANTOS gilt als Meilenstein und unterstreicht die Stellung anti-inflammatorischer Therapien als vielversprechenden Ansatz für die Zukunft der Atherosklerosebehandlung (Libby and Everett 2019; Nahrendorf 2018).

2. Stress

2.1. Definition und Geschichte des Stressbegriffs

„Everybody knows what stress is and nobody knows what it is.“ (Selye 1973: 692)

Dieses Zitat des berühmten Stressforschers Hans Selye hat weiterhin Gültigkeit und beschreibt die Schwierigkeit, Stress allgemeingültig zu definieren.

Der Begriff Stress ist im Alltag wie in der Wissenschaft sehr geläufig, wird dabei aber verschieden interpretiert und uneinheitlich verwendet. Es ist v.a. die Komplexität des Begriffs Stress bzw. die vielen unterschiedlichen Aspekte und Bedeutungen, die er umfasst, die seine Definition erschweren. (Selye 1973; Levine and Ursin 1991)

Grundsätzlich kann Stress als komplexe Konzeption verstanden werden, die auf verschiedenen wissenschaftlichen Theorien beruht (Levine and Ursin 1991; Goldstein and Kopin 2007). Eine wichtige theoretische Grundlage der Stresskonzeption lieferte im 19. Jahrhundert Claude Bernard mit seiner Idee des „milieu intérieur“ (Goldstein and Kopin 2007; Bernard 1865), das die Körperzellen umgibt (Bernard 1878). Ihm zufolge ist die Fähigkeit eines Organismus, durch regulatorische Prozesse ein konstantes inneres Milieu gewährleisten zu können, fundamental, um unabhängig von den Schwankungen der externen Umgebung zu bestehen (Bernard 1878).

Darauf aufbauend entwickelte im 20. Jahrhundert Walter Cannon sein Konzept der Homöostase. Homöostase postulierte er als Aufrechterhaltung akzeptabler Wertebereiche für verschiedene innere Parameter, wie Blutzuckerspiegel oder Körpertemperatur, durch koordinierte physiologische Regulationsprozesse. Cannon beschrieb, dass eine Bedrohung dieses biologischen Gleichgewichtszustands, beispielsweise durch Kälte, zu einer Aktivierung des sympathoadrenalen Systems führt. Diese Reaktion dient laut Cannon der Aufrechterhaltung bzw.

Wiederherstellung der Homöostase und soll eine Schädigung des Organismus verhindern. (Cannon 1929)

Cannons Theorien waren ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu unseren modernen Stresskonzepten (Goldstein and Kopin 2007). Den Begriff „Stress“ im physiologischen Kontext prägte und popularisierte jedoch ein anderer maßgeblich - Hans Selye (Goldstein and Kopin 2007; Koolhaas et al. 2011). Selye (1973: 692) definierte Stress als „[...] nonspecific response of the body to any demand made upon it [...]“. Die stressauslösenden Anforderungen und Elemente bezeichnete er als Stressoren. Dabei stellte Selye fest, dass als Reaktion auf Stressoren nicht nur die von Cannon postulierte Aktivierung des sympathoadrenalen Systems wichtig für die Adaptation ist, sondern auch eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse entscheidend zur Wiederherstellung der Homöostase beiträgt. (Selye 1973)

Die Arbeit dieser Wissenschaftler stellt die Basis der modernen Stressforschung dar (Goldstein and Kopin 2007). In den letzten Jahrzehnten manifestierten sich verschiedene theoretische Ansätze, die unterschiedliche Stressinterpretationen und -definitionen vorschlugen (Levine and Ursin 1991; Cohen, Gianaros, and Manuck 2016). Jede dieser Definitionen ist mit der Multidimensionalität des Stressbegriffs konfrontiert und spiegelt einen Teil davon wider (Levine and Ursin 1991). Ein einheitlicher wissenschaftlicher Konsens über die Definition des Begriffs Stress konnte sich bis heute nicht etablieren (Levine and Ursin 1991; Rosengren et al. 2004). Der bekannte Stressforscher Bruce McEwen schlug folgende, relative breit gefasste Definition vor, die im Rahmen dieser Arbeit als Bezugspunkt dient: „Stress may be defined as a real or interpreted threat to the physiological or psychological integrity of an individual that results in physiological and/or behavioral responses [...]“ (McEwen 2010: 11).

Generell können im Rahmen des Stresskonzepts verschiedene Aspekte unterschieden werden: die Einwirkung eines auslösenden Stimulus, die zerebrale Stresswahrnehmung und die Stressantwort (Levine and Ursin 1991; Dhabhar and McEwen 1997). Der Stressstimulus wird dabei häufig als Stressor bezeichnet (Dhabhar and McEwen 1997; Cohen, Gianaros, and Manuck 2016; Steptoe and Kivimaki 2012).

Viele Wissenschaftler betonen, dass der gleiche Stimulus, der bei einem Individuum Stress auslöst, dies nicht notwendigerweise auch bei anderen Individuen hervorruft. Diese interindividuellen Unterschiede seien abhängig davon, wie das Individuum den Stimulus im Verhältnis zu den eigenen Bewältigungsmöglichkeiten bewertet. (Koolhaas et al. 2011; Cohen, Gianaros, and Manuck 2016; Steptoe and Kivimaki 2012)

Stressauslösende Stimuli können dabei grundsätzlich in physische (z.B. Kälte oder starke körperliche Anstrengung) oder psychologische (z.B. soziale Konflikte oder kritische Lebensereignisse) Stressoren unterteilt werden (McEwen 2010). Anstelle von psychologischen Stressoren wird oft auch von emotionalen (Chrousos 2009; Dayas et al. 2001), mentalen (Brotman,

Golden, and Wittstein 2007) oder weitergefasst psychosozialen Stimuli (Rosengren et al. 2004; Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015) gesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit soll zur besseren Übersicht ausschließlich der Begriff „psychosozial“ verwendet werden. Weiterhin können anhand der Dauer der Stressoren akuter und chronischer Stress unterschieden werden (Dimsdale 2008). Diese Einteilung ist in der Literatur weit verbreitet (Dimsdale 2008; Brotman, Golden, and Wittstein 2007; Ulrich-Lai and Herman 2009; Steptoe and Kivimaki 2012; Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015), feste zeitliche Definitionskriterien fehlen jedoch (Dimsdale 2008). Analog zu Dimsdale (2008) werden im Rahmen dieser Arbeit Stressoren, die kürzer als eine Woche andauern, als akut betrachtet.

Die durch Stressoren ausgelöste Stressreaktion zeigt sich laut der oben genannten Definition von McEwen in Änderungen von Physiologie und/ oder Verhalten (McEwen 2010). Steptoe (2000: 510) beschreibt die Manifestation von Stresseffekten sogar „[...] in four distinct domains: physiology, behavior, subjective experience, and cognitive function [...]“. Im Rahmen dieser Arbeit spielt v.a. die physiologische Stressreaktion des Körpers eine große Rolle. Auf sie wird daher im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

2.2. Physiologische Stressreaktion

Die physiologische Stressreaktion umfasst verschiedene autonome, neuroendokrine und immunologische Prozesse (Steptoe 2000; Glaser and Kiecolt-Glaser 2005), die miteinander interagieren (Glaser and Kiecolt-Glaser 2005). Sie soll der Anpassung an die Situation und damit dem Schutz des Organismus dienen, kann v.a. langfristig aber auch zu einer Schädigung des Körpers führen (McEwen 2010). Bestimmt wird die physiologische Stressreaktion im Wesentlichen von zwei Protagonisten: dem autonomen Nervensystem und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) (McEwen 2010; Ulrich-Lai and Herman 2009) (siehe Abbildung 2).

Das autonome Nervensystem reagiert besonders schnell auf die Einwirkung von Stressoren (Ulrich-Lai and Herman 2009; McEwen and Sapolsky 1995). Innerhalb von Sekunden (McEwen and Sapolsky 1995) findet durch verschiedene zentralnervöse Prozesse (Ulrich-Lai and Herman 2009) eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems statt. Dabei wird über das sogenannte sympatho-adrenomedulläre System die Freisetzung von Katecholaminen, vornehmlich Adrenalin, aus dem Nebennierenmark ins Blut stimuliert (Ulrich-Lai and Herman 2009). Zudem wird aus peripheren sympathischen Nervenendigungen im Bereich der Endorgane Noradrenalin in den Extrazellulärraum freigesetzt, das sich lokal bzw. durch Aufnahme ins Blut systemisch verteilt (Palkovits 2010). Die Aktivierung des Sympathikus führt durch die Freisetzung der Katecholamine u.a. zu einem Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks, einer gesteigerten Thrombozytenaggregation und Bronchodilatation sowie einer Energiemobilisierung (Goldstein 2010). Daneben wird durch eine Stressorexposition auch eine

Modulation des parasympathischen Nervensystems ausgelöst, die dazu beiträgt, die Dauer der autonomen Stressreaktion zu kontrollieren (Ulrich-Lai and Herman 2009).

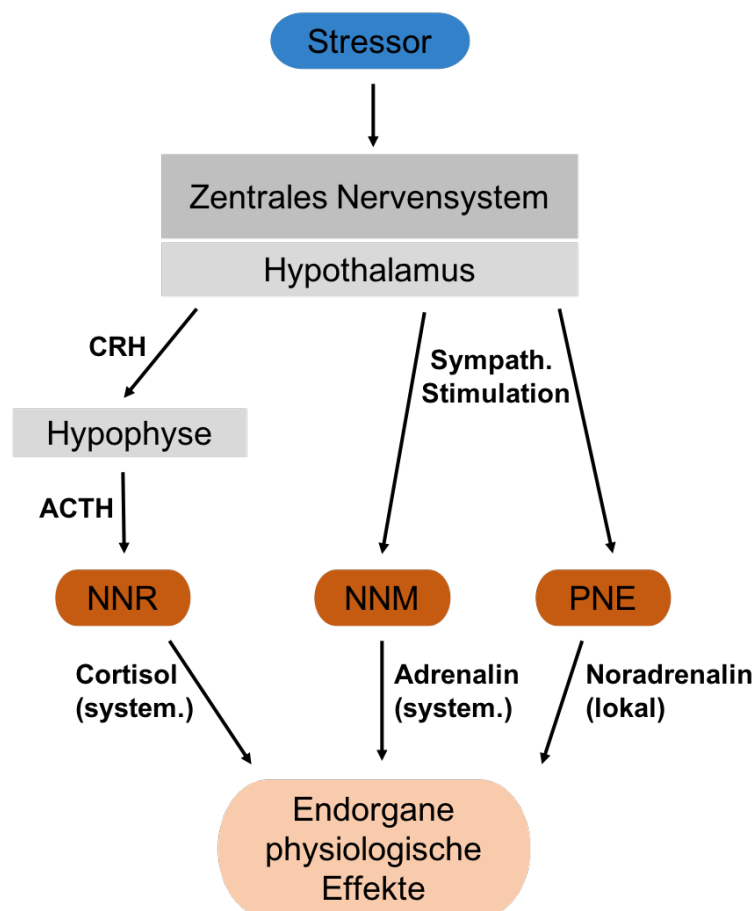


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Hauptachsen der physiologischen Stressreaktion

Eine Stressorexposition führt bei zerebraler Stresswahrnehmung zur Aktivierung der HHN-Achse mit Freisetzung von systemisch wirksamem Cortisol aus der Nebennierenrinde. Zudem wird das sympathische Nervensystem stimuliert, was zur Ausschüttung von systemisch wirksamem Adrenalin aus dem Nebennierenmark und zu lokal im Bereich von peripheren Nervenendigungen freigesetztem Noradrenalin führt.

(CRH = Corticotropin-Releasing-Hormon, ACTH = Adrenocortikotropes Hormon, NNR = Nebennierenrinde, NNM = Nebennierenmark, PNE = periphere sympathische Nervenendigungen, system. = systemisch, sympath. = sympathisch)

(in Anlehnung an Brotman, Golden, and Wittstein 2007)

Im Vergleich zur Reaktionsschnelligkeit des autonomen Nervensystems zeigt sich die Reaktion der HHN-Achse erst mit größerer Latenz. Die Stressorexposition führt hierbei im Hypothalamus zur Freisetzung des Corticotropin-Releasing-Hormons, das die Ausschüttung von Adrenocortikotropem Hormon (ACTH) aus der Hypophyse stimuliert. Das freigesetzte ACTH wiederum bewirkt eine verstärkte Freisetzung von Glukokortikoiden wie Cortisol aus der Nebennierenrinde. (Ulrich-Lai and Herman 2009)

Die Glukokortikoide werden mit einer Latenz von einigen Minuten zum Beginn der Stressor-einwirkung freigesetzt (McEwen and Sapolsky 1995). Sie lösen vielfältige genomische und nicht-genomische Effekte aus und bewirken u.a. eine Erhöhung des Blutdrucks sowie eine Mobilisierung von Energiereserven (Ulrich-Lai and Herman 2009).

Die Aktivierung des autonomen Nervensystems und der HHN-Achse im Rahmen der physiologischen Stressreaktion führt auch zu einer Modulation des Immunsystems. Die freigesetzten Stresshormone wirken einerseits direkt auf Immunzellen ein, indem sie an entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Andererseits können sie z.B. durch eine Dysregulation der Zytokinproduktion auch zu einer indirekten Modulation des Immunsystems führen. Umgekehrt übt das Immunsystem auch Einfluss auf das zentrale Nervensystem, den Taktgeber der Stressreaktion, aus. Diese komplexen neuroimmunologischen Interaktionen prägen die physiologische Stressreaktion. (Glaser and Kiecolt-Glaser 2005)

Dabei scheinen verschiedene Stressoren zu unterschiedlichen Ausprägungen und Mustern der physiologischen Stressantwort führen zu können (Bowers et al. 2008; Dayas et al. 2001; Pacak et al. 1998). In Reaktion auf unterschiedliche Arten von Stressoren zeigten sich in Studien beispielsweise Unterschiede in der neuronalen Aktivität des Gehirns (Dayas et al. 2001) sowie in der Höhe der freigesetzten Katecholamine (Pacak et al. 1998) und Glukokortikoide (Bowers et al. 2008) im Blut. Neben der Art der Stressoren scheint auch die Dauer der Stress-einwirkung einen großen Einfluss auf die Ausprägung der physiologischen Stressreaktion zu haben (Bowers et al. 2008; Dhabhar and McEwen 1997). Chronischer Stress gilt beispielsweise als überwiegend immunsuppressiv bzw. -dysregulativ, wohingegen akutem Stress eher eine Stimulation der Immunfunktion zugeschrieben wird (Glaser and Kiecolt-Glaser 2005; Dhabhar and McEwen 1997). Untersucht wurde der Einfluss von Stress auf die Immunfunktion u.a. im Bereich der Haut. Im Tiermodell führte die Anwendung von chronischem Stress im Rahmen einer induzierten kontaktallergischen Reaktion zu einer verminderten kutanen Immunreaktion (Dhabhar and McEwen 1997). Wurde das Versuchstier vor der Exposition mit dem Kontaktallergen hingegen einer akuten Stressexposition ausgesetzt, zeigte sich eine verstärkte Immunreaktion im Bereich der Haut (Dhabhar and McEwen 1997, 1996) mit vermehrter kutaner Leukozyteninfiltration (Dhabhar and McEwen 1996). Dabei wiesen Dhabhar and McEwen (1996) in Folge der akuten Stresseinwirkung bereits vor der Exposition mit dem Kontaktallergen vermehrt Leukozyten in der Haut nach. Sie interpretierten dies als Vorbereitung des Organismus auf die möglicherweise aus der Stressor-Einwirkung resultierenden immunologischen Herausforderungen. Proinflammatorische Effekte wurden in den vergangenen Jahren jedoch auch vermehrt in Folge von chronischem Stress nachgewiesen (Hinterdobler, Schunkert, et al. 2021).

Insgesamt bedarf es weiterer Forschung, um die Modulation des Immunsystems im Rahmen der Stressreaktion besser zu verstehen (Dhabhar 2003; Hinterdobler, Schunkert, et al. 2021).

Generell sind weitere Studien nötig, um ein umfassenderes Verständnis über die Auswirkungen von Stress bzw. der einzelnen Stressoren zu gewinnen (Bowers et al. 2008; Pacák and Palkovits 2001) und die Genese stressassoziierter Erkrankungen aufklären zu können (Pacák and Palkovits 2001).

2.3. Stress und kardiovaskuläre Erkrankungen

Zahlreiche Studien konnten eine Assoziation zwischen Stress und dem vermehrten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen nachweisen (Kivimäki and Steptoe 2018). Im Folgenden dieser Arbeit soll der Fokus auf Untersuchungen zu psychosozialem Stress und KHK bzw. Myokardinfarkten, den häufigsten klinischen Manifestationsformen der Atherosklerose (Bentzon et al. 2014), liegen.

Eine Studie, die dies untersuchte, war die großangelegte INTERHEART Fall-Kontroll-Studie (n = 24767). Sie konnte eine Assoziation zwischen psychosozialem Stress und einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines akuten Myokardinfarkts belegen. Die Chance, einen erstmaligen Myokardinfarkt zu erleiden, zeigte sich in der INTERHEART Studie für Probanden, die in den letzten 12 Monaten permanenten Stress bei der Arbeit und/ oder zuhause angaben, mehr als doppelt so hoch. (Rosengren et al. 2004)

Weiterhin zeigten sich in verschiedenen prospektiven Studien und Metaanalysen bei Probanden ohne vorbekannte KHK arbeitsplatzbezogener Stress (Dragano et al. 2017; Kivimäki et al. 2012), Einsamkeit/ sozialer Isolation (Steptoe and Kivimäki 2013) oder die Pflege eines kranken/ behinderten Ehepartners (> 9 h/ Woche) (Lee et al. 2003) assoziiert mit einem erhöhten Risiko einer „incident coronary heart disease“. Die Definition einer „incident coronary heart disease“ war dabei nicht in allen dieser Studien identisch, subsumierte aber in den meisten Fällen das Auftreten eines erstmaligen Myokardinfarkts oder eines Todesfalls aufgrund KHK (Dragano et al. 2017; Steptoe and Kivimäki 2013; Kivimäki et al. 2012; Lee et al. 2003).

Andere Studien untersuchten die Rolle von Stress als akuten Trigger kardiovaskulärer Events (Kivimäki and Steptoe 2018). Dabei wurde beispielsweise in den ersten Tagen nach Auftreten eines starken Erdbebens (Leor and Kloner 1996) oder nach Ausbruch eines Krieges (Meisel et al. 1991) die Anzahl der aufgetretenen Myokardinfarkte analysiert und jeweils ein Anstieg der Zahlen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzeiträumen festgestellt. Wilbert-Lampen et al. (2008) berichteten darüber hinaus über einen Anstieg der Myokardinfarktinzidenz im Rahmen der Fußball-Weltmeisterschaft 2006 in Deutschland. Im Rahmen ihrer Studie zeigte sich in Bayern an Tagen, an denen ein Spiel der deutschen Nationalmannschaft stattfand, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Events (definiert als Myokardinfarkt mit/ ohne ST-Hebung, instabile Angina pectoris oder symptomatische Herzrhythmusstörung) der einheimischen Bevölkerung. Der Anteil an Personen mit vorbekannter KHK unter den Patienten, die an den Spieltagen der deutschen Nationalmannschaft ein kardiovaskuläres Event erlitten, war

dabei höher als bei den Fällen im Kontrollzeitraum. Die Autoren berichteten zudem, dass die höchste Inzidenz der kardiovaskulären Events in den ersten zwei Stunden nach Spielbeginn auftrat. Ähnlich dazu zeigte sich in einer Studie von Mittleman et al. (1995) in den ersten zwei Stunden nach einer Episode von Wut ein Anstieg des relativen Risikos für das Auftreten eines Myokardinfarkts auf mehr als das Doppelte.

Diese Studien unterstützen die Auffassung von psychosozialen Stress als kardiovaskulärem Risikofaktor. Doch trotz der vielfältig nachgewiesenen Assoziationen zwischen dem Auftreten von Stress und dem kardiovaskulären Erkrankungen ist es schwierig, einen eindeutigen Kausalzusammenhang zu belegen (Steptoe and Kivimäki 2012) und im Verhältnis ist bisher noch relativ wenig über die genauen pathophysiologischen Mechanismen und Hintergründe dieser Assoziationen bekannt (Kivimäki and Steptoe 2018).

Klar ist, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, dass Atherosklerose die primäre pathophysiologische Grundlage kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt (Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015). Es ist anzunehmen, dass eine stressbedingte Progression der Atherosklerose eine chronische Stresseinwirkung beinhaltet, wohingegen das durch Stress getriggerte Auftreten kardiovaskulärer Events bei vorbestehender KHK Folge einer akuten Stressexposition sein kann (Kivimäki and Steptoe 2018). In verschiedenen Tierstudien z.B. zeigte chronischer Stress, wie von Lagraauw, Kuiper und Bot (2015) zusammengefasst, pro-atherogene Effekte, die hauptsächlich durch einen veränderten Lipidhaushalt und eine Modulation der Immunantwort bedingt waren. Beispielsweise konnten Heidt et al. (2014) im Mausmodell nachweisen, dass chronischer psychosozialer Stress durch eine gesteigerte sympathische Noradrenalin-ausschüttung die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark fördert. In der Folge zeigten sich in ihren Experimenten bei den gestressten Tieren vermehrt Leukozyten im Blut sowie in den atherosklerotischen Plaques. Innerhalb der atherosklerotischen Plaques wiesen die Autoren bei den gestressten Tieren zudem ein verstärkt inflammatorisches Milieu mit größerem nekrotischem Zentrum und einer dünneren umgebenden fibrösen Kappe als bei den nicht-gestressten Kontrolltieren nach. Plaques, die solche Eigenschaften aufweisen, gelten als anfällig für Rupturen, auf deren Grundlage dann thrombotische Komplikationen wie Myokardinfarkte entstehen können (Libby 2002; Falk, Shah, and Fuster 1995).

Verschiedene potentielle Mechanismen, über die psychosozialer Stress akut das Auftreten kardialer Events bei vorbestehender KHK triggern kann, fassten Steptoe und Brydon (2009) zusammen (siehe Abbildung 3). Ihnen zufolge können verschiedene physiologische Reaktionen, die infolge von akutem psychosozialen Stress auftreten, eine Rolle bei der Auslösung kardialer Events spielen: das Auftreten einer autonomen Dysfunktion, einer neuroendokrinen Aktivierung sowie einer inflammatorischen, hämodynamischen und pro-thrombotischen Reaktion. Steptoe und Brydon erklärten, dass diese Reaktionen pathophysiologische Effekte wie Myokardischämie, Herzrhythmusstörungen oder Plaqueruptur und Thrombusbildung triggern

und dadurch kardiale Events, z.B. in Form von Myokardinfarkten, hervorrufen können. Gerade die Untersuchung neuroimmunologischer Interaktionen im Zusammenhang mit vaskulärer Inflammation und Atherosklerose ist in den letzten Jahren mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt (Hinterdobler, Schunkert, et al. 2021).

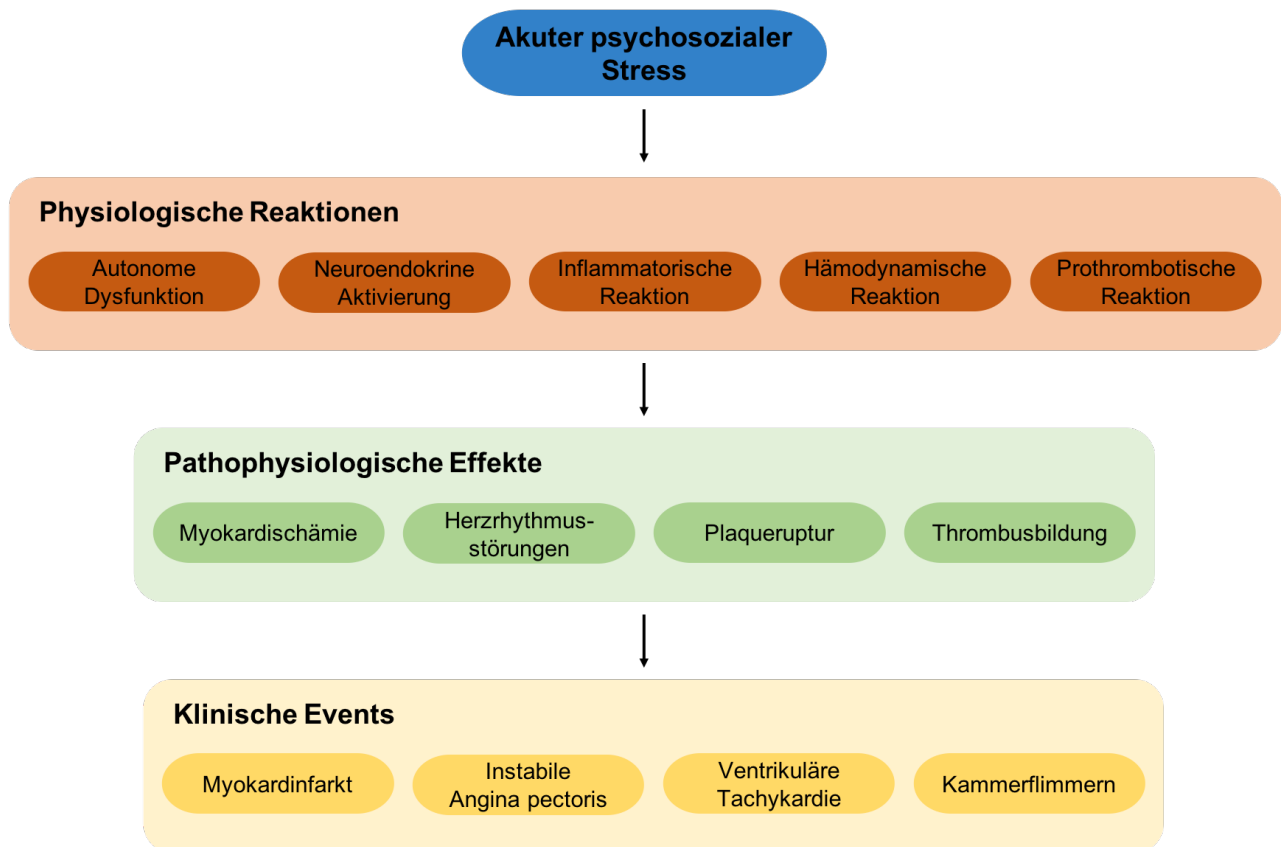


Abbildung 3: Schematische Darstellung stressinduzierter Effekte, die das Auftreten kardiovaskulärer Events triggern können

In Folge von akutem Stress treten unterschiedliche physiologische Reaktionen auf, die über verschiedene pathophysiologische Effekte kardiovaskuläre Events auslösen können.

(in Anlehnung an Steptoe and Brydon 2009; Bhattacharyya and Steptoe 2007)

In einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Effekte, die Stress als kardiovaskulären Risikofaktor wirken lassen, liegt die Chance, die Patientenversorgung zukünftig zu verbessern (Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015). Ist ein Stressor selbst schwer präventiv beeinflussbar, so ist es beispielsweise eine Möglichkeit, stattdessen nachfolgende Faktoren der durch ihn ausgelösten Kausalkette mittels evidenzbasierter Präventionsstrategien anzugehen (Kivimäki and Steptoe 2018).

Laut Steptoe and Brydon (2009) sind Stressmanagement-Programme ein möglicher präventiver Ansatz, um das Risiko stressinduzierter kardiovaskulärer Events zu senken. Auch Programme zur Aufklärung der Bevölkerung über die potenziellen Gefahren von beispielsweise sportlichen Großereignissen, durch Stress kardiovaskuläre Events zu triggern, wurden von

den beiden Autoren als Präventivmaßnahme vorgeschlagen. Laut den Leitlinien zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen in der klinischen Praxis der European Society of Cardiology soll bei unter Stress stehenden Patienten mit atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankung die Überweisung zu einem psychotherapeutischem Stressmanagement erwogen werden, um eine Verbesserung des kardiovaskulären Outcomes und eine Reduktion der Stresssymptome zu erreichen (Visseren et al. 2021). Insgesamt fehlen jedoch große kontrollierte Studien zu diesem Thema, um spezifische Therapieempfehlungen geben zu können (Kivimäki and Steptoe 2018).

Ebenso fehlen bis dato etablierte medikamentöse Therapieansätze, die auf die kardiovaskulären Effekte von psychosozialen Stress abzielen. Weitere Forschung ist nötig, um durch genauere Kenntnisse der pathophysiologischen Zusammenhänge die Grundlage zur Entwicklung solcher Medikamente zu schaffen. (Hinterdobler, Schunkert, et al. 2021)

3. Wissenschaftliche Tiermodelle

In der wissenschaftlichen Forschung werden häufig Tiermodelle zur Erforschung humaner Pathologien und Krankheitsbilder eingesetzt (Hau 2011). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über Tiermodelle zur Simulation von Atherosklerose, Stress und einer Inhibition des sympathischen Nervensystems gegeben werden, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind.

3.1. Atherosklerosemodelle

In der wissenschaftlichen Forschung werden heute großteils murine Atherosklerosemodelle verwendet, wobei verschiedene dieser Modelle existieren. Ein etabliertes und weit verbreitetes Mausmodell der Atherosklerose beruht auf dem genetischen Knockout des Apolipoproteins E (ApoE): die ApoE-Knockout-Maus. (Getz and Reardon 2012)

ApoE ist ein Baustein vieler Lipoproteine und vermittelt u.a. ihre Aufnahme aus dem Blut ins Gewebe (Zhang et al. 1992; Plump et al. 1992; Mahley 1988). Durch sein Fehlen entwickeln ApoE-Knockout-Mäuse eine Hypercholesterinämie und im Verlauf atherosklerotische Gefäßläsionen (Zhang et al. 1992; Zhang et al. 1994; Plump et al. 1992). Diese Effekte können durch die Fütterung einer stark fett- und cholesterolhaltigen Diät, im Folgenden high-fat-diet (HFD) genannt, verstärkt werden (Plump et al. 1992; Nakashima et al. 1994; Zhang et al. 1994).

ApoE-Knockout-Mäuse entwickeln v.a. im Bereich des Aortenursprungs und -bogens, der aortalen Hauptäste, der aortalen Bifurkation, der Pulmonal- und Iliakalarterien sowie der Karotiden atherosklerotische Läsionen. Mit zunehmendem Alter der Tiere lässt sich eine Progression der atherosklerotischen Läsionen von fatty streaks hin zu fibrösen Plaques feststellen.

Bei Fütterung einer HFD treten die Läsionen früher auf und es zeigt sich insgesamt eine stärkere Atheroprogression. (Nakashima et al. 1994)

3.2. Stressmodelle

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Simulation von Stress im Tiermodell beschrieben (Patchev and Patchev 2006). Sehr häufig werden Immobilisationstechniken zur Stresssimulation eingesetzt (Buynitsky and Mostofsky 2009; Patchev and Patchev 2006). Die Versuchstiere können dabei, wie von Buynitsky and Mostofsky (2009) zusammengefasst, auf verschiedene Arten immobilisiert werden: Eine Möglichkeit ist es beispielsweise, die Versuchstiere in eine starre Plexiglasröhre einzusperren oder bei freibleibender Schnauze in ein Stofftuch einzuwickeln. Weiterhin wird die Möglichkeit, die Extremitäten der Versuchstiere unmittelbar zu fixieren, genannt. Die Autoren betonen dabei, dass neben der Form und Intensität der Immobilisation auch Dauer und Häufigkeit ihrer Exposition variiert werden können, um unterschiedliche Stresssettings zu untersuchen. Aufgrund der Wahrnehmung von Einschränkung und Eingesperrtsein wird durch die Immobilisation des Versuchstiers Stress von hauptsächlich psychosozialer Natur simuliert (Viswanathan and Dhabhar 2005). Verschiedene Stresseffekte konnten in Studien infolge einer Immobilisation des Versuchstieres nachgewiesen werden (Buynitsky and Mostofsky 2009), z.B. ein Anstieg der Hormonspiegel von ACTH und Corticosteron im Blut der Tiere (Gameiro et al. 2006; Belda, Márquez, and Armario 2004).

Darüber hinaus können auch Räuber-Beute-Modelle zur Simulation von psychosozialen Stress verwendet werden (Barnum et al. 2012). Hierbei nimmt das Versuchstier die Rolle der Beute ein (Barnum et al. 2012) und wird mit einem natürlichen Fressfeind bzw. dessen Geruch konfrontiert (Golbidi, Frisbee, and Laher 2015). Zur Induktion von Räuber-Beute-Szenarien wird häufig der synthetische Geruchsstoff 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin (TMT) eingesetzt (Staples 2010). Dieser ist natürlicherweise in den Fäzes von Füchsen enthalten (Vernet-Maury 1980), den natürlichen Fressfeinden von Nagetieren (Goldyn et al. 2003; Vernet-Maury 1980). Bereits in den 1980er Jahren beschrieben Vernet-Maury, Polak, and Demael (1984), dass eine TMT-Exposition bei Ratten Stress auslöst. In ihren Experimenten zeigte sich dies u.a. anhand von Verhaltensänderungen der Tiere und einer Erhöhung ihrer Plasmacorticosteronspiegel.

3.3. Inhibitionsmodelle des sympathischen Nervensystems

Der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf physiologische oder pathophysiologische Vorgänge wird häufig mithilfe von Inhibitionsmodellen untersucht. Hierbei wird oft der Begriff Sympathektomie verwendet, um eine Hemmung der efferenten Innervation von Noradrenalinproduzierenden Neuronen zu beschreiben. (Picklo 1997)

In dieser Bedeutung soll der Begriff „Sympathektomie“ auch im Folgenden dieser Arbeit verwendet werden.

Eine Sympathektomie kann durch unterschiedliche Strategien erreicht werden. Eine Möglichkeit stellt ein chirurgisches Vorgehen dar. Hierbei werden beispielsweise sympathische Nervenfasern durchtrennt oder sympathische Ganglien reseziert, um eine Denervierung eines bestimmten Organs oder Gewebes zu erzielen. Neben einer chirurgischen Sympathektomie kann z.B. auch eine chemische Sympathektomie zur Hemmung des sympathischen Nervensystems eingesetzt werden. (Picklo 1997)

Ein etabliertes Modell der chemischen Sympathektomie besteht in der Anwendung des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) (Picklo 1997; Wakade 1979). 6-OHDA führt zu einer akuten Degeneration sympathischer Nervenendigungen (Malmfors and Sachs 1968; Tranzer and Thoenen 1968) und hierüber zu einer Noradrenalindepletion im Gewebe (Tranzer and Thoenen 1968). Viele Quelle schreiben die Selektivität des Neurotoxins seiner Aufnahme über Monoamintransporter in die sympathischen Nervenendigungen zu (Malmfors and Sachs 1968; Picklo 1997; Blum et al. 2001; Kostrzewa and Jacobowitz 1974). Es scheint, dass 6-OHDA v.a. durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette oxidativen Stress auslöst und so die Nervenendigungen schädigt (Blum et al. 2001). Dabei ist zu beachten, dass bei adulten Tieren die Perikaryen der sympathischen Neurone durch 6-OHDA nicht zerstört werden (Tranzer and Thoenen 1968). Zudem kann 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, sodass es peripher injiziert bei adulten Tieren keine Wirkung auf das zentrale Nervensystem ausübt (Kostrzewa 2007; Blum et al. 2001; Sachs 1973).

II. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Dissertation

Psychosozialer Stress gilt heute als anerkannter kardiovaskulärer Risikofaktor (Nahrendorf 2018; Rosengren et al. 2004). Viele Studien konnten eine Assoziation zwischen akutem psychosozialen Stress und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bzw. Events belegen, die genauen pathophysiologischen Hintergründe sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden (Kivimäki and Steptoe 2018) (siehe I.2.3). Die Grundlage kardiovaskulärer Erkrankungen ist Atherosklerose (Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015) - eine multifaktoriell bedingte, inflammatorische Erkrankung, die durch die Ausbildung atherosklerotischer Plaques im Bereich der arteriellen Gefäßwände gekennzeichnet ist (Libby 2002). Will man die pathophysiologischen Zusammenhänge von akutem psychosozialen Stress und kardiovaskulären Erkrankungen bzw. Events verstehen, stellt sich demnach die Frage, wie Atherosklerose durch akuten psychosozialen Stress beeinflusst wird.

Hier setzt diese Dissertation an und verfolgt das Ziel, den Einfluss von akutem psychosozialen Stress auf Atherosklerose näher zu untersuchen. Den Ausgangspunkt hierzu bildeten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe. Diese hatten gezeigt, dass akuter psychosozialer Stress im Mausmodell zur Abnahme der Leukozytenzahlen im Blut führt (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe Abbildung 4).

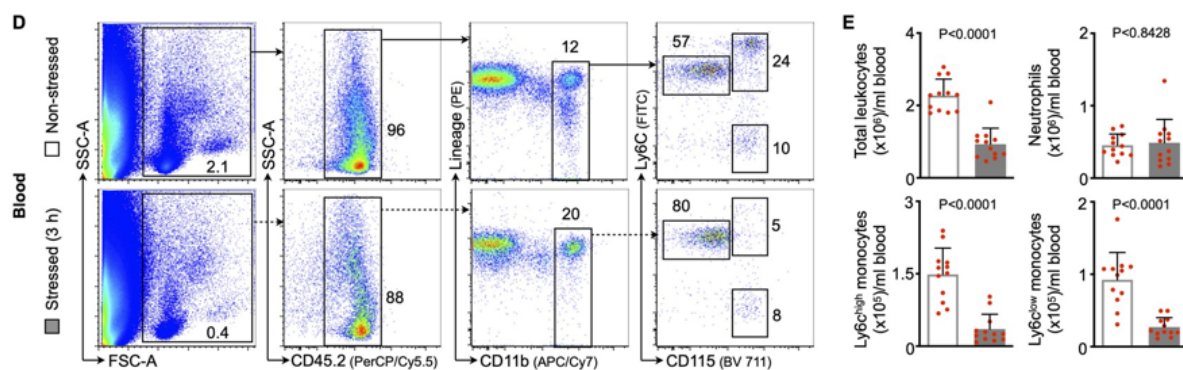


Abbildung 4: Einfluss von akutem psychosozialen Stress auf die Leukozytenzahlen im Blut von Wildtyp-Mäusen

D) Exemplarisches Gating der Blutproben in der durchflusszytometrischen Analyse (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

E) Quantifizierung von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen in den Blutproben von Wildtyp-Mäusen mit und ohne vorherige Stressexposition (n = 12 pro Gruppe).

(Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 1 D/ E)

In den Aorten atherosklerotischer Mäuse war dagegen eine Zunahme der myeloischen Zellen infolge von akutem psychosozialen Stress festgestellt worden (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe Abbildung 5).

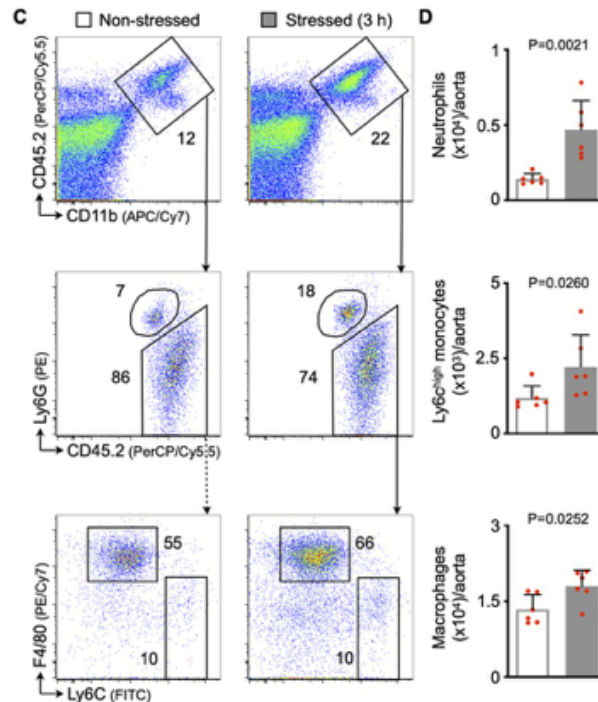


Abbildung 5: Einfluss von akutem psychosozialen Stress auf die Zahl aortaler myeloischer Zellen in ApoE-Knockout-Mäusen

C) Exemplarisches Gating der Aortenproben in der durchflusszytometrischen Analyse (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

D) Quantifizierung myeloischer Zellen in den Aortenproben von ApoE-Knockout-Mäusen mit und ohne vorherige Stressexposition (n = 6 pro Gruppe).

(Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 2 C/ D)

Darauf aufbauend wurden folgende Hypothesen zum pathophysiologischen Zusammenhang von akutem psychosozialen Stress und Atherosklerose aufgestellt:

- Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress zu einer Akkumulation von Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt und damit die lokale Inflammation verstärkt
- Zugrundeliegende Mechanismen:
 - Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt
 - Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress über eine Aktivierung von Endothelzellen zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt
 - Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt

Die Untersuchung der genannten Hypothesen im Rahmen dieser Arbeit soll zu einem besseren Verständnis des pathophysiologischen Effekts von akutem psychosozialen Stress auf Atherosklerose führen. Hierin liegt die Chance, neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von zielgerichteten Therapie- und Präventionsstrategien zu finden.

III. Material und Methoden

1. Material

Grundlegende Laborausstattungen, die in jeder handelsüblichen Variante verwendet werden können (z.B. Pipetten), werden im Folgenden nicht aufgeführt.

1.1. Tierhaltung und wissenschaftliche Tiermodelle

Tabelle 1: Verwendete Produkte für Tierhaltung und wissenschaftliche Tiermodelle

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Käfig Typ III H	Tecniplast Deutschland GmbH	Hohenpeißenberg, Deutschland
Käfig Typ I L	Tecniplast Deutschland GmbH	Hohenpeißenberg, Deutschland
Classic chips	ABEDD Vertriebs GmbH	Wien, Österreich
Smart-Haus für Mäuse	ZOONLAB GmbH	Castrop-Rauxel, Deutschland
Mouse house	Tecniplast Deutschland GmbH	Hohenpeißenberg, Deutschland
ARBOCEL® crinclets natural	J. Rettenmaier & Söhne GmbH und Co KG	Rosenberg, Deutschland
Maus-Zucht 10 mm Pellets	ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland
Ratte/ Maus-Haltung 10 mm Pellets	ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland
MD.88137 Adjusted calories diet	Envigo	Indianapolis, USA
CODA® Animal Holders HLD-MM	Kent Scientific Corporation	Torrington, USA
Isofluran CP 1 ml/ ml	CP-Pharma	Burgdorf, Deutschland
2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (97%)	SRQ Bio Incorporated	Sarasota, USA
6-Hydroxydopamine hydrobromide	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

1.2. Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Gazin® Tupfer aus Verbandmull	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG	Neuwied, Deutschland
Gazin® Mullkompressen, 10 x 10 cm, steril	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG	Neuwied, Deutschland
Microlance™ 3 Kanüle, 24 G 1"	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
Blutlanzette steril	Feather Safety Razor Co., Ltd	Osaka, Japan
Omnican® 50, 30 G x 8 mm	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Injekt® Luer Solo, 2 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
S-Monovette® K3 EDTA, 1,2 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nürnberg, Deutschland
SurePrep™ Capillary Tube, Heparinized	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA

EZ Micro Test Tubes, 2 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes, 1,5 mL, PCR clean	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Falcon® Conical Centrifuge Tube, 50 ml	Corning Incorporated	Corning, USA
Falcon® Conical Centrifuge Tube, 15 ml	Corning Incorporated	Corning, USA
Falcon® Round Bottom Test Tube, 5ml	Corning Incorporated	Corning, USA
Falcon® Round Bottom Test Tube with 35 µm Cell Strainer Snap Cap, 5 ml	Corning Incorporated	Corning, USA
Falcon® Cell Strainer, 40 µm	Corning Incorporated	Corning, USA
LS Columns	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
Pre-Separation Filters, 30 µm	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
eBioscience™ OneComp eBeads	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Tissue-Tek® Cryomold®, 15 x 15 x 5 mm	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen aan den Rijn, Niederlande
SuperFrost® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzel GmbH & Co. KG, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Liquid Blocker Super Pap Pen	Daido Sangyo Co., Ltd.	Tokyo, Japan

1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Trypan Blue Solution 0.4%, for microscopy	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt solution, 0.5 M in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 2 mol/l - 2 N, Maßlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Sodium metabisulfite ReagentPlus®, ≥99%	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA), lyophilized powder	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Aceton ROTIPURAN® ≥99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

Normal Rabbit Serum Blocking Solution	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA
Peroxidase Block	Dako, Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA
3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) + High Sensitivity Substrate Chromogen	Dako, Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaisers Glycerin-Gelatine Phenolfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) Solution without Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom GmbH, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
N-(2-Hydroxyethyl)piperazineN'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) Buffer Solution, 1 M in H_2O	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer (10X)	BioLegend	San Diego, USA
Nuclease-Free Water, for Molecular Biology	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

MACS-Puffer

50 ml 10X Gibco™ PBS (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

2 ml EDTA disodium salt solution (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

2,5 g BSA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

ad 500 ml Millipore® Wasser (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

FACS-Puffer

50 ml 10X Gibco™ PBS (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

2,5 g BSA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

ad 500 ml Millipore® Wasser (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Lysepuffer

1 ml 10X RBC Lysis Buffer (BioLegend, San Diego, USA)

ad 10 ml Millipore® Wasser (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

PBS-Tween

100 ml 10X Gibco™ PBS (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

2 Tropfen Tween 20 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

ad 1000 ml Millipore® Wasser (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

10 % Normal-Rabbit-Serum

1 ml Normal-Rabbit-Serum (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

ad 10 ml PBS (Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

1.5. Enzyme**Tabelle 5: Verwendete Enzyme**

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Deoxyribonuclease I bovine, Buffered Aqueous Glycerol Solution	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Collagenase, Type 4, Filtered	CellSystems GmbH	Troisdorf, Deutschland
Collagenase from Clostridium histolyticum, Type I	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Die Kollagenase I wurde entsprechend einer Konzentration von 10.000 units/ ml in PBS (Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		
Collagenase from Clostridium histolyticum, Type XI	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Die Kollagenase XI wurde entsprechend einer Konzentration von 12.500 units/ ml in PBS (Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		
Hyaluronidase from Bovine Testes, Type I-S	Sigma-Aldrich, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Die Hyaluronidase wurde entsprechend einer Konzentration von 12.000 units/ ml in PBS (Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		

Enzymatischer Verdau mix zur Analyse bzw. Isolation von Endothelzellen

Gesamtvolumen 1 ml/ Probe:

10 mg Collagenase IV (CellSystems GmbH, Troisdorf, Deutschland)

16 µl Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

ad 1000 µl PBS (Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Enzymatischer Verdaumix zur Analyse von Leukozytenpopulationen

Gesamtvolumen 1 ml/ Probe:

45 µl Collagenase I 10.000 units/ ml (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

10 µl Collagenase XI 12.500 units/ ml (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

5 µl Hyaluronidase 12.000 units/ ml (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

3,7 µl Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

20 µl HEPES Buffer (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

ad 1000 µl PBS (Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

1.6. Antikörper, fluorchromkonjugierte Proteine und Magnetbeads**Tabelle 6: Verwendete Antikörper und fluorchromkonjugierte Proteine**

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Phycoerythrin (PE) anti-mouse/human CD45R/B220 Antibody, Clone: RA3-6B2	BioLegend	San Diego, USA
PE anti-mouse CD49b (pan-NK cells) Antibody, Clone: DX5	BioLegend	San Diego, USA
PE anti-mouse CD90.2 (Thy-1.2) Antibody, Clone: 53-2.1	BioLegend	San Diego, USA
PE anti-mouse NK-1.1 Antibody, Clone: PK136	BioLegend	San Diego, USA
PE anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Antibody, Clone: TER-119	BioLegend	San Diego, USA
PE anti-mouse Ly-6G Antibody, Clone: 1A8	BioLegend	San Diego, USA
Biotin anti-mouse CD115 (CSF-1R) Antibody, Clone: AFS98	BioLegend	San Diego, USA
Biotin anti-mouse CD102 (ICAM2) Antibody, Clone: 3C4 (MIC2/4)	BioLegend	San Diego, USA
Brilliant Violet (BV) 421™ anti-mouse CD31 Antibody, Clone: 390	BioLegend	San Diego, USA
Brilliant Violet 421™ anti-mouse Ly-6C Antibody, Clone: HK1.4	BioLegend	San Diego, USA
Brilliant Violet 510™ Streptavidin	BioLegend	San Diego, USA
Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Rat Anti-Mouse CD62P (P-Selectin), Clone: RB40.34	BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
FITC anti-mouse Ly-6C Antibody, Clone: HK1.4	BioLegend	San Diego, USA

Peridinin-chlorophyll-protein complex/cyanine 5.5 (PerCP/Cy5.5) anti-mouse CD45.2 Antibody, Clone: 104	BioLegend	San Diego, USA
PE/Cyanine 7 (Cy7) anti-mouse F4/80 Antibody, Clone: BM8	BioLegend	San Diego, USA
PE/Cy7 anti-mouse CD106 (VCAM1) Antibody, Clone: 429 (MVCAM.A)	BioLegend	San Diego, USA
Allophycocyanin (APC) anti-mouse CD54 (ICAM1) Antibody, Clone: YN1/1.7.4	BioLegend	San Diego, USA
APC/Cy7 anti-mouse CD107a (LAMP-1) Antibody, Clone: 1D4B	BioLegend	San Diego, USA
APC/Cy7 anti-mouse/human CD11b Antibody, Clone: M1/70	BioLegend	San Diego, USA
Purified anti-mouse/human CD11b Antibody, Clone M1/70	BioLegend	San Diego, USA
Purified anti-mouse Ly-6G Antibody, Clone 1A8	BioLegend	San Diego, USA
Purified Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend	San Diego, USA
Purified Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend	San Diego, USA
Biotinylated Rabbit Anti-Rat IgG Antibody, mouse adsorbed	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, USA

Tabelle 7: Verwendete Magnetbeads

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland

1.7. Primer und Assays

Tabelle 8: Verwendete Primer und Assays

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
TaqMan® Gene Expression Assay Mm99999915_g1, VIC-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
TaqMan® Gene Expression Assay Mm00516023_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
TaqMan® Gene Expression Assay Mm00494862_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
TaqMan® Gene Expression Assay Mm01320970_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
TaqMan® Gene Expression Assay Mm00441278_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
TaqMan® Gene Expression Assay Mm01295931_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

TaqMan® Gene Expression Assay Mm00441242_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
TaqMan® Gene Expression Assay Mm04207460_m1, FAM-MGB	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

1.8. Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 9: Verwendete kommerziell erhältliche Kits

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Arcturus™ PicoPure™ RNA Isolation Kit	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Noradrenalin High Sensitive ELISA	DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH	Hamburg, Deutschland
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

1.9. Geräte, Zubehör und Softwares

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Zubehör

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
Stemi 2000	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Leica DMRB	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Leica DFC450C	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, USA
Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Leica CM1850 Kryostat	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland
Tissue Homogenizer TH220	Omni International	Kennesaw, USA
Soft Tissue Tip™ Plastic Homogenizing Probes (7mm x 110 mm)	Omni International	Kennesaw, USA
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
BLAUBRAND® Zählkammer Neubauer improved	BRAND GMBH + CO KG	Wertheim, Deutschland
LSRFortessa	BD Biosciences, Becton, Dick- inson and Company	Franklin Lakes, USA

FACSAria III	BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Infinite M200 PRO	Tecan Group, Ltd.	Männedorf, Schweiz

Tabelle 11: Verwendete Softwares

Produkt	Firma	Firmenhauptsitz
FACSDiva™ Software v8.0.1/ v6.1.3	BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
FlowJo v8.7/ v9	BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
LAS V4.5	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
ImageJ 1.52a	National Institutes of Health	Bethesda, USA
ViiA™ 7 Software v1.2.2	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
i-control™ Microplate Reader Software 2.0	Tecan Group, Ltd.	Männedorf, Schweiz
GraphPad Prism 7/ 8	GraphPad Software	San Diego, USA

2. Versuchstiere

2.1. Mauslinien

Alle Mauslinien wurden kommerziell über „The Jackson Laboratory“ (Strain: B6.129P2-Apo^{tm1Unc}/J, Stock: 002052; Strain: C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J, Stock: 004353) erworben und im Anschluss in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München unter unten beschriebenen Bedingungen weitergezüchtet. Die verwendeten Versuchstiere stammten aus der hausinternen Weiterzucht.

ApoE-Knockout-Mäuse (B6.129P2-Apo^{tm1Unc}/J)

Es wurden ApoE-defiziente Mäuse mit einem genetischen C57BL/6J-Hintergrund eingesetzt. ApoE-Knockout-Mäuse sind in der wissenschaftlichen Forschung ein etabliertes Tiermodell zur Erforschung der Atherosklerose (Getz and Reardon 2012) (siehe I.3.1).

UBC-GFP-Mäuse (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J)

Es wurden transgene Ubiquitin C (UBC)- Green Fluorescent Protein (GFP)-Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund verwendet. Die hämatopoetischen Zellen dieser Tiere weisen, reguliert durch den humanen Ubiquitin C-Promotor, hohe Level an GFP auf. Diese Eigenschaft lässt sich als Unterscheidungskriterium in adoptiven Zelltransferexperimenten nutzen (siehe III.3.2.4). (Schaefer et al. 2001)

2.2. Haltung und Zucht

Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in individuell ventilierten Käfigen, die mit HEPA-gefilterter Raumluft bei konstantem Mikroklima belüftet wurden. Die Käfige wurden mit Nistmaterial und Häusern aus Zellstoff oder Plastik als Beschäftigung für die Tiere ausgestattet und die Einstreu einmal pro Woche gewechselt. Um ein möglichst natürliches Umfeld für die Tiere zu schaffen, wurde der Tag-Nacht-Rhythmus durch abwechselnde Hell- und Dunkelphasen von je 12 h Dauer simuliert. Außerdem wurden die Tiere ihrem Sozialverhalten entsprechend in Gruppen gehalten. Lediglich einige Männchen mussten aufgrund aggressiven Verhaltens separiert werden. Wasser und Futter erhielten die Tiere ad libitum.

Zur Zucht wurden Tiere ab einem Alter von acht Wochen eingesetzt. Sie wurden bis zu einem Alter von maximal 40 Wochen in 1:1 oder 1:2 Verhältnissen als Dauerverpaarungen gehalten. Bei Trächtigkeit wurden die Männchen von den Weibchen getrennt. Die Jungtiere wurden nach drei bis vier Wochen von den Müttern abgesetzt.

3. Tierversuche

Alle Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und gemäß den geltenden Tierschutzverordnungen unter Mithilfe der Tierärztin Anna-Lena Steinsiek durchgeführt (Aktenzeichen: ROB 55.2-1-54-2532.Vet_02-15-244).

3.1. Tiermodelle

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen diene ein murines Atherosklerosemodell. Anhand dessen wurden durch Einsatz von psychosozialen Stressmodellen die Auswirkungen von akutem Stress auf atherosklerotische Läsionen untersucht. Bei einem Versuchsansatz wurde zusätzlich ein chemisches Sympathektomiemodell angewendet.

3.1.1. Atherosklerosemodell

ApoE-Knockout-Mäuse wurden als murines Atherosklerosemodell herangezogen (siehe I.3.1). Die Mäuse erhielten ab einem Alter von sechs Wochen anstelle des normalen Tierfutters eine HFD (Massenanteil Fett 21%, Massenanteil Cholesterol 0,2%). Sie wurden für sechs bis acht Wochen mit der HFD gefüttert und anschließend dem jeweiligen Versuch zugeführt.

3.1.2. Psychosoziale Stressmodelle

Um die Auswirkungen von akutem psychosozialen Stress zu untersuchen, wurden zwei verschiedene psychosoziale Stressmodelle angewendet.

Immobilisationsstress

Zum einen wurde eine Immobilisation der Versuchstiere zur Simulation von psychosozialen Stress eingesetzt (siehe I.3.2). Hierbei wurden die Mäuse einmalig für 3 h oder an drei aufeinanderfolgenden Tagen je einmal täglich für 3 h (3 x 3 h) immobilisiert, um akuten psychosozialen Stress zu simulieren. Die Tiere wurden zur Immobilisation in einen Maushalter überführt (siehe Abbildung 6 a/ b), der sie räumlich stark einengt ohne sie zu komprimieren oder ihre Extremitäten zu fixieren. Die Größe des Maushalters konnte mithilfe eines verschiebbaren Nasenkonus für jede Maus entsprechend angepasst werden. Öffnungen an den Seitenwänden des Maushalters bzw. im Nasenkonus ermöglichten eine ungehinderte Atmung der Tiere während der Immobilisation. Nach 3 h wurden die Tiere aus dem Maushalter entlassen und in der Regel maximal 24 h nach der letzten Stressepisode der finalen Probengewinnung zugeführt. Bei einem Versuchsaufbau erfolgte eine Nachverfolgung der Tiere für 72 h.



Abbildung 6: Maushalter zur Immobilisation der Versuchstiere

a) Verwendetes Modell (Kent Scientific Corporation n.d.).

b) Schematische Darstellung des immobilisierten Versuchstieres im Maushalter.

Räuber-Beute-Stress

Zum anderen wurde der synthetische Geruchsstoff TMT zur Induktion von Räuber-Beute-Stress als psychosoziales Stressmodell eingesetzt (siehe I.3.2). Hierfür wurden Tierkäfige mit dem Geruchsstoff präpariert. Ein Mulltupfer wurde mit 280 µl 2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (97%) getränkt, in ein 50 ml Falconröhrchen gelegt und das Falconröhrchen mit der Öffnung nach schräg oben an der Innenseite eines Käfigs vom Typ I L befestigt. Jeweils zwei Mäuse wurden in einen so präparierten Käfig überführt und ein Filterdeckel aufgesetzt. Die Tiere wurden 3 h in dem Käfig belassen, um akuten psychosozialen Stress zu simulieren und danach der finalen Probengewinnung zugeführt.

3.1.3. Chemisches Sympathektomiemodell

Es wurde das Neurotoxin 6-OHDA zur Schaffung eines chemischen Sympathektomiemodells eingesetzt (siehe I.3.3). Die Mäuse erhielten zwei Injektionen 6-OHDA intraperitoneal (i.p.), um eine periphere chemische Sympathektomie zu erzielen. Die erste Injektion (100 mg 6-OHDA/ kg Körpergewicht gelöst in 250 µl PBS i.p.) wurde den Mäusen sechs Tage vor dem geplanten Versuch verabreicht. Die zweite Injektion (250 mg 6-OHDA/ kg Körpergewicht gelöst in 500 µl PBS i.p.) erfolgte vier Tage vor dem geplanten Versuch. Bis zum Versuchsbeginn verblieben die Tiere in ihren Käfigen und wurden dann den entsprechenden Versuchsbedingungen zugeführt.

3.2. Versuchsbeschreibungen

Das oben beschriebene murine Atherosklerosemodell (siehe III.3.1.1) war der Ausgangspunkt für alle durchgeführten Versuche. Die mit HFD gefütterten Tiere wurden unter Berücksichtigung von Alters- und Geschlechtsverteilung für die einzelnen Experimente in eine Versuchs- bzw. Kontrollgruppe aufgeteilt. In der Regel wurden die Tiere der Versuchsgruppe einer Stressprozedur ausgesetzt und ihre Ergebnisse mit denen der nicht-gestressten Kontrollgruppe verglichen. Abweichungen von diesem Schema bei einzelnen Versuchen werden im Folgenden explizit erwähnt.

3.2.1. Analysen nach Immobilisationsstress

Versuchsaufbau

Die Tiere der Versuchsgruppe wurden nach oben dargestellter Methode Immobilisationsstress ausgesetzt. Anschließend wurden ihnen zusammen mit den nicht-gestressten Kontrolltieren Blut und Aorten für nachfolgende Untersuchungen entnommen, um stressinduzierte Veränderungen zu analysieren. Dieses Vorgehen kam bei mehreren Kohorten zur Anwendung, um ausreichend Probenmaterial für verschiedene Analysen zu gewinnen. Die jeweilige Gruppengröße kann den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden.

Probengewinnung

Die Tiere wurden zur Narkoseeinleitung in eine mit Isofluran geflutete Ganzkörperkammer überführt (5 Vol.% Isofluran in 100% Sauerstoff, Durchflussrate 1,6 - 1,8 l/ min). Nach Erreichen einer angemessenen Narkosetiefe wurden die Mäuse aus der Kammer herausgenommen. Ihr Kopf wurde in einem 50 ml Falconröhrchen mit einer Isofluran-getränkten Mullkompressen im Inneren platziert, um die Narkose aufrecht zu erhalten. Die Tiere wurden auf den Rücken gedreht und Brust und Bauch desinfiziert. Es folgte die Euthanasierung der Tiere durch Exsanguination. Dazu wurde die Haut über dem Sternum entfernt und das Herz durch den 2. Interkostalraum links parasternal mit einer 24 Gauge Kanüle mit aufgesetzter Spritze

punktiert. Pro Tier konnten durchschnittlich 1,0 - 1,5 ml Blut aspiriert werden. Als Nächstes wurde der Thorax eröffnet und die Vena cava caudalis durchtrennt. Dann wurde an der Herzspitze in den linken Ventrikel eingestochen und mit 10 ml PBS gründlich gespült. Die Aorta wurde unter einem Operationsmikroskop freipräpariert und von der Aortenwurzel mitsamt der Aortenklappe bis zur Iliakalbifurkation entnommen. Die Gefäßabgänge wurden dabei am Aortenbogen nach 2 mm, im Bereich des übrigen Gefäßverlaufs möglichst aortennah abgesetzt. Abschließend wurde anhaftendes Gewebe entfernt.

Probenverwendung und -analyse

Die gewonnenen Proben wurden für verschiedene Analysen verwendet. Eine genaue Übersicht ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht über Verwendung der Proben aus Immobilisationsstress-Versuchen (ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, qPCR = quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion)

Probenmaterial	Verwendungszweck	Probenvorbereitung
Blut aus Herzpunktion	ELISA Bestimmung von LDL/ Gesamtcholesterin im Plasma	Siehe III.8 Überführung in EDTA Monovetten → Analyse durch Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrums München
Aorta (im Ganzen)	Analyse und Isolation von Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie qPCR der isolierten Endothelzellen	Siehe III.5 (Enzymatischer Verdaumix und Antikörpermischung zur Analyse bzw. Isolation von Endothelzellen) Siehe III.7
Aortenwurzel mit Aortenklappe	Immunhistochemie	Siehe III.6
Aortenbogen mit Adventitia	ELISA	Siehe III.8

3.2.2. Analysen nach Räuber-Beute-Stress

Versuchsaufbau

Es wurden sechs Tiere nach oben beschriebener Methode Räuber-Beute-Stress ausgesetzt. Anschließend wurden Blut und Aorten der Tiere ebenso wie die von sechs nicht-gestressten Kontrollen entnommen und analysiert.

Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte analog zum unter III.3.2.1 geschilderten Vorgehen. Zusätzlich wurde vor der Punktion des Herzens Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Dazu wurden unter Isoflurannarkose die Halsvenen der Tiere mittels Nackengriff gestaut und

der Venenplexus mit einer heparinisierten Blutkapillare über den medialen Augenwinkel punktiert. Es wurden zwei Kapillaren Blut pro Tier abgenommen.

Probenverwendung und -analyse

Die entnommenen Aorten und das aus der Punktion des retrobulbären Venenplexus stammende Blut wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe III.5, enzymatischer Verdau-mix und Antikörpermischung zur Analyse von Leukozytenpopulationen). Das aus der Herzpunktion gewonnene Blut wurde nach der Entnahme in EDTA Monovetten überführt und sein Gehalt an LDL bzw. Gesamtcholesterin im Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrums München bestimmt.

3.2.3. Kinetik nach Immobilisationsstress

Versuchsaufbau

Es wurden fünf Tiere nach oben beschriebener Methode für 3h Immobilisationsstress ausgesetzt und das Blut der Mäuse im zeitlichen Verlauf nach der Stressexposition untersucht. Dazu wurde den Tieren direkt vor und nach der Stressprozedur sowie 6 h, 24 h, 48 h und 72 h poststress Blut für nachfolgende Untersuchungen entnommen. Im Anschluss wurden die Tiere euthanasiert.

Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte jeweils durch Punktion der Vena facialis. Zur Einleitung einer kurzzeitigen Narkose wurden die Tiere in eine mit Isofluran geflutete Ganzkörperkammer überführt. Nach Verlust der Stellreflexe wurden die Mäuse manuell fixiert und die Halsvenen mittels Nackengriff gestaut. Nun wurde mit einer Lanzette 3 - 4 mm dorsokaudal des Haarwirbels an der Mandibula eingestochen. Der erste Blutstropfen wurde verworfen. Das austretende Blut wurde dann in einer heparinisierten Blutkapillare aufgefangen. Nach der Blutentnahme wurde der Nackengriff gelöst und die Blutung durch Kompression mit einem Wattestäbchen gestillt. Die Blutentnahmen wurden abwechselnd an der rechten bzw. linken Seite durchgeführt.

Probenverwendung und -analyse

Die gewonnenen Blutproben wurden zur Leukozytenzählung mittels Neubauer-Zählkammer verwendet (siehe III.5).

3.2.4. Adoptiver Zelltransfer

Versuchsaufbau

Im Rahmen dieses adoptiven Zelltransferexperiments wurden Leukozyten aus GFP-positiven in GFP-negative Tiere injiziert. Im Empfängertier konnten die übertragenen GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer grünen Fluoreszenz von den tiereigenen

GFP-negativen Leukozyten unterschieden werden. Dies erlaubte eine genaue Nachverfolgung der injizierten Zellen im Empfängertier.

Als Spendertiere dienten sechs UBC-GFP-Mäuse. Aus deren Knochenmark wurden mittels immunmagnetischer Separation CD115- und Ly6G-positive Zellen isoliert (siehe III.4) und anschließend in 3620 µl PBS suspendiert. Als Empfängertiere wurden zehn mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse verwendet. Die Empfängertiere wurden in eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe mit je fünf Tieren aufgeteilt. Alle Empfängertiere erhielten zeitgleich jeweils 300 µl der gewonnenen GFP-positiven Zellsuspension intravenös injiziert. Die Applikation erfolgte unter kurzer Isoflurannarkose mittels 30 Gauge Einmalspritze in den retrobulbären Venenplexus (jeweils 150 µl pro Seite). Nach der Injektion wurden die Tiere der Kontrollgruppe in ihre Käfige zurückgesetzt. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden zunächst für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt und anschließend in ihre Käfige überführt. Am nächsten Tag, 24 h nach Injektion der GFP-positiven Zellsuspension, wurden die Aorten aller Empfängertiere für nachfolgende Untersuchungen entnommen (siehe Abbildung 7).

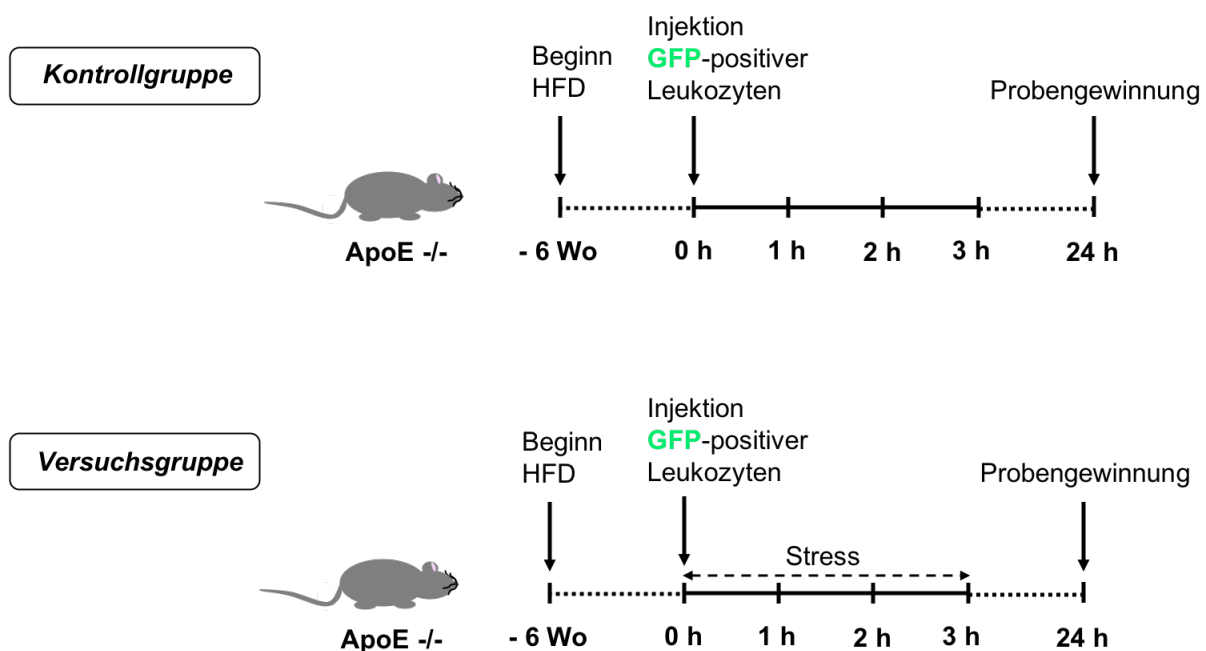


Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau des adoptiven Zelltransferexperiments
(in Anlehnung an Hinterdobler, Schott, et al. 2021)

Probengewinnung

Gewinnung CD115- und Ly6G-positiver Zellen aus UBC-GFP-Mäusen

Zur späteren Kompensation des Durchflusszytometers wurden einem der Tiere wie unter III.3.2.2 beschrieben zwei Kapillaren Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Dann wurden alle UBC-GFP-Mäuse mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurden den Tieren beidseits das Os coxae, Femur, Tibia und Humerus sowie die Wirbelsäule

entnommen. Die Knochen wurden gründlich gesäubert, von anhaftender Muskulatur bzw. Rückenmark befreit und das Knochenmark in Form einer Zellsuspension herausgelöst. Dazu wurden die gesäuberten Knochen jeder Spendermaus separat mit etwas MACS-Puffer in einen Mörser überführt und gründlich zerrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde durch einen 40 µm Filter in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Knochenreste wurden im Mörser belassen und nochmals mit etwas MACS-Puffer gemörsert. Die so entstandene Zellsuspension wurde wiederum in das 50 ml Falconröhrchen filtriert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis das gesamte Knochenmark aus den Knochen herausgelöst war. Anschließend wurden aus der gewonnenen Zellsuspension die CD115- und Ly6G-positiven Zellen mittels immunmagnetischer Separation isoliert. Die genaue Vorgehensweise ist unter III.4 aufgeführt.

Aortenentnahme aus ApoE-Knockout-Mäusen

Am Versuchsende wurden die Aorten der ApoE-Knockout-Mäuse entnommen. Die Entnahme wurde wie unter III.3.2.1 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden auch hier einem Tier zwei Kapillaren Blut aus dem retrobulbären Venenplexus zur späteren Kompensation des Durchflusszytometers entnommen.

Probenverwendung und -analyse

Aus den GFP-positiven Knochenmarkszellen wurden mittels immunmagnetischer Separation CD115- und Ly6G-positive Zellen isoliert (siehe III.4). Diese wurden im Rahmen des adoptiven Zelltransfers in ApoE-Knockout-Mäuse übertragen. Die am Versuchsende entnommenen Aorten der ApoE-Knockout-Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe III.5, enzymatischer Verdaumix und Antikörpermischung zur Analyse von Leukozytenpopulationen nach adoptiven Zelltransferexperimenten). Die gewonnenen Blutproben dienten zur Kompensation des Durchflusszytometers und wurden nicht mit Antikörpern gefärbt.

3.2.5. Adoptiver Zelltransfer nach chemischer Sympathektomie

Versuchsaufbau

Der Versuch wurde an zwei Kohorten mit HFD gefütterten ApoE-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die jeweils sechs (Kohorte 1) bzw. fünf (Kohorte 2) Tiere der Versuchsgruppe wurden entsprechend dem oben beschriebenen Sympathektomiemodell mit 6-OHDA behandelt. Den jeweils sechs (Kohorte 1) bzw. fünf (Kohorte 2) Tieren der Kontrollgruppe wurden anstelle von 6-OHDA analoge Mengen reines PBS injiziert. Anders als bei den vorhergehenden Versuchen lag hier der Unterschied zwischen den Gruppen also in der Anwendung einer chemischen Sympathektomie und nicht in der Anwendung eines Stressmodells. Einer Stressprozedur wurden bei diesem Versuchsaufbau alle Tiere unterzogen.

Nach der Vorbehandlung der Tiere mit 6-OHDA bzw. PBS wurde ein adoptiver Zelltransfer durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Beschreibung unter III.3.2.4. In diesem Fall wurden

acht (Kohorte 1) bzw. sieben (Kohorte 2) UBC-GFP-Mäuse als Spendertiere verwendet. Aus ihren Knochen wurden mittels immunmagnetischer Separation CD115- und Ly6G-positive Zellen isoliert und die Zellen in 3620 μ l (Kohorte 1) bzw. 3200 μ l (Kohorte 2) PBS suspendiert. Als Empfängertiere dienten in diesem Fall die vorbehandelten ApoE-Knockout-Mäuse. Ihnen wurden jeweils 300 μ l der gewonnenen GFP-positiven Zellsuspension unter kurzer Isoflurannarkose intravenös in den retrobulbären Venenplexus injiziert (jeweils 150 μ l pro Seite). Im Unterschied zur obigen Beschreibung des adoptiven Zelltransferexperiments wurden hier anschließend alle Tiere für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt (siehe Abbildung 8).

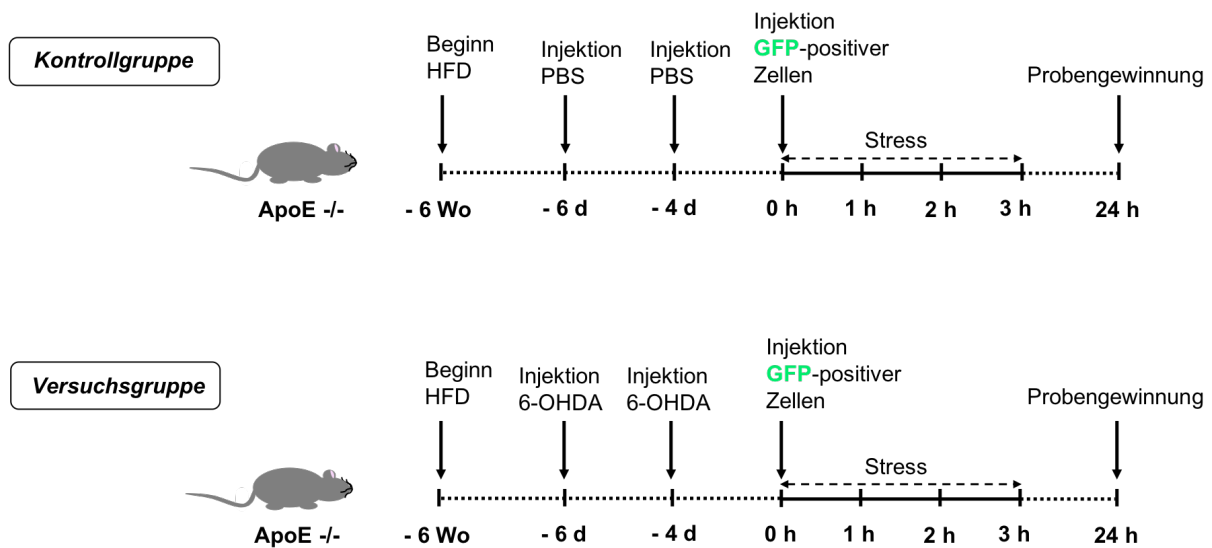


Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau des adoptiven Zelltransferexperiments nach chemischer Sympathektomie

(in Anlehnung an Hinterdobler, Schott, et al. 2021)

Probengewinnung

Es wurde wie unter III.3.2.4 beschrieben vorgegangen.

Probenverwendung und -analyse

Die Probenverwendung und -analyse erfolgte analog wie unter III.3.2.4 beschrieben.

4. Magnetic cell separation

Allgemeines Prinzip

Die von Miltenyi et al. entwickelte magnetic cell separation (MACS) ist eine Form der immunmagnetischen Separation. Sie ermöglicht, definierte Zelltypen anhand ihrer Oberflächenantigene aus einer heterogenen Zellsuspension zu isolieren. Dazu werden die Zielzellen anhand ihrer exprimierten Antigene mit superparamagnetischen Magnetbeads markiert und die Zellsuspension auf eine spezielle Trennsäule aufgetragen. Die Trennsäule ist von einem starken

Dauermagneten umgeben und enthält eine ferromagnetische Matrix. Die superparamagnetischen Magnetbeads weisen eine hohe Magnetisierung innerhalb dieses Magnetfeldes auf, sodass die Magnetbead-markierten Zielzellen durch die magnetischen Kräfte innerhalb der Trennsäule zurückgehalten werden. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Trennsäule ungehindert (siehe Abbildung 9). (Miltenyi et al. 1990)

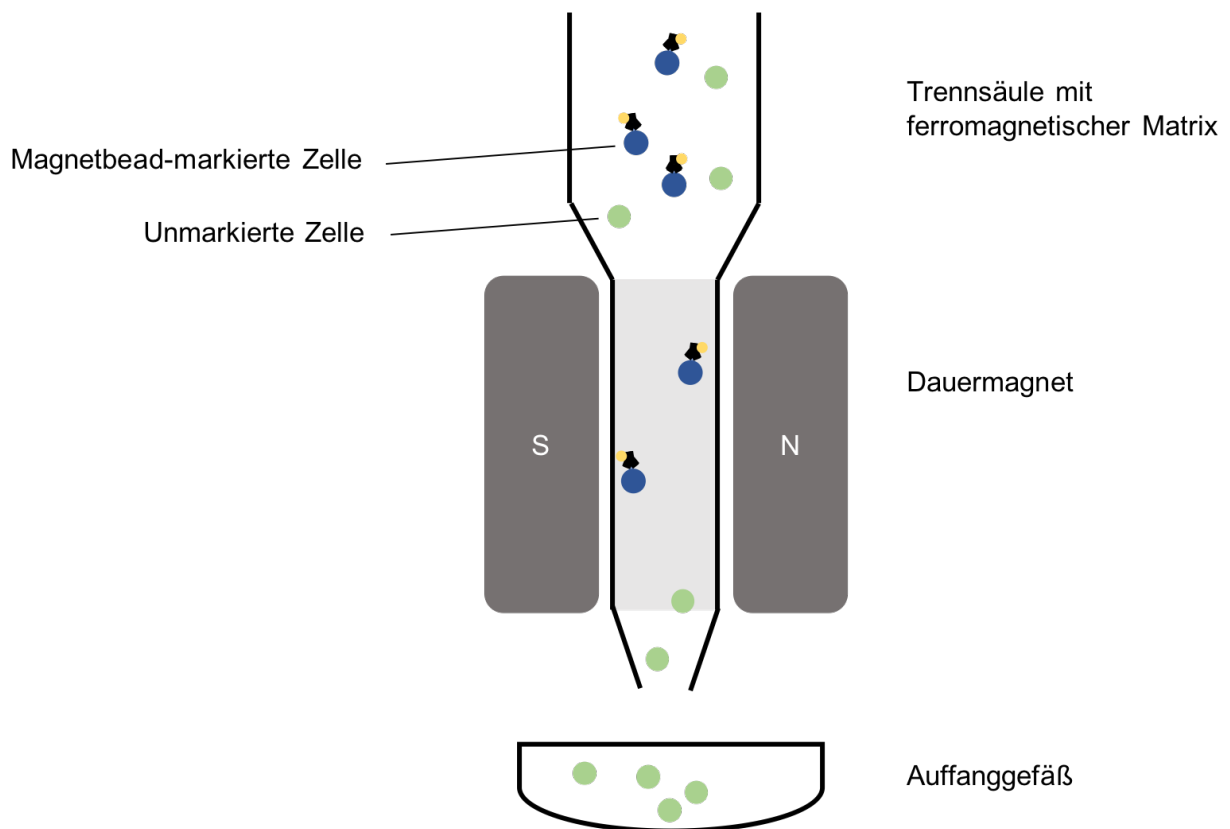


Abbildung 9: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation mithilfe einer MACS-Trennsäule

(in Anlehnung an Miltenyi et al. 1990)

Es können verschiedene Separationsstrategien angewendet werden: Bei der oben beschriebenen positiven Selektion werden die gewünschten Zellen mit Magnetbeads markiert und in der Trennsäule zurückgehalten. Entfernt man die Trennsäule aus dem Magneten, können die Zielzellen aus der demagnetisierten Säule eluiert werden. Demgegenüber werden bei einer negativen Selektion die Nicht-Zielzellen magnetisch markiert. Diese werden dann in der Trennsäule zurückgehalten, wohingegen die Zielzellen die Trennsäule passieren und direkt aufgefangen werden können. (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG n.d.; Luttmann 2009)

Bei den durchgeführten Versuchen wurde eine positive Selektion angewendet. Die Zielzellen wurden dabei indirekt mit den Magnetbeads markiert (siehe Abbildung 10 a/ b). Für die indirekte Markierung wurden die Zellen mit einem fluorochrom-gekoppelten Primärantikörper

konjugiert. Dann wurden Magnetbeads zugegeben, die an einen entsprechenden Anti-Fluorochrom Antikörper gekoppelt waren. So fungierte das Fluorochrom als Brücke zwischen dem an den Zielzellen gebundenen Primärantikörper und den Magnetbeads. Alternativ wurden ein biotinylierter Primärantikörper und Streptavidin-Magnetbeads zur Zellmarkierung verwendet.

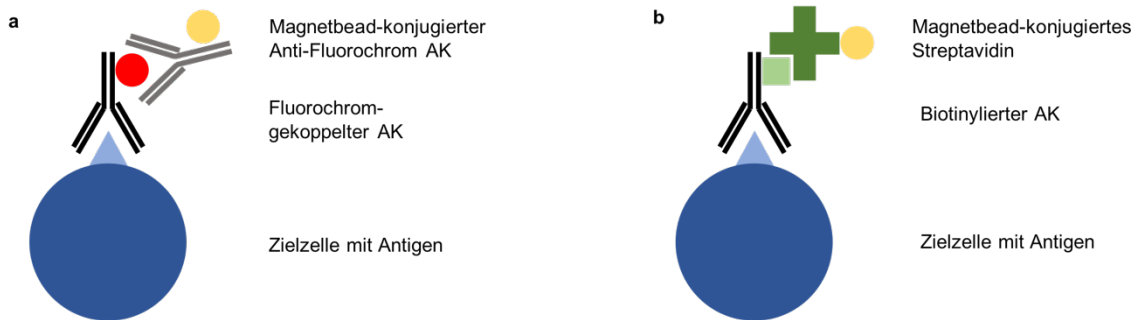


Abbildung 10: Schematische Darstellung der indirekten immunomagnetischen Markierung

a) Fluorochrom-abhängige Markierung.

b) Biotin-Streptavidin-abhängige Markierung.

(AK = Antikörper)

(in Anlehnung an Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG n.d.)

Probenvorbereitung

Die gewonnene Knochenmarkszellsuspension wurde bei 400 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Durchführung

Die im Folgenden beschriebene Zellisolation erfolgte separat für jede Spendermaus. Die resuspendierten Knochenmarkszellen der Tiere wurden mit 4,5 µl eines biotinylierten Anti-CD115 Antikörpers sowie 4,5 µl eines PE-konjugierten Anti-Ly6G Antikörpers für 30 min inkubiert. Danach wurde MACS-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml hinzugefügt und die Zellsuspension durch einen 40 µm Filter in ein neues 50 ml Falconröhrchen dekantiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 g und 4 °C für 8 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension mit 70 µl Streptavidin-Magnetbeads und 70 µl Anti-PE-Magnetbeads für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde erneut MACS-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml zugegeben und die Zellsuspension durch einen 40 µm Filter in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 400 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Vorbereitung der Zellseparation wurde die Trennsäule in die Dauermagnetvorrichtung eingesetzt. Die Säule wurde mit einem 30 µm Filter versehen und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Nun wurde das zentrifugierte Zellpellet in 2,5 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule aufgetragen. Das Falconröhrchen, aus dem die

Zellsuspension entnommen wurde, wurde mit 1 ml MACS-Puffer gespült und die Flüssigkeit zur Zellsuspension in der Trennsäule hinzugefügt. Nachdem die gesamte Flüssigkeit die Trennsäule durchlaufen hatte, wurde die Säule drei Mal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. Nun wurde der aufgesetzte Filter entfernt, die Säule aus der Magnetvorrichtung genommen und auf ein 15 ml Falconröhrchen aufgesetzt. Es wurden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule aufgetragen und mit dem mitgelieferten Stempel rasch durch die Säule gepresst, um die in der Säule zurückgehaltenen Zellen zu eluieren. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 400 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die isolierten Zellen wurden nun in PBS resuspendiert und die Proben der einzelnen Spendermäuse gepoolt. Das Resuspensionsvolumen wurde in Abhängigkeit der für den Versuch benötigten Menge gewählt. Es kann den entsprechenden Versuchsbeschreibungen (siehe III.3.2.4 und III.3.2.5) entnommen werden.

5. Durchflusszytometrie

Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, Zellen aus einer Zellsuspension heraus einzeln mithilfe von Laserstrahlen zu charakterisieren. Als Charakterisierungsmerkmale dienen u.a. Zellgröße und -granularität. Außerdem können oberflächliche oder intrazelluläre Zellstrukturen mit fluorchromgekoppelten Antikörpern markiert und so ebenfalls erfasst werden. Im Durchflusszytometer wird die Zellsuspension als laminarer Probenstrom von Trägerflüssigkeit umgeben in die Messküvette transportiert. Hier passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl, was zur Lichtstreuung führt. Das Streulicht wird von verschiedenen Detektoren registriert. Das Vorwärtstreulicht oder auch Forward Scatter (FSC) wird in der Achse des einfallenden Laserstrahls erfasst und dient als Maß für die Größe der Zelle. Das Seitwärtstreulicht oder auch Side Scatter (SSC) wird im 90° Winkel zum Laserstrahl detektiert und ist proportional zur Granularität der Zelle. Zusätzlich werden durch den Laserstrahl die über Antikörper an die Zelle gebundenen Fluorochrome angeregt, was in der Folge eine Fluoreszenzemission auslöst. Jedes Fluorochrom besitzt ein spezifisches Emissionsspektrum, emittiert nach der Anregung also Licht in einem spezifischen Wellenlängenbereich. Die Intensität der Fluoreszenz steigt dabei proportional zur Anzahl der gebundenen Fluorochrome. (BD Biosciences 2014)

Die emittierten Fluoreszenzsignale werden ebenso wie das Streulicht im Durchflusszytometer detektiert. Dazu wird das Streu- bzw. Fluoreszenzlicht jeder Zelle über ein komplexes optisches System aus Sammellinsen, optischen Spiegeln und Filtern entsprechend seiner Wellenlängenbereiche aufgeteilt und auf Detektoren gelenkt (siehe Abbildung 11). (BD Biosciences 2014; Luttmann 2014)

Die Detektoren wandeln das Lichtsignal in ein elektronisches Signal um, das dann digital verarbeitet wird (BD Biosciences 2014).

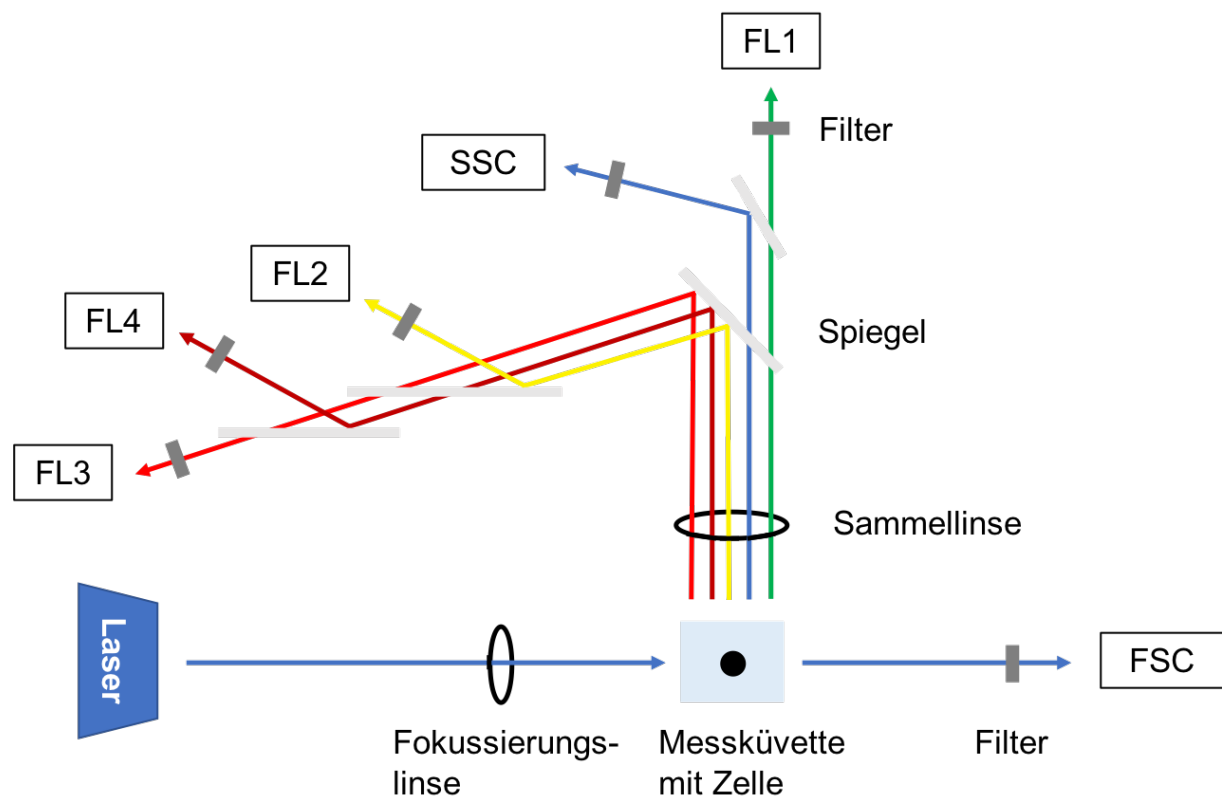


Abbildung 11: Beispielhaftes Schema des optischen Systems eines Durchflusszytometers zur Detektion der optischen Emissionen

(FSC = Detektor für Forward Scatter, SSC = Detektor für Side Scatter, FL1-4 = Fluoreszenzdetektoren)
(modifiziert nach Luttmann 2014; BD Biosciences 2014)

Zusätzlich zur reinen Zellanalyse bieten sogenannte Zellsorter die Möglichkeit, ausgewählte Zellpopulationen aus einer Zellsuspension zu isolieren. Die zu separierende Zellpopulation wird anhand von Streulicht- und Fluoreszenzparametern definiert und kann durch unterschiedliche Methoden isoliert werden. (BD Biosciences 2014)

Eine Möglichkeit besteht darin, den Probenstrom durch Vibrationen in einzelne Tropfen aufzutrennen. Tropfen, die Zellen der definierten Zielpopulation enthalten, werden elektrisch geladen und durch ein elektrisches Feld in ein Auffanggefäß abgelenkt. Die ungeladenen Tropfen passieren das elektrische Feld ohne Ablenkung und werden verworfen. (Herzenberg, Sweet, and Herzenberg 1976)

Die geschützte Handelsmarke FACS, kurz für Fluorescence-activated cell sorting, der Firma Becton Dickinson wird im allgemeinen Sprachgebrauch häufig synonym zur Durchflusszytometrie benutzt.

Probenvorbereitung

Blut

Nach der Entnahme wurde das Blut aus den heparinisierten Kapillaren jeweils in ein 5 ml Falconröhrchen überführt und gevortext. Je 10 µl der einzelnen Blutproben wurden zur späteren Zellzählung aliquotiert. Die restlichen Probenvolumina wurden jeweils mit 3 ml Lysepuffer für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 2 ml PBS zugegeben und die Proben bei 400 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets jeweils in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Aorta

Die entnommenen Aorten wurden jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und pro Probe 1 ml eines enzymatischen Verdaumixes zugegeben. Je nachdem, ob in den Proben Leukozytenpopulationen oder Endothelzellen analysiert bzw. isoliert werden sollten, wurden unterschiedliche Verdaumischungen verwendet (Zusammensetzung siehe III.1.5, Zuordnung zu den Versuchen siehe III.3.2).

Die Aorten wurden im Verdaumix manuell mit Scheren zerkleinert und dann bei 37 °C und 750 rounds per minute für 1 h inkubiert. Bei Proben, die zur Analyse bzw. zur Isolation von Endothelzellen verwendet wurden, wurde die Inkubationsdauer auf 40 min verkürzt. Danach wurden die Suspensionen jeweils durch einen 40 µm Filter in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Reaktionsgefäße, aus denen die Suspensionen entnommen wurden, wurden zwei Mal mit je 1 ml FACS-Puffer gespült und der Puffer ebenfalls in die entsprechenden 50 ml Falconröhrchen filtriert. Nun wurde jeweils FACS-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml zugegeben und die Proben bei 400 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und die Zellpellets in jeweils 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben zur Isolation von Endothelzellen wurden lediglich in 200 µl FACS Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann durch 35 µm Filterdeckel in 5 ml Falconröhrchen filtriert und hieraus jeweils 10 µl der Proben zur späteren Zellzählung aliquotiert. Aus den Proben zur Analyse bzw. Isolation von Endothelzellen wurden keine Aliquots entnommen.

Durchführung

Antikörpermarkierung

Die vorbereiteten Zellsuspensionen wurden mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gefärbt. Dazu wurden je nach Versuchsziel andere Antikörper benutzt und als Antikörpermischungen mit FACS-Puffer (Master Mix I/ II) vorbereitet. Eine Übersicht der verwendeten Antikörpermischungen ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt (siehe Tabelle 13, Tabelle 14 und Tabelle 15). Die Zuordnung, welche Proben mit welchem Antikörpermix gefärbt wurden, kann den entsprechenden Versuchsbeschreibungen unter III.3.2 entnommen werden.

Tabelle 13: Verwendete Antikörpermischungen zur Analyse von Leukozytenpopulationen

Master Mix	Antikörper/ Molekül	Konjugat	Volumen pro Probe (µl)
I	Anti-B220*	PE	0,5
	Anti-CD49b*	PE	0,25
	Anti-CD90.2*	PE	0,1
	Anti-NK1.1*	PE	0,5
	Anti-Ter119*	PE	0,5
	Anti-Ly6G*	PE	0,5
	Anti-CD115	Biotin	0,5
ad 50 µl FACS-Puffer			
II	Streptavidin**	BV510	0,5
	Anti-Ly6C	FITC	0,5
	Anti-CD45.2	PerCP-Cy5.5	1
	Anti-F4/80	PE-Cy7	0,5
	Anti-CD11b	APC-Cy7	0,5
ad 50 µl FACS-Puffer			
* Im Folgenden als hämatopoetische Zelllinienmarker zusammengefasst und bezeichnet.			
**Streptavidin wurde nur bei Blutproben zugegeben.			

Tabelle 14: Verwendete Antikörpermischungen zur Analyse von Leukozytenpopulationen nach adoptiven Zelltransferexperimenten

Master Mix	Antikörper/ Molekül	Konjugat	Volumen pro Probe (µl)
I	Anti-B220	PE	0,5
	Anti-CD49b	PE	0,25
	Anti-CD90.2	PE	0,1
	Anti-NK1.1	PE	0,5
	Anti-Ter119	PE	0,5
	Anti-Ly6G	PE	0,5
ad 50 µl FACS-Puffer			
II	Anti-Ly6C	BV421	0,5
	Anti-CD45.2	PerCP-Cy5.5	1
	Anti-F4/80	PE-Cy7	0,5
	Anti-CD11b	APC-Cy7	0,5
ad 50 µl FACS-Puffer			
Zusätzlich wird die Fluoreszenz der GFP-positiven Zellen im FITC-Kanal detektiert.			

Tabelle 15: Verwendete Antikörpermischungen zur Analyse bzw. Isolation von Endothelzellen

Master Mix	Antikörper/ Molekül	Konjugat	Volumen pro Probe (µl)
I	Anti-ICAM2	Biotin	0,5
	ad 50 µl FACS-Puffer		
II	Anti-CD31	BV421	0,5
	Streptavidin	BV510	0,5
	Anti-P-Selectin	FITC	1
	Anti-CD45.2	PerCP-Cy5.5	1
	Anti-VCAM1	PE-Cy7	3
	Anti-ICAM1	APC	1
	Anti-CD107a	APC-Cy7	1
ad 50 µl FACS-Puffer			

Für die Färbung wurden die Zellsuspensionen jeweils mit 50 µl des entsprechenden Master Mixes I für 15 min inkubiert. Dann wurde je 1 ml FACS-Puffer zugegeben und die Proben bei 400 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in jeweils 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurde dieses Vorgehen mit dem entsprechenden Master Mix II wiederholt.

Bei Versuchen zur Analyse oder Isolation von Endothelzellen wurde zusätzlich eine sogenannte „Fluorescence Minus One Kontrolle“ (FMO) erstellt. Dazu wurden vor Beginn der Antikörperfärbung aus jeder Probe 20 µl entnommen, gepoolt und bis zu einem Gesamtvolumen von 300 µl mit FACS-Puffer versetzt. Die gepoolte Zellsuspension wurde analog zu den Proben gefärbt, jedoch ohne Zugabe des Anti-CD31 Antikörpers.

Für die Kompensation des Durchflusszytometers wurden zudem sogenannte Kompensationsbeads gefärbt. Für jedes verwendete Fluorochrom wurde ein Ansatz aus 20 µl beads, 300 µl FACS-Puffer und 1 µl des jeweiligen fluorochromgekoppelten Antikörpers erstellt. Für das Fluorochrom PE wurden statt der einzelnen Antikörper 50 µl Master Mix I zugegeben. Die Ansätze wurden 15 min inkubiert, mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 600 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für biotinkoppelte Antikörper wurde das Vorgehen im Anschluss mit dem fluorochromgekoppelten Streptavidin wiederholt. Zudem wurde eine ungefärbte Probe aus 20 µl beads und 600 µl FACS-Puffer erstellt.

Probenanalyse

Die Analyse der Proben erfolgte an einem LSRFortessa der Firma BD Biosciences mit der zugehörigen FACSDiva™ Software. Vor der jeweiligen Messung der Proben wurden am Durchflusszytometer die Spannungseinstellungen der Detektoren angepasst und mithilfe der vorbereiteten Kompensationsbeads eine automatische Kompensation durchgeführt. Bei den adoptiven Zelltransferexperimenten wurden zusätzlich die eigens entnommenen GFP-positiven bzw. GFP-negativen Blutproben zur Kompensation des Durchflusszytometers verwendet.

Zellisolation

Die Isolation der Endothelzellen wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Michael Hristov am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der LMU München durchgeführt. Die Zellisolation erfolgte an einem FACS Aria III der Firma BD Biosciences mit der entsprechenden FACSDiva™ Software. Auch hier wurde zuerst eine automatische Kompensation mithilfe der vorbereiteten Kompensationsbeads vorgenommen. Dann wurden mithilfe entsprechender Gatingstrategien (s. u.) die in den Proben enthaltenen Endothelzellen als Zielpopulation definiert und in PCR cleane 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 100 µl Extraktionspuffer aus dem Arcturus™ PicoPure™ RNA Isolation Kit separiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Auswertung

Leukozytenzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Aliquots der Proben wurden zur Zellzählung entweder mit Trypanblau oder Lysepuffer versetzt (siehe Tabelle 16). Dies erleichterte die Zellzählung, indem Erythrozyten durch den Lysepuffer eliminiert bzw. durch Zugabe von Trypanblau eine Differenzierung von vitalen und avitalen Zellen erreicht wurde.

Tabelle 16: Übersicht über Verdünnung der Probenaliquots zur Zellzählung

Probenmaterial	Volumen Probenaliquot	Zusatz	Volumen Zusatz	Verdünnungsfaktor
Blut	10 µl	Lysepuffer	190 µl	20
Aorta	10 µl	Trypanblau	10 µl	2

Jeweils 10 µl der verdünnten Aliquots wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter einem Lichtmikroskop die Anzahl an Leukozyten in jeweils vier Großquadranten der Zählkammer (Volumen 0,1 mm³ pro Quadrat) manuell bestimmt. Die Gesamtleukozytenzahl pro ml Probe wurde dann anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{Leukozytenzahl pro ml Probe} = \frac{\left(\frac{Q_1}{0,1 \mu\text{l}} + \frac{Q_2}{0,1 \mu\text{l}} + \frac{Q_3}{0,1 \mu\text{l}} + \frac{Q_4}{0,1 \mu\text{l}} \right)}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Q_x = Anzahl gezählter Leukozyten
in Quadrat x

Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Zur Auswertung diente die Software FlowJo. Die gewonnenen Daten wurden mithilfe der Software in Form von zweidimensionalen Diagrammen visualisiert. Bei diesen sogenannten Dot Plots oder Pseudo-color Plots wurden jeweils zwei Messparameter gegeneinander aufgetragen und einzelne Zellpopulationen innerhalb des Diagramms durch Festlegung von Regionen ausgewählt. Die ausgewählten Zellen wurden dann anhand weiterer ein- oder zweidimensionaler Auftragungen genauer analysiert und spezifiziert. Dieses Vorgehen nennt man Gating (BD Biosciences 2014). Bei den durchgeführten Versuchen wurden je nach Versuchsziel, Probenmaterial und Antikörperfärbung verschiedene sequentielle Gatingstrategien angewendet.

Bei Versuchen, die eine genauere Analyse der Leukozyten zum Ziel hatten, wurden mithilfe des Gatings die relativen Häufigkeiten einzelner Leukozytensubpopulationen in den Proben ermittelt. Myeloische Zellen wurden hierbei als (CD45.2/ CD11b)^{high} Zellen identifiziert. Neutrophile Granulozyten wurden als (CD45.2/ CD11b/ hämatopoetische Zelllinienmarker)^{high} CD115^{low} Ly6C^{intermediate} Zellen erkannt. Die Identifikation von Monozyten erfolgte als hämatopoetische Zelllinienmarker^{low} (CD45.2/ CD11b/ CD115)^{high} Ly6C^{low/high} Zellen.

Zur Auswertung der adoptiven Zelltransferexperimente wurden die übertragenen GFP-positiven Monozyten und neutrophilen Granulozyten als (CD45.2/ CD11b/ GFP)^{high} Zellen abgegrenzt und ihr Anteil quantifiziert.

Bei Versuchen, die der Isolierung bzw. Analyse von Endothelzellen dienten, wurden die in den Proben enthaltenen Endothelzellen als CD45.2^{low} CD31^{high} CD107a^{intermediate/ high} Zellen identifiziert und gated. Das Gating erfolgte mithilfe der FMO (ohne Anti-CD31 Antikörper), die als Negativkontrolle eine bessere Abgrenzung der CD31-positiven Zellpopulation ermöglichte. Bei Versuchen zur Analyse von Endothelzellen wurde in den Proben weiterhin die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen untersucht. Dazu wurde für jedes untersuchte Adhäsionsmolekül die Signalintensitätsverteilung des zugehörigen Fluoreszenzsignals in Form eines Histogramms dargestellt und der geometrische Mittelwert als Maß für die sogenannte mean fluorescence intensity (MFI) bestimmt.

Die Gatingstrategien können im Einzelnen den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden. Bei allen durchgeführten Auswertungen wurden zudem nicht-vitale Zellen (identifiziert durch Auftragung FSC-A/ SSC-A) sowie aggregierte Zellen (identifiziert durch Auftragungen von FSC-A/ FSC-W und SSC-A/ SSC-W) von der Analyse ausgeschlossen. Dieser Schritt wurde in den Abbildungen des Ergebnisteils nicht eigens dargestellt.

Gesamtbewertung

Für die Gesamtbewertung wurden die Daten aus der manuellen Leukozytenzählung und der Durchflusszytometrie kombiniert. Anhand der berechneten Leukozytenzahlen pro ml Probe und den ermittelten prozentualen Anteilen der verschiedenen Leukozytensubpopulationen wurden die absoluten Zellzahlen pro Subpopulation errechnet. Diese absoluten Zellzahlen wurden dann zwischen den Gruppen verglichen und die Unterschiede statistisch auf Signifikanz geprüft. Bei Messwiederholungen innerhalb einer Gruppe wurden die Werte der verschiedenen Messzeitpunkte einander gegenübergestellt und auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei der Analyse der Endothelzellen wurden keine absoluten Zellzahlen errechnet. Hier wurden die bestimmten geometrischen Mittelwerte der einzelnen Parameter auf die nicht-gestresste Kontrollgruppe normalisiert und die Unterschiede zwischen den Gruppen auf Signifikanz getestet. Einzelheiten über die durchgeführten statistischen Tests können dem Abschnitt III.9 und den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden.

6. Immunhistochemie

Allgemeines Prinzip

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis von Antigenen in Gewebeschnitten mithilfe von markierten Antikörpern. Dazu können verschiedene Methoden herangezogen werden.

Hier wurde die Avidin-Biotin Complex (ABC) Methode in Kombination mit Peroxidase als Enzym zur Nachweisreaktion angewandt (siehe Abbildung 12).

Zunächst wurde das Gewebe mit einem für das darzustellende Zielantigen spezifischen Primärantikörper inkubiert. Es folgte die Inkubation mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Dann wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zugegeben. Wie von Hsu, Raine, and Fanger (1981) beschrieben, bildet sich dieser, indem Avidin in einem relativen Überschuss mit Biotin-konjugierter-Peroxidase inkubiert wird. Da Avidin vier hochaffine Biotin-Bindungsstellen besitzt, bildet sich ein polymerer Komplex mit einigen unbesetzten Biotinbindungsstellen (Hsu, Raine, and Fanger 1981). Die freien Bindungsstellen des Avidins ermöglichten die Bindung des Komplexes an den biotinylierten Sekundärantikörper und bildeten ein Bindeglied zu den im Komplex gebundenen biotinylierten Peroxidaseenzymen. Der Antigennachweis erfolgte dann über einen enzymatischen Substratsatz. AEC ist ein Substrat der Peroxidase und wird zu einem roten Reaktionsprodukt umgesetzt (Graham, Lundholm, and Karnovsky 1965). Unter Zugabe von AEC zur gebundenen Peroxidase bildete sich daher ein rotes Präzipitat als Reaktionsprodukt an der Antigenstelle. Diese Rotfärbung entsprach dem Nachweis des darzustellenden Zielantigens.

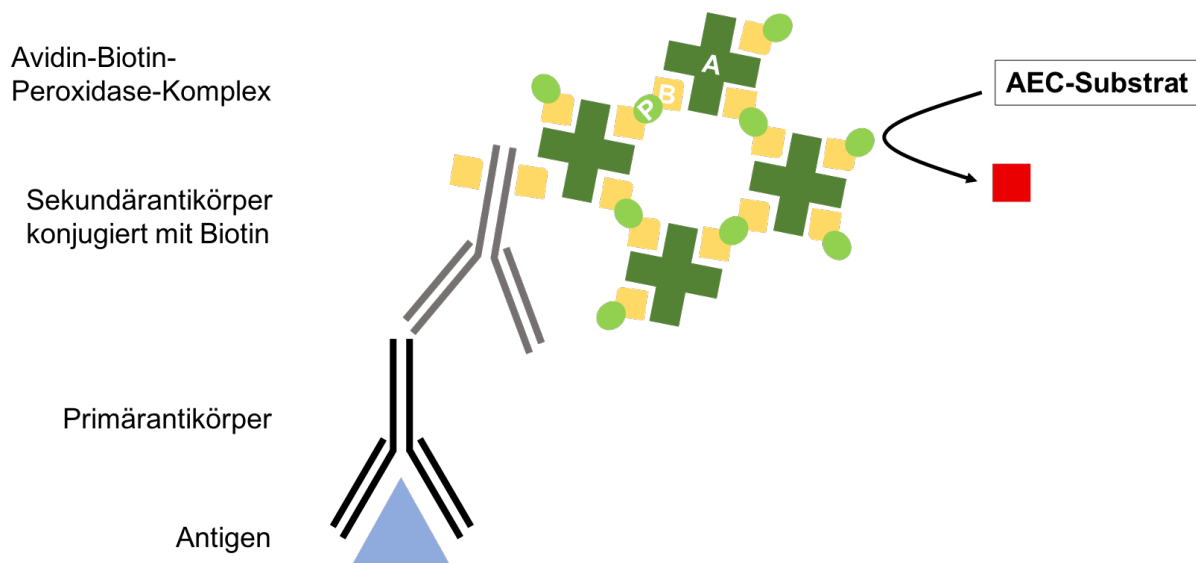


Abbildung 12: Prinzip der angewendeten immunhistochemischen Färbung mittels ABC Methode und AEC-Substratsatz durch Peroxidase

(P = Peroxidase, B = Biotin, A = Avidin)

(in Anlehnung an Diamandis and Christopoulos 1991)

Probenvorbereitung (Gefrierschnitte)

Nach der Entnahme wurde die Aortenwurzel mitsamt der Aortenklappe in entsprechenden Einbettformen mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound eingebettet, mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden am Kryostat

Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 µm bis zum Ende der Klappenebene angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden bis zur Durchführung der Färbung bei -80 °C gelagert.

Durchführung

CD11b-Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis von CD11b⁺ Zellen wurde das folgende Protokoll entwickelt.

Als Erstes wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend zweimal je 3 min in PBS-Tween gewaschen. Dann wurde jeder Schnitt mit einem hydrophoben Stift umkreist. Während aller im Folgenden beschriebenen Inkubationsphasen wurden die Objektträger zum Schutz vor Austrocknung in einer Feuchtkammer gelagert. Zunächst wurden die Schnitte für 5 min bei Raumtemperatur mit einem Peroxidaseblock inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger in PBS-Tween für je 3 min folgte die Inkubation mit 10 % Normal-Rabbit-Serum für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte zweimal je 3 min in PBS-Tween gewaschen und mit einem unkonjugierten Anti-CD11b Antikörper (Verdünnung 1:200 in 10% Normal-Rabbit-Serum) inkubiert. Außerdem wurden Negativkontrollen mit 10% Normal-Rabbit-Serum und Isotypenkontrollen mit einem analogen unkonjugierten IgG2b Antikörper (Verdünnung 1:200 in 10% Normal-Rabbit-Serum) erstellt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank mit dem Primärantikörper bzw. dem 10 % Normal-Rabbit-Serum inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zweimal für 3 min mit PBS-Tween gespült und der Sekundärantikörper, ein biotinyliertes rabbit anti-rat IgG (Verdünnung 1:200 in 10% Normal-Rabbit-Serum), aufgetragen. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert und im Anschluss zweimal je 3 min in PBS-Tween gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit der Vectastain® ABC-HRP-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Die Vectastain® ABC-HRP Reagenzien wurden gemäß Anleitung mindestens 30 min vorher in PBS vermischt. Nach der Inkubationsphase wurden die Objektträger zweimal für 3 min in PBS-Tween gespült. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit dem AEC+ Substrat inkubiert und die Färbereaktion nach 10 min mit Millipore® Wasser gestoppt. Nach zwei dreiminütigen Waschvorgängen mit Millipore® Wasser wurden die Schnitte für 10 sec in einem Färbebad mit Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II gegengefärbt. Die Objektträger wurden dann in ein Färbebecken mit Leitungswasser überführt und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit auf 45 °C erwärmter Kaisers Glycerin-Gelatine und entsprechenden Deckgläsern eingedeckt.

Ly6G-Immunhistochemie

Es wurde analog zur oben beschriebenen CD11b-Immunhistochemie vorgegangen. Bei dieser Färbung wurde im Unterschied jedoch ein Anti-Ly6G Antikörper (Verdünnung 1:200 in

10% Normal-Rabbit-Serum) als Primärantikörper eingesetzt. Eine entsprechende Isotyp- bzw. Negativkontrolle wurde nach oben geschildertem Muster auch hier durchgeführt.

Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden mittels Farbmikroskopkamera durch ein Leica-Mikroskop in 5- bzw. 10-facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung wurde mithilfe des Programms ImageJ verblindet durchgeführt. Pro Tier wurden insgesamt drei repräsentative Schnitte auf unterschiedlichen Höhen der Klappenebene analysiert. Für jeden Schnitt wurde die gesamte Plaquefläche sowie die Fläche des positiven Farbumschlags bestimmt. Dann wurde jeweils der Quotient aus positiver Plaquefläche zu Gesamtplaquefläche errechnet, um die interindividuellen Unterschiede der Plaquegröße zu berücksichtigen. Aus den errechneten Quotienten der drei analysierten Schnitte wurde der Mittelwert pro Tier gebildet. Die Mittelwerte der gestressten Tiere wurden denen der Kontrollgruppe gegenübergestellt und der Unterschied zwischen den Gruppen auf Signifikanz geprüft. Die Details der durchgeführten statistischen Testung können dem Abschnitt III.9 und den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden.

7. Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Allgemeines Prinzip

Eine qPCR ermöglicht es, definierte Abschnitte von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) exponentiell zu vervielfältigen und parallel zur Amplifikation zu quantifizieren. Bei den durchgeführten Versuchen wurden aus den isolierten Endothelzellen jeweils die Ribonukleinsäuren (RNA) isoliert, in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert und mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion analysiert. Zur Quantifizierung wurde dabei das TaqMan Prinzip angewendet (siehe Abbildung 13 a/ b).

Hierbei werden neben Primern weitere genspezifische Oligonukleotide, sogenannte TaqMan Sonden, zu den Proben gegeben (Heid et al. 1996). Die TaqMan Sonden sind am 5' Ende mit einem Reporter-Farbstoff und am 3' Ende mit einem Quencher-Farbstoff konjugiert (Heid et al. 1996; Livak et al. 1995). Wird der Reporter optisch angeregt, tritt aufgrund der großen räumlichen Nähe zum Quencher ein Energietransfer auf (Förster 1948; Livak et al. 1995), d.h. dass vom Reporter emittierte Energie vom Quencher absorbiert wird (Heid et al. 1996; Livak et al. 1995). Die TaqMan Sonden hybridisieren während der qPCR an den zu amplifizierenden DNA Abschnitt und werden während der Elongation durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase hydrolysiert (Holland et al. 1991; Heid et al. 1996; Livak et al. 1995).

Dies führt zu einer Entkopplung von Reporter und Quencher. Wird der Reporter nun optisch angeregt, findet kein adäquater Energietransfer auf den Quencher mehr statt und es lässt sich ein Anstieg des emittierten Reporter-Fluoreszenzsignals in Echtzeit detektieren. (Heid et al. 1996; Livak et al. 1995)

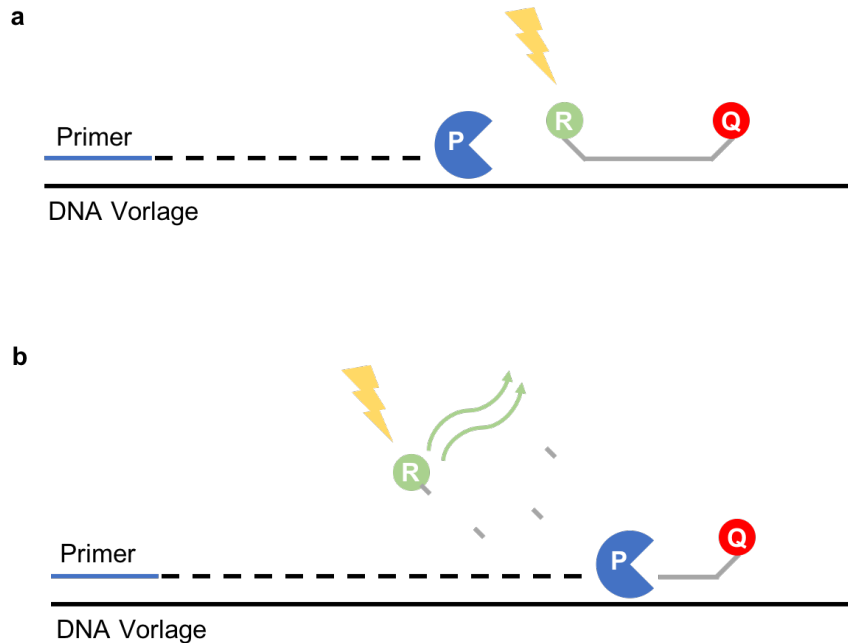


Abbildung 13: Schematische Darstellung des TaqMan Prinzips bei der qPCR

a) Bei intakter Sonde findet nach Anregung des Reporters ein Energietransfer auf den Quencher statt.

b) Bei Hydrolyse der Sonde erfolgt nach Anregung des Reporters eine Fluoreszenzemission.

(P = DNA-Polymerase, R = Reporter, Q = Quencher)

(in Anlehnung an Livak et al. 1995)

Probenvorbereitung

Aus den Aorten der Versuchstiere wurden mittels durchflusszytometrischen Zellsortings die Endothelzellen isoliert. Das genaue Vorgehen ist unter III.5 beschrieben.

Durchführung

RNA Isolation

Die RNA Isolation wurde mit dem Arcturus™ PicoPure™ RNA Isolation Kit von Applied Biosystems™ nach Herstellerangaben durchgeführt. Wie empfohlen, wurden die Proben vor der Elution zusätzlich mit einer DNase behandelt.

Reverse Transkription

Im nächsten Schritt wurde aus der isolierten RNA mittels einer reversen Transkriptase die cDNA synthetisiert. Dazu wurde das High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit von Applied Biosystems™ gemäß Herstellerangaben verwendet.

qPCR

Die gewonnenen cDNA-Proben wurden mittels qPCR hinsichtlich ihrer Genexpression von ICAM1/ 2, VCAM1, E-/ P-Selectin, CCL2 und CXCL1 untersucht. Dazu wurden verschiedene Reaktionsansätze mithilfe des ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems bzw. der ViiA™ 7 Software von Applied Biosystems™ analysiert. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze bzw. die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgeführt. Die Reaktionsansätze wurden durch entsprechende Negativkontrollen ergänzt.

Tabelle 17: Zusammensetzung qPCR-Reaktionsansatz

Volumen	Reagenz/ Probe
2 µl	cDNA
5 µl	TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X)
0,5 µl	TaqMan® Assay Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)
0,5 µl	TaqMan® Assay Zielgen (*)
2 µl	Nuklease-freies Wasser
* Ansätze für ICAM1/ 2, VCAM1, CCL2, E-/ P-Selectin und CXCL1	

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen qPCR

	Dauer	Temperatur
Initial	20 sec	95 °C
45 Zyklen	11 sec	95 °C
	20 sec	60 °C

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode auf Basis folgender Berechnungen:

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ GAPDH}} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T - \text{Mittelwert} (\Delta C_T \text{ Kontrollgruppe}) \\ 2^{-(\Delta\Delta C_T)} &= \text{relativer Expressionsunterschied in Bezug auf Kontrollgruppe}\end{aligned}$$

Es ergab sich der relative Genexpressionsunterschied für das Zielgen bezogen auf die Kontrollgruppe und normalisiert auf das Expressionslevel von GAPDH. Das housekeeping gene GAPDH diente als endogene Kontrolle, um eventuelle Abweichungen zwischen den Proben auszugleichen (Livak and Schmittgen 2001). Die errechneten relativen Genexpressionsunterschiede der einzelnen Zielgene wurden zwischen den Tieren der Stress- und der Kontrollgruppe verglichen und der Unterschied statistisch auf Signifikanz geprüft. Die Einzelheiten zur statistischen Testung können dem Abschnitt III.9 und den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden.

8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Allgemeines Prinzip

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay, kurz ELISA, kann bei verschiedenen Fragestellungen eingesetzt werden. Hier wurde ein ELISA zur Antigenquantifizierung in Proben durchgeführt, der auf einem kompetitiven Testverfahren mit enzymmarkierten Antikörpern beruht.

Das Testprinzip soll im Folgenden verkürzt erläutert werden. Zunächst wurden die zu quantifizierenden Zielantigene aus der Probe extrahiert. Dann wurde eine Platte, an deren feste Phase zuvor zum Zielantigen äquivalente Antigene gebunden worden waren, mit den extrahierten Antigenen aus der Probe und einer bestimmten Menge an antigenspezifischen Antikörpern inkubiert. Es resultierte eine Konkurrenzsituation zwischen den gebundenen und den freien aus der Probe stammenden Antigenen um die Bindungsstellen der Antikörper (siehe Abbildung 14). Je mehr des nachzuweisenden Antigens in der Probe enthalten gewesen war, je mehr freie Antigene also mit den gebundenen Antigenen konkurrierten, desto weniger Antikörper banden an die feste Phase der Platte. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden alle freien Antigen-Antikörper-Komplexe von der Platte abgewaschen und dann ein mit Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben. Es folgte ein enzymatischer Substratumsatz als Nachweisreaktion, der mittels einer schwefelsäurehaltigen Lösung gestoppt wurde. Dabei entstand ein Farbumschlag, der mithilfe eines Photometers quantifiziert wurde. Die gemessene optische Dichte spiegelte die Konzentration an gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen wider, die indirekt proportional zur Konzentration des Zielantigens in der Probe war. (DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH 2018)

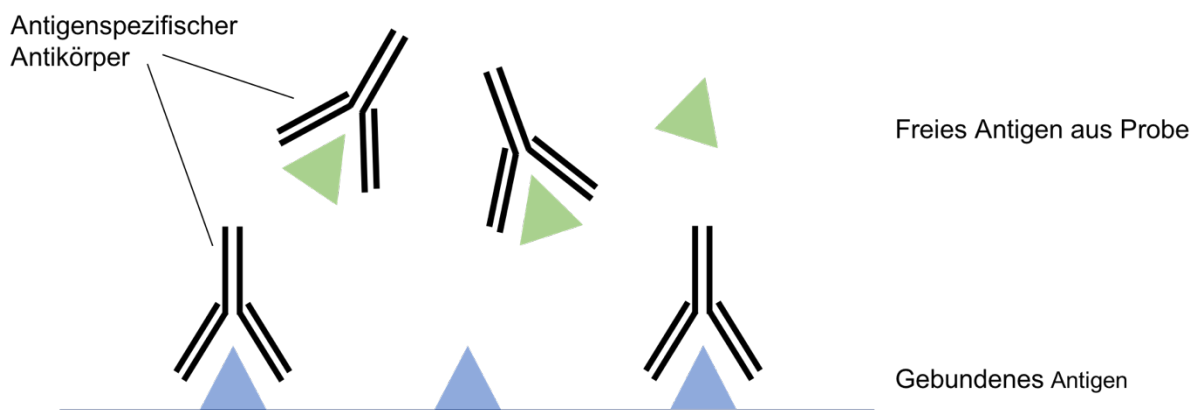


Abbildung 14: Schematische Darstellung der kompetitiven Antikörperbindung bei der Durchführung des ELISAs

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß den Vorgaben des verwendeten ELISA Kits (s.u.).

Aortenbögen

Nach der Entnahme wurden die Aortenbögen mitsamt der Adventitia in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit Trockeneis abgekühlt und bis zur Homogenisierung für maximal 7 Tage bei -80 °C eingefroren. Entsprechend der Herstellerangaben wurde ein Puffer zur Homogenisierung der Proben hergestellt. Die Proben wurden jeweils in 100 µl dieses Puffers mit einem Gewebshomogenisator homogenisiert, für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert.

Blut

Das Blut wurde sofort nach der Herzpunktion in entsprechende EDTA Monovetten überführt und darin geschwenkt. Dann wurden die Proben zur Plasmaseparation bei 2000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem im Kit enthaltenen Probenstabilisator versetzt und bis zur weiteren Verwendung für maximal 7 Tage bei -80 °C gelagert.

Durchführung

Es wurde ein ELISA zur Quantifizierung des Noradrenalingehalts der Proben durchgeführt. Dazu wurde das Noradrenalin High Sensitive ELISA Kit der DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH gemäß Herstellerangaben verwendet.

Auswertung

Die Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Wie empfohlen wurde eine 4 Parameter logistische Regression verwendet.

Der ermittelte Noradrenalingehalt in Aortenbögen und Blutplasmen wurden zwischen Stress- und Kontrollgruppe verglichen und der Unterschied zwischen den Gruppen auf Signifikanz geprüft. Die Einzelheiten zur statistischen Analyse sind im Abschnitt III.9 und unter den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil aufgeführt.

9. Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism der Firma GraphPad Software durchgeführt.

Ausreichend große Stichproben ($n > 8$) wurden mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung getestet. Bei kleinen Stichproben mit $n \leq 8$ wurden die untersuchten Daten als nicht-normalverteilt betrachtet. Anders als bei den hier berichteten Ergebnissen wurden im Rahmen der Publikation von Hinterdobler, Schott, et al. (2021) Stichproben mit $n \leq 8$ mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung getestet.

Für den Vergleich zweier Gruppen wurde bei normalverteilten Daten ein t-Test für unabhängige Stichproben, bei nicht-normalverteilten Daten ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Der Vergleich mehrerer verbundener Stichproben erfolgte bei nicht-normalverteilten Daten mithilfe eines Friedman-Tests gefolgt von einem Dunn's posthoc-Test. Statistische Ausreißer wurden mithilfe des ROUT-Tests ($Q = 1\%$) identifiziert. Ergebnisse mit $p < .05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

Den Abbildungen im Ergebnisteil kann jeweils die genaue Stichprobengröße und Angaben zum durchgeführten statistischen Test entnommen werden. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt.

IV. Ergebnisse

1. Stressinduzierte Leukozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques

In vorhergehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde in den Aorten atherosklerotischer Mäuse nach akutem psychosozialen Stress eine Zunahme der myeloischen Zellen beobachtet (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe II). Auf Basis dessen wurde die Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress zu einer Akkumulation von Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt und damit die lokale Inflammation verstärkt, untersucht.

Akuter psychosozialer Stress war in den oben angeführten vorhergehenden Experimenten durch eine Immobilisation der Tiere simuliert worden (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Um die Allgemeingültigkeit der vorherigen Ergebnisse in Bezug auf akuten psychosozialen Stress zu überprüfen, ergänzten wir Untersuchungen mit Räuber-Beute-Stress als alternativem Stressmodell. Dazu wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse für 3 h dem synthetischen Geruchsstoff TMT ausgesetzt. Dieser ist natürlicherweise in Fuchsfäzes enthalten (Vernet-Maury 1980) und löst bei den Mäusen durch die simulierte Anwesenheit ihres Räubers akuten Stress aus (siehe I.3.2). Nach der Stressexposition wurden die Aorten der Tiere entnommen, mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe III.3.2.2) und mit den Proben von nicht-gestressten Kontrolltieren verglichen (siehe Abbildung 15 a).

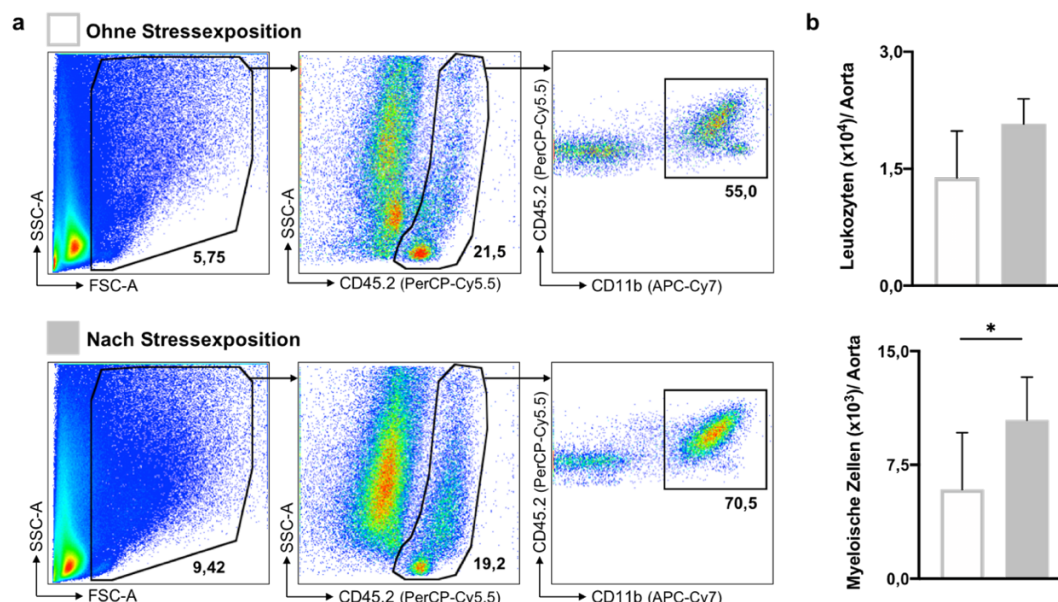


Abbildung 15: Analyse von Aortenproben aus ApoE-Knockout-Mäusen mit versus (vs.) ohne vorherige akute Stressexposition (Räuber-Beute-Stress)

a) Exemplarisches Gating der Aortenproben (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

b) Quantifizierung von Leukozyten und myeloischen Zellen in den Aortenproben (n = 6 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test, *p < .05). Darstellung der Daten als Mittelwert $\pm$ SD.

(modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure S3 P)

In den Aorten der Stressgruppe zeigten sich mehr Leukozyten und, wie in Hinterdobler, Schott, et al. (2021) beschrieben, v.a. signifikant mehr myeloische $CD11b^+$ Zellen ($U = 5$, $p = .041$; siehe Abbildung 15 b). Der Unterschied der Leukozytenzahlen zwischen den Gruppen lag in der statistischen Testung knapp oberhalb des Signifikanzniveaus von 5 % ($U = 5.5$, $p = .054$). Im nächsten Schritt wurde eine $CD11b$ -Immunhistochemie durchgeführt, um die Lokalisation der poststress vermehrt in den Aorten nachgewiesenen $CD11b^+$ Zellen zu prüfen. Hierzu wurden die Aortenwurzeln von mit HFD gefütterten ApoE-Knockout-Mäusen entnommen. Eine Gruppe der ApoE-Knockout-Mäuse war zuvor Immobilisationsstress ausgesetzt worden, die andere Gruppe bestand aus nicht-gestressten Kontrolltieren (siehe III.3.2.1). Es wurden Gefrierschnitte der entnommenen Präparate auf Höhe der Aortenklappe angefertigt und entsprechend gefärbt. Die immunhistochemische $CD11b$ -Färbung zeigte, dass die $CD11b^+$ Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques lokalisiert waren. Es wurden keine am Endothel adhärenierten Zellen nachgewiesen. Zudem wurde die Immunhistochemie quantitativ ausgewertet. Es wurde der Quotient aus $CD11b^+$ -Fläche im Verhältnis zur Gesamtplaquefläche bestimmt und zwischen den Gruppen verglichen. In der Stressgruppe zeigte sich der errechnete Quotient dabei signifikant erhöht ($t(14) = 4.417$, $p = .0006$; siehe Abbildung 16 a) (Hinterdobler, Schott, et al. 2021).

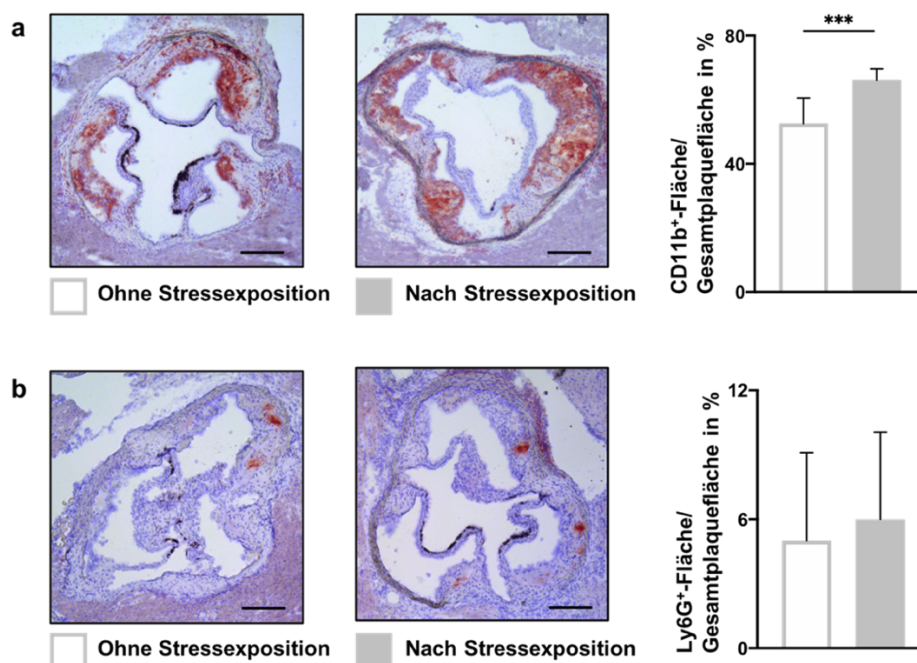


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten aus Aortenwurzeln aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)

a) Exemplarische Färbungen und Quantifizierung der $CD11b$ -Immunhistochemie ($n = 8$ pro Gruppe, t-Test für unabhängige Stichproben, $***p < .001$).

b) Exemplarische Färbungen und Quantifizierung der $Ly6G$ -Immunhistochemie ($n = 8$ pro Gruppe, t-Test für unabhängige Stichproben).

Darstellung der Daten als Mittelwert $\pm$ SD. Maßstabsleiste entspricht 200 μm .

(modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 2 G/ H und Figure S3 B/ C, reduziert auf die Daten der Dissertation)

In vorhergehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde nach akutem psychosozialen Stress auch eine quantitative Vermehrung der neutrophilen Granulozyten in den Aorten atherosklerotischer Mäuse festgestellt (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe II). Daher wurde analog zur CD11b-Immunhistochemie eine Ly6G-Immunhistochemie zum spezifischen Nachweis neutrophiler Granulozyten durchgeführt und ausgewertet. Die immunhistochemische Färbung ergab, dass die Ly6G⁺ Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques lokalisiert waren. Der Quotient aus Ly6G⁺-Fläche zu Gesamtplaquefläche zeigte in der Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen der Stress- und der Kontrollgruppe ($t(14) = 0.4892$, $p = .63$; siehe Abbildung 16 b) (veröffentlicht in Zusammenführung mit Daten weiterer Kohorten in Hinterdobler, Schott, et al. 2021).

2. Mechanismus der stressinduzierten Plaque-Leukozytenakkumulation

Basierend auf der Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress zu einer Akkumulation von Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt, stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen. Hierzu wurden weitergehende Hypothesen aufgestellt und untersucht.

2.1. Verstärkte Leukozyteneinwanderung

In vorhergehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurden im Mausmodell nach akutem psychosozialen Stress weniger Leukozyten, v.a. weniger Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten, im Blut der Tiere nachgewiesen (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe II). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Hypothese entwickelt und getestet, dass akuter psychosozialer Stress zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

In den oben angeführten vorhergehenden Experimenten war akuter psychosozialer Stress durch eine Immobilisation der Tiere ausgelöst worden (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Hier wurde Räuber-Beute-Stress als alternatives Stressmodell eingesetzt, um eine bessere Aussage über die Allgemeingültigkeit der Ergebnisse in Bezug auf akuten psychosozialen Stress treffen zu können. Es wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse für 3 h dem Geruchsstoff TMT ausgesetzt, um akuten Räuber-Beute-Stress zu simulieren. Nach der Stressprozedur wurde ihr Blut mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe III.3.2.2). Als Vergleich dienten Blutproben von nicht-gestressten Kontrolltieren (siehe Abbildung 17 a). Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Blut der Stressgruppe wurden, wie in Hinterdobler, Schott, et al. (2021) beschrieben, deutlich weniger Leukozyten ($U = 4$, $p = .024$), insbesondere weniger Ly6C^{high} ($U = 3$, $p = .015$) und Ly6C^{low} ($U = 1$, $p = .004$) Monozyten, nachgewiesen (siehe Abbildung 17 b).

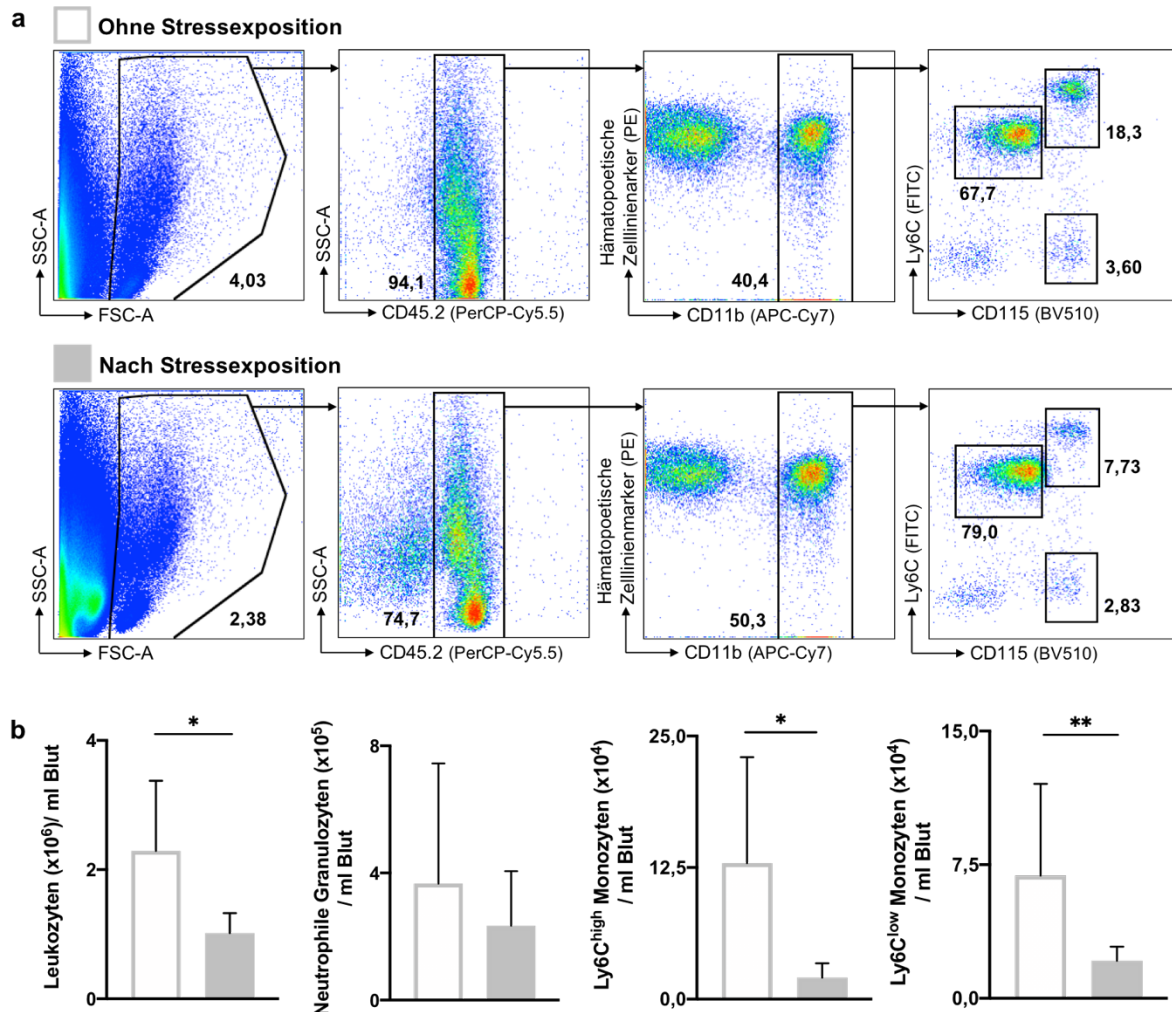


Abbildung 17: Analyse von Blutproben aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Räuber-Beute-Stress)

a) Exemplarisches Gating der Blutproben (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

b) Quantifizierung von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen in den Blutproben (n = 6 pro Gruppe, Mann-Whitney U-Test, *p < .05, **p < .01). Darstellung der Daten als Mittelwert ± SD.

(modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure S3 P)

Im nächsten Schritt wurden die Blutleukozytenzahlen im zeitlichen Verlauf nach akuter Stressexposition wiederholt bestimmt, um die Kinetik der stressinduzierten Veränderungen zu untersuchen. Dazu wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout Mäuse für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt und ihr Blut direkt vor und nach der Stressprozedur sowie 6 h, 24 h, 48 h und 72 h poststress analysiert (siehe III.3.2.3). Es zeigten sich Unterschiede in der Anzahl der Blutleukozyten zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten (Friedman-Test, *Friedman-Statistik* = 13.1, $p = .022$), wobei die Leukozytenzahlen direkt nach der Stressprozedur abfielen und danach wieder auf Werte ähnlich zum Ausgangsniveau vor der Stressprozedur anstiegen (siehe Abbildung 18). Im durchgeführten Dunn's posthoc-Test ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Leukozytenzahlen unmittelbar nach der Stressexposition im Vergleich zu 6 h ($p = .034$), 24 h ($p = .016$) bzw. 48 h poststress ($p = .012$) (veröffentlicht in Zusammenführung mit Daten weiterer Kohorten in Hinterdobler, Schott, et al. 2021).

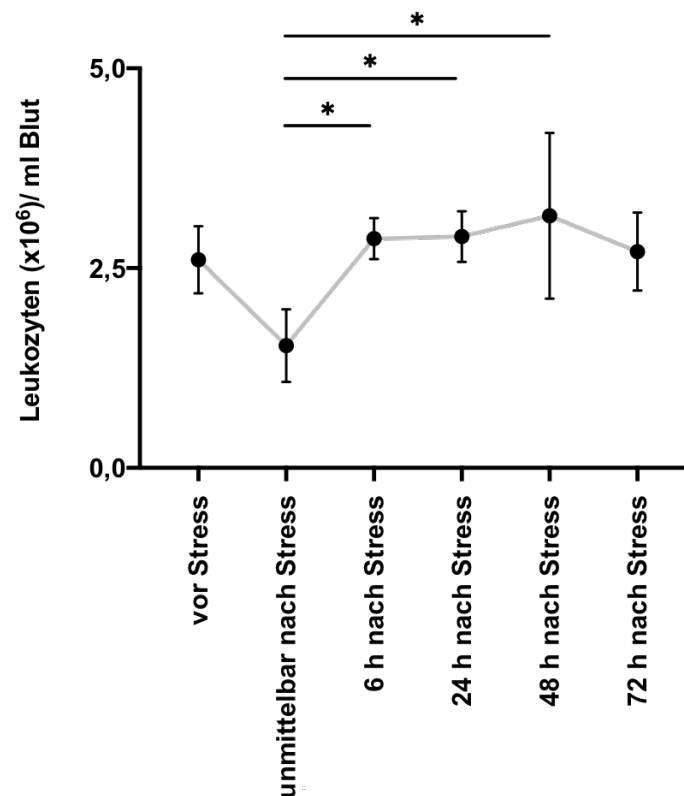


Abbildung 18: Quantifizierung der Leukozytenzahlen in Blutproben von ApoE-Knockout-Mäusen im zeitlichen Verlauf nach akuter Stressexposition (Immobilisationsstress)

(n = 5, Friedman-Test mit Dunn's posthoc-Test, *p < .05 im Vergleich zum Zeitpunkt unmittelbar nach Stress). Darstellung der Daten als Mittelwert ± SD.

(modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure S1 H, reduziert auf die Daten der Dissertation)

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob im Blut zirkulierende Leukozyten durch akuten psychosozialen Stress vermehrt in die Aorten atherosklerotischer Mäuse einwandern. Dazu wurde ein adoptives Zelltransferexperiment durchgeführt. Es wurden GFP-positive Monozyten und neutrophile Granulozyten GFP-negativen Empfängertieren intravenös injiziert. Als Empfängertiere wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in eine Kontroll- und Versuchsgruppe aufgeteilt und allen wurde die gleiche Menge an GFP⁺ Zellen injiziert. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden nach der Injektion zusätzlich für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Aorten aller Mäuse entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe III.3.2.4). Der Fokus lag darauf, eingewanderte myeloische GFP⁺ Zellen in den Aortenproben nachzuweisen und zu quantifizieren (siehe Abbildung 19 a). Es zeigte sich, wie in Hinterdobler, Schott, et al. (2021) beschrieben, dass in den Aorten der Stressgruppe signifikant mehr myeloische GFP⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden waren ($U = 2.5$, $p = .040$; siehe Abbildung 19 b). Generell wurden in den Aorten der gestressten Tiere signifikant mehr Leukozyten ($U = 0$, $p = .008$) nachgewiesen.

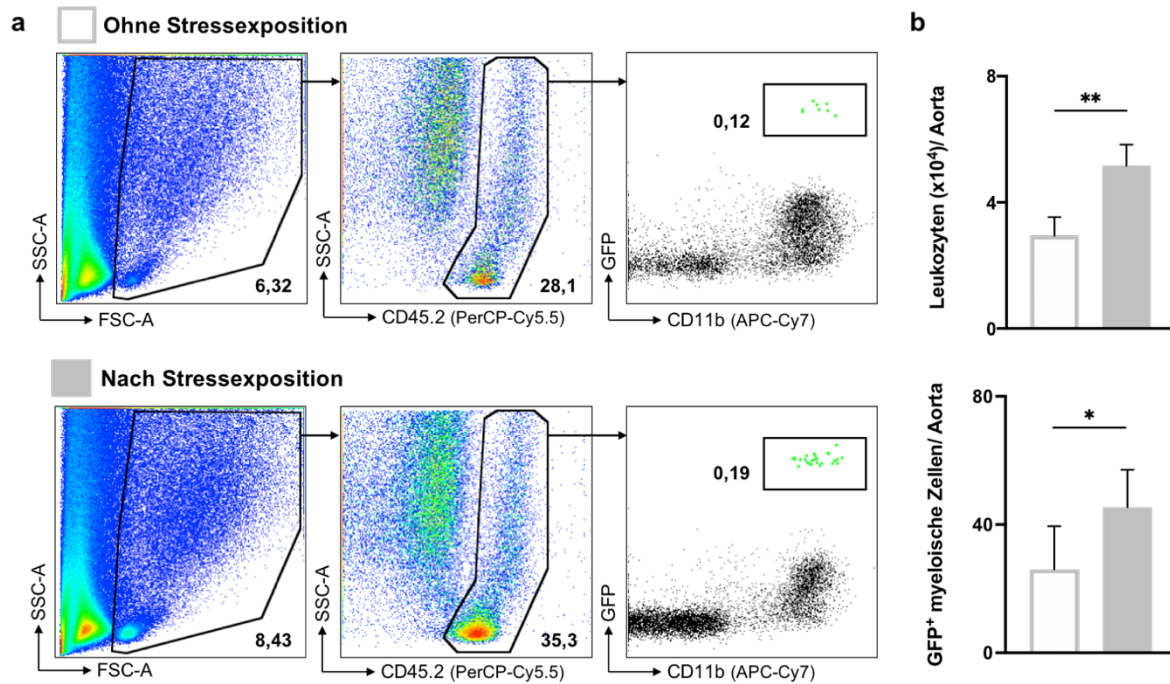


Abbildung 19: Analyse von Aortenproben aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition nach adoptivem Zelltransfer (Injektion von GFP⁺ neutrophilen Granulozyten und Monozyten, Immobilisationsstress)

a) Exemplarisches Gating der Aortenproben (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

b) Quantifizierung von Leukozyten und GFP⁺ myeloischen Zellen in den Aortenproben (n = 5 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test, *p < .05, **p < .01). Darstellung der Daten als Mittelwert $\pm$ SD.

(modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 2 A/ B)

2.2. Aktivierung von Endothelzellen

Endothelzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von Leukozyten in Gewebe (Ley et al. 2007). Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt und geprüft, dass akuter psychosozialer Stress über eine Aktivierung von Endothelzellen zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

Zunächst wurde die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf aortalen Endothelzellen nach akutem psychosozialen Stress untersucht. Es wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt und anschließend die Aorten der Tiere entnommen (siehe III.3.2.1). Die Aortenproben wurden mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gerichtet gegen typische Endothelzellmarker sowie klassische endotheliale Zelladhäsionsmoleküle gefärbt. Dann wurden mittels Durchflusszytometrie die Endothelzellen in den Aortenproben anhand ihrer Oberflächenantigene identifiziert (siehe Abbildung 20 a) und die MFI der jeweiligen Zelladhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche quantifiziert. Als Bezugsgröße wurden die Aorten von nicht-gestressten mit HFD gefütterten ApoE-Knockout-Mäusen analog zur Stressgruppe analysiert (siehe Abbildung 20 b). Im Vergleich zeigte sich bei den gestressten Tieren für VCAM1 eine signifikant höhere relative MFI als bei den nicht-gestressten Tieren ($U = 14$, $p = .019$, siehe Abbildung 20 c).

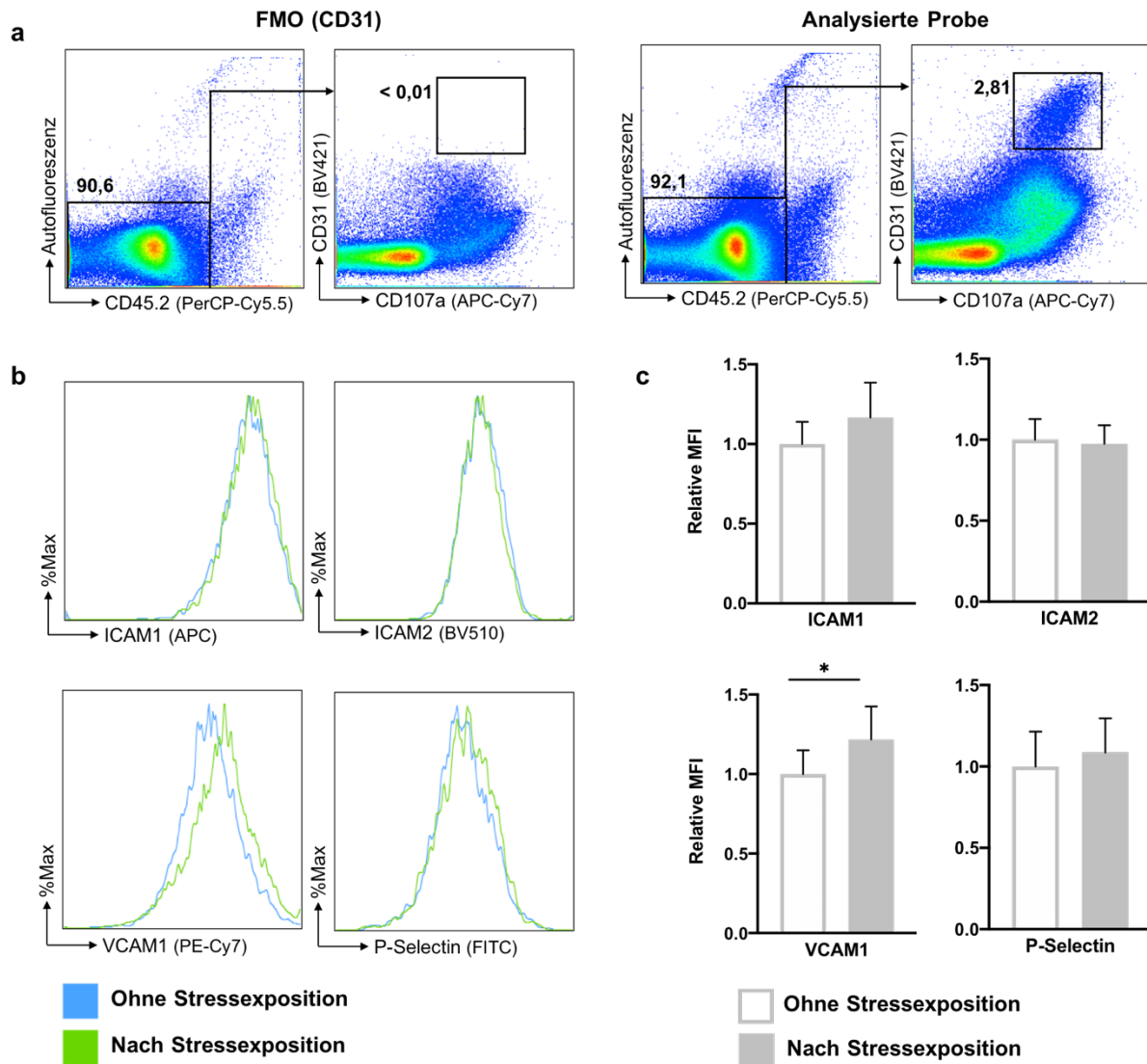


Abbildung 20: Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf aortalen Endothelzellen von ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)

a) Exemplarisches Gating der Endothelzellen unter Zuhilfenahme der FMO (CD31) (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

b) Exemplarische Histogramme der untersuchten Zelladhäsionsmoleküle auf Endothelzellen (%Max = relativ zu Modus der Verteilung).

c) Quantifizierung der untersuchten Zelladhäsionsmoleküle auf Endothelzellen anhand der relativen MFI (MFI = mean fluorescent intensity, n = 9 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test, *p < .05). Darstellung der Daten als Mittelwert ± SD.

(in Anlehnung an Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 3 A und Figure S4 A, Daten bisher nicht veröffentlicht)

Im nächsten Schritt wurde eine qPCR durchgeführt, um mehr über das RNA-Profil der aortalen Endothelzellen nach akutem psychosozialen Stress zu erfahren. Dazu wurden die Aorten von mit HFD gefütterten ApoE-Knockout-Mäusen entnommen. Eine Gruppe der ApoE-Knockout-Mäuse war zuvor Immobilisationsstress ausgesetzt worden, die andere Gruppe bestand aus nicht-gestressten Kontrolltieren (siehe III.3.2.1). Mithilfe eines durchflusszytometrischen Zellsorters wurden die in den Aorten enthaltenen Endothelzellen anhand ihrer Oberflächenantigene identifiziert (siehe Abbildung 20 a) und aus den Proben isoliert. Dann wurde die RNA aus

den Endothelzellen isoliert, revers transkribiert und mittels qPCR die Genexpression von verschiedenen klassischen Zelladhäsionsmolekülen bzw. Chemokinen untersucht. Aus den qPCR Daten wurde für die untersuchten Zielgene jeweils der relative Genexpressionsunterschied bezogen auf die Kontrollgruppe und normalisiert auf das Expressionslevel des housekeeping genes GAPDH berechnet. In der Stressgruppe fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere relative Expression von ICAM2, VCAM1, P-Selectin und CXCL1 auf (siehe Abbildung 21). Diese Unterschiede zeigten sich in der statistischen Testung nicht signifikant.

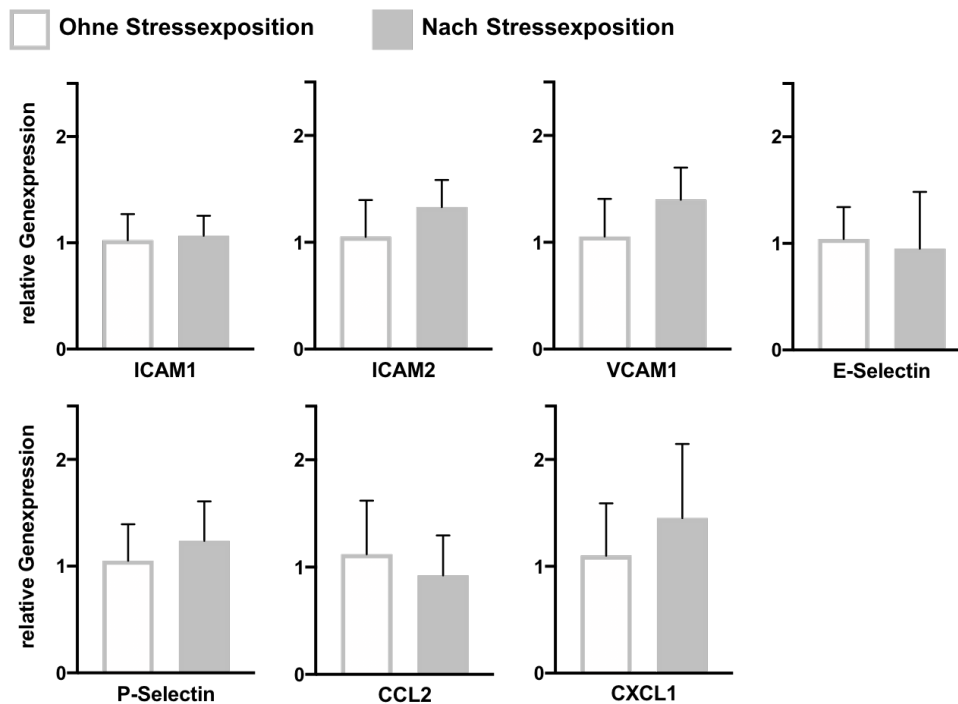


Abbildung 21: Quantifizierung der Genexpression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen bzw. Chemokinen in aortalen Endothelzellen aus ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress)

(n = 8 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test). Darstellung der Daten als Mittelwert $\pm$ SD.

(in Anlehnung an Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure S3 H, Daten bisher nicht veröffentlicht)

In der Literatur wurde vielfach beschrieben, dass eine Erhöhung des LDL-Spiegels durch eine Induktion von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen die Migration von Monozyten aus dem Blut fördern kann (Pritchard et al. 1991; Smalley et al. 1996; Verna, Ganda, and Stemerman 2006; Lin et al. 1996). Daher wurde in diesem Zusammenhang überprüft, ob akuter psychosozialer Stress eine Veränderung der LDL- bzw. Gesamtcholesterinspiegel im Blut als möglichen Trigger einer Endothelzellaktivierung auslöst. Für die Untersuchungen wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout Mäuse verwendet. Die Versuchsgruppe wurde für 3 h Immobilisationsstress oder Räuber-Beute-Stress ausgesetzt und dann der Gehalt an Gesamtcholesterin und LDL in ihrem Blutplasma bestimmt (siehe III.3.2.1 und III.3.2.2). Ihre Werte wurden mit denen der nicht-gestressten Kontrollgruppe verglichen. Für die Höhe des LDL- bzw. Gesamtcholesterinspiegels im Blutplasma ergab sich kein signifikanter Unterschied

zwischen den Gruppen, unabhängig von der Wahl des Stressmodells (siehe Abbildung 22 a/ b).

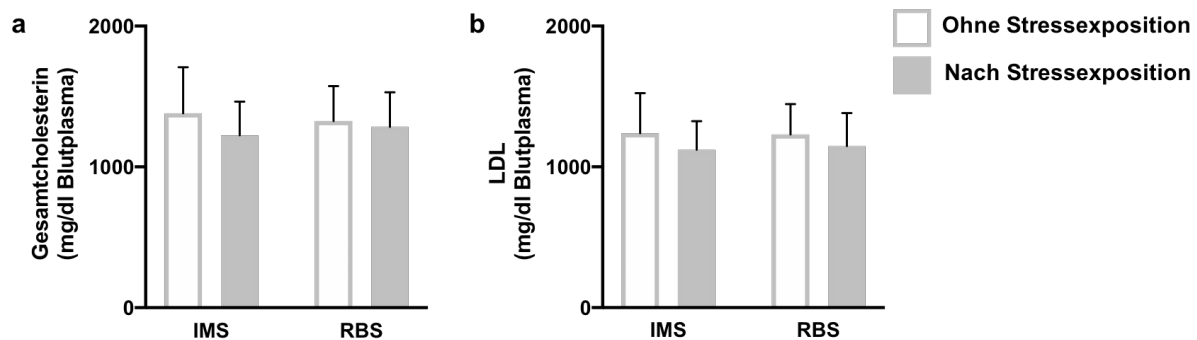


Abbildung 22: Lipidbestimmungen in Blutplasmen von ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition

(IMS = Immobilisationsstress, RBS = Räuber-Beute-Stress)

a) Quantifizierung des Gesamtcholesterins im Blutplasma (n = 4-8 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test).

b) Quantifizierung des LDL im Blutplasma (n = 4-8 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test).

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SD.

(in Anlehnung an Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure S3 Q, Daten bisher nicht veröffentlicht)

2.3. Vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung

Stress aktiviert das sympathische Nervensystem (Ulrich-Lai and Herman 2009) und induziert die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen (Palkovits 2010). Diese Erkenntnis bildete zusammen mit den bisherigen Ergebnissen die Grundlage für die Testung der Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

Im ersten Schritt wurde untersucht, ob akuter psychosozialer Stress eine verstärkte lokale Noradrenalinfreisetzung im Bereich der Aorta induziert. Dazu wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt. Dann wurden Blut und Aortenbögen der Tiere entnommen und mittels ELISA der Noradrenalingehalt der Proben quantifiziert (siehe III.3.2.1). Als Vergleich wurden Blut und Aortenbögen von nicht-gestressten, mit HFD gefütterten ApoE-Knockout-Mäusen analog analysiert. In den Aortenbögen der gestressten Tiere wurde, wie in Hinterdobler, Schott, et al. (2021) beschrieben, ein signifikant höherer Noradrenalingehalt als in denen der nicht-gestressten Tiere nachgewiesen ($U = 40$, $p = .007$, siehe Abbildung 23). Der Noradrenalingehalt im Blutplasma zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Hinterdobler, Schott, et al. 2021).

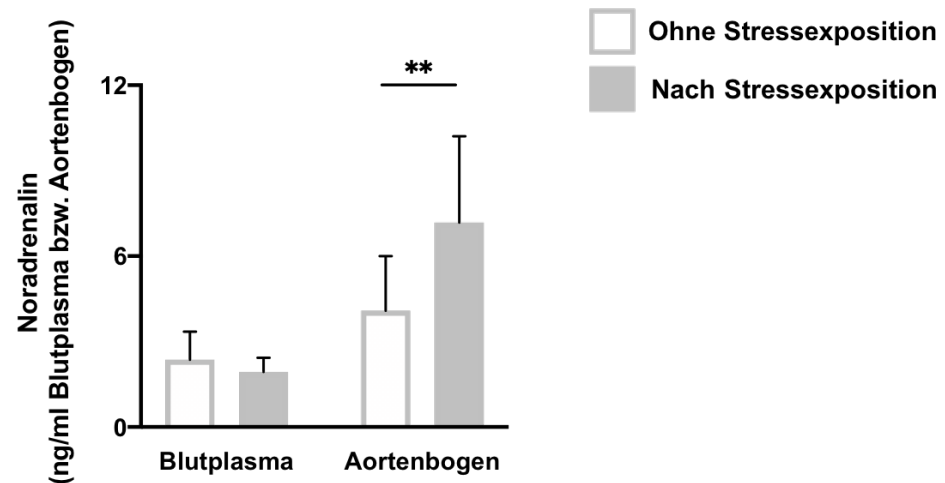


Abbildung 23: Quantifizierung von Noradrenalin in Blutplasmen und Aortenbögen von ApoE-Knockout-Mäusen mit vs. ohne vorherige akute Stressexposition (Immobilisationsstress) (n = 6-14 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test, $**p < .01$). Darstellung der Daten als Mittelwert $\pm$ SD. (modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 3 D)

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung die Einwanderung zirkulierender Leukozyten in die Aorta atherosklerotischer Mäuse im Rahmen von akutem psychosozialen Stress beeinflusst. Dazu wurde ein adoptives Zelltransferexperiment durchgeführt. Als Versuchstiere wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse verwendet. Im Vorfeld des Transferexperiments wurde ein Teil der Versuchstiere chemisch sympathektomiert. Dazu wurde den Tieren der Sympathektomiegruppe sechs bzw. vier Tage vor dem adoptiven Zelltransferexperiment 6-OHDA i.p. injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten analog wirkstofffreie PBS-Injektionen i.p. verabreicht. Im Rahmen des Transferexperiments wurden den vorbehandelten GFP-negativen Versuchstieren dann GFP-positive Monozyten und neutrophile Granulozyten injiziert. Alle Tiere erhielten die gleiche Menge an GFP⁺ Zellen intravenös verabreicht und wurden danach für 3 h Immobilisationsstress ausgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Aorten der Tiere entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe III.3.2.5). Der Fokus der Auswertung lag auf dem Nachweis und der Quantifizierung myeloischer GFP⁺ Zellen in den Aortenproben (siehe Abbildung 24 a). In den Aortenproben der Sympathektomiegruppe zeigten sich, wie in Hinterdobler, Schott, et al. (2021) beschrieben, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger myeloische GFP⁺ Zellen ($U = 20$, $p = .013$, siehe Abbildung 24 b). Generell wurden signifikant weniger Leukozyten in den Aorten der Sympathektomiegruppe nachgewiesen ($U = 17$, $p = .003$).

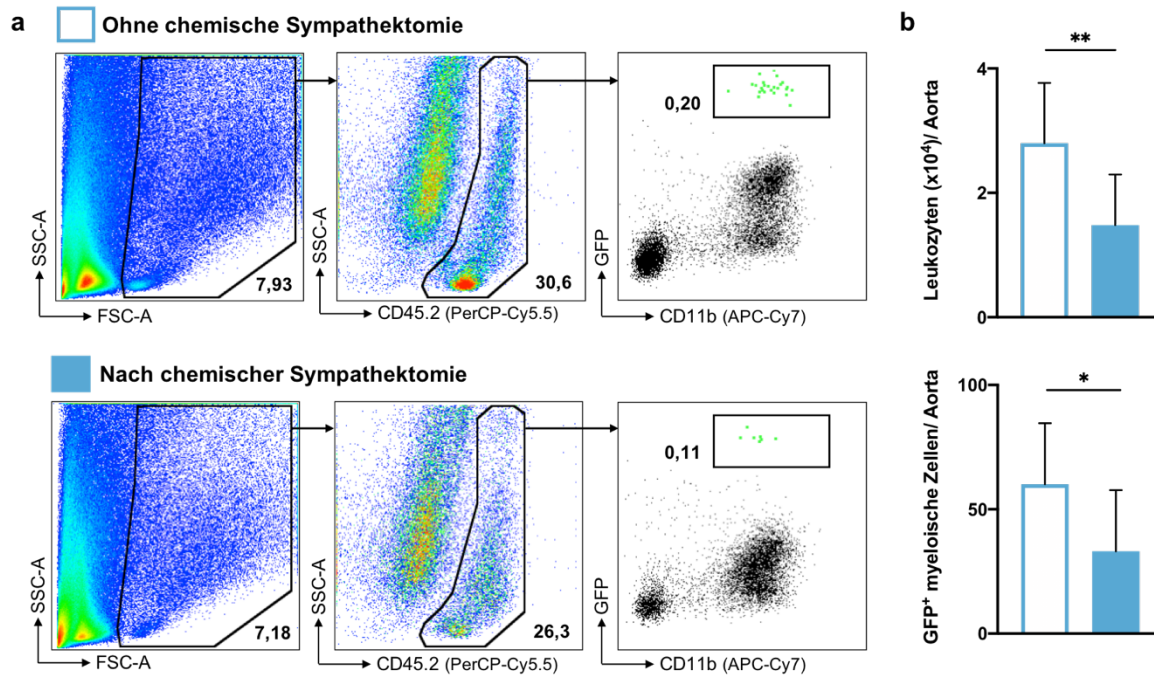


Abbildung 24: Analyse von Aortenproben aus ApoE-Knockout-Mäusen nach adoptivem Zelltransfer (Injektion von GFP⁺ neutrophilen Granulozyten und Monozyten) und anschließender akuter Stressexposition (Immobilisationsstress) mit vs. ohne vorherige chemische Sympathektomie

a) Exemplarisches Gating der Aortenproben (die Zahlen neben den Gates entsprechen %).

b) Quantifizierung von Leukozyten und GFP⁺ myeloischen Zellen in den Aortenproben (n = 10-11 pro Gruppe, Mann-Whitney-U-Test, *p < .05, **p < .01). Darstellung der Daten als Mittelwert ± SD.

(modifiziert nach Hinterdobler, Schott, et al. 2021 Figure 4 A)

V. Diskussion

Atherosklerose ist die Grundlage kardiovaskulärer Erkrankungen (Lagraauw, Kuiper, and Bot 2015) - der führenden Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017) und weltweit (World Health Organization 2020). Es handelt sich bei Atherosklerose um eine multifaktoriell bedingte, inflammatorische Erkrankung, die zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques im Bereich der arteriellen Gefäßwände führt (Libby 2002). Eine Ruptur atherosklerotischer Plaques ist häufig die Ursache von kardiovaskulären Events wie Myokardinfarkten (Lusis 2000).

Als kardiovaskulärer Risikofaktor gilt psychosozialer Stress (Nahrendorf 2018; Rosengren et al. 2004). Viele Studien konnten eine Assoziation zwischen akutem psychosozialem Stress und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und insbesondere kardiovaskulärer Events zeigen (siehe I.2.3), die pathophysiologischen Hintergründe sind bisher allerdings nur unzureichend verstanden (Kivimäki and Steptoe 2018). In einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge von akutem psychosozialem Stress und Atherosklerose liegt die Chance, eine verbesserte und zielgerichtete Therapie entwickeln zu können (Hinterdobler, Schunkert, et al. 2021).

1. Stressinduzierte Leukozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war infolge von akutem psychosozialem Stress, simuliert durch Immobilisationsstress, eine Zunahme inflammatorischer Leukozyten in den Aorten atherosklerotischer Mäuse festgestellt worden (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe II). Die hier durchgeführten Experimente konnten die Hypothese unterstützen, dass akuter psychosozialer Stress zu einer Akkumulation von Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt und damit die lokale Inflammation verstärkt.

Mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse wurden einem alternativen Stressmodell (Räuber-Beute-Stress) ausgesetzt und im Anschluss ihre Aorten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigten sich mehr Leukozyten und signifikant mehr CD11b⁺ myeloische Zellen in den Proben der gestressten Tiere im Vergleich zu den nicht-gestressten Kontrolltieren (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Der Unterschied der Gesamtleukozytenzahl zwischen den Gruppen lag in der statistischen Testung knapp oberhalb des Signifikanzniveaus von 5% ($p = .054$), was sich vermutlich auf die kleine Stichprobengröße von $n = 6$ pro Gruppe zurückführen lässt. Auf eine Wiederholung des Versuchs mit einer größeren Kohorte wurde in Anbetracht des sonst sehr eindeutigen Ergebnisses im Rahmen eines wirtschaftlichen Ressourceneinsatzes verzichtet. Insgesamt stützen die Beobachtungen nach Räuber-Beute-Stress die

Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe nach Immobilisationsstress (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Es zeigten sich auch unter Anwendung eines alternativen Stressmodells mehr inflammatorische Leukozyten in den Aorten der gestressten Tiere, was eine höhere Allgemeingültigkeit der Beobachtungen in Hinblick auf akuten psychosozialen Stress annehmen lässt.

Übereinstimmend mit den Daten der Durchflusszytometrie ließ sich mittels CD11b-Immunhistochemie eine quantitative Zunahme der CD11b⁺-Fläche im Verhältnis zur Gesamtplaquefläche nach akutem psychosozialen Stress in den Aortenwurzeln atherosklerotischer Mäuse nachweisen (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Über die Quantifizierung der CD11b⁺ Leukozyten hinaus, konnte die Immunhistochemie zeigen, dass alle CD11b⁺ Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques lokalisiert und nicht nur endotheladhärent waren. Dies stützt die These, dass die nachgewiesene stressinduzierte Zunahme der CD11b⁺ Zellen in den Aorten der Tiere auf eine Akkumulation der Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques zurückzuführen ist.

Auch in einer analogen Ly6G-Immunhistochemie zum Nachweis neutrophiler Granulozyten zeigten sich die gefärbten Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques lokalisiert. Die quantitative Auswertung der Ly6G⁺-Fläche/ Gesamtplaquefläche zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Stress- und Kontrollgruppe. Dies steht im Widerspruch zu den Vorergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die nach akutem psychosozialen Stress mehr neutrophile Granulozyten in den Aorten atherosklerotischer Mäuse mittels Durchflusszytometrie detektieren konnten (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe II). Bei der Interpretation der quantitativen Auswertung der Ly6G-Immunhistochemie muss allerdings die große interindividuelle Streuung der Ergebnisse und die daraus resultierend hohe Standardabweichung bei einer Kohortengröße von n = 8 pro Gruppe beachtet werden. Die quantitativen Daten der Durchflusszytometrie scheinen daher reliabler zu sein. Nachfolgende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Wiederholung der Ly6G-Immunhistochemie in einer weiteren Kohorte konnten dies bestätigen und ergaben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie einen signifikant höheren Quotienten aus Ly6G⁺-Fläche/ Gesamtplaquefläche im Vergleich von Stress- zu Kontrollgruppe (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Zusammen betrachtet sprechen diese quantitativen Ergebnisse zusammen mit den mittels Immunhistochemie gewonnenen Daten über die Lokalisation der Zellen für eine stressbedingte Akkumulation neutrophiler Granulozyten in atherosklerotischen Plaques.

2. Mechanismus der stressinduzierten Plaque-Leukozytenakkumulation

Unter Annahme der Hypothese einer stressinduzierten Leukozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques stellte sich im nächsten Schritt die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen.

2.1. Verstärkte Leukozyteneinwanderung

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten sich im Mausmodell nach akutem psychosozialen Stress weniger Leukozyten, v.a. weniger Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten, im Blut der Tiere gezeigt (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) (siehe II). Darauf aufbauend entwickelten wir die Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war akuter psychosozialer Stress durch eine Immobilisation der Tiere simuliert worden (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Die hierbei beobachteten Ergebnisse wurden unter Anwendung von Räuber-Beute-Stress als alternativem Stressmodell in der vorliegenden Arbeit bestätigt. In den Blutproben gestresster atherosklerotischer Mäuse ließen sich signifikant weniger Leukozyten, insbesondere weniger Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten, als in denen der nicht- gestressten Kontrolltiere mittels Durchflusszytometrie nachweisen (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Die übereinstimmenden Ergebnisse unter Anwendung verschiedener Stressmodelle bekräftigen die Annahme, dass nicht ein spezifischer Stressor, sondern generell die Einwirkung von akutem psychosozialem Stress zu einer Abnahme der Blutleukozyten führt.

Ein entsprechendes Kinetik-Experiment konnte zeigen, dass diese stressinduzierte Abnahme der Blutleukozytenzahlen nur temporär nach einer Stressexposition auftritt. Dazu wurden mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse Immobilisationsstress ausgesetzt und ihr Blut zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Stressexposition analysiert. Übereinstimmend mit den Vorergebnissen waren unmittelbar nach der Stressexposition die Leukozytenzahlen im Blut vermindert, im weiteren zeitlichen Verlauf aber wieder auf Werte ähnlich zum Ausgangsniveau ansteigend. Bei signifikanten Unterschieden der Blutleukozytenzahlen im Vergleich von 0 h poststress mit 6 h, 24 h und 48 h poststress war - diskrepant zu den Vorergebnissen - der initiale Abfall der Leukozytentzahlen nicht statistisch signifikant. Dies lässt sich am ehesten durch eine Kohortengröße von nur n = 5 und die Notwendigkeit multiplen Testens erklären. Da der Fokus dieses Experiments jedoch die Analyse der Leukozytenzahlen im zeitlichen Verlauf nach der Stressexposition war und die initiale stressinduzierte Leukozytenabnahme in den Vorexperimenten bereits mehrfach belegt werden konnte, wurde aktuell auf eine erneute Durchführung der Analyse mit einer größeren Kohorte verzichtet.

Die gewonnenen Daten belegen eine infolge von akutem psychosozialen Stress auftretende temporäre Abnahme der Leukozyten im Blut. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Leukozyten stressinduziert aus dem Blut ins Gewebe aufgenommen werden (Hinterdobler, Schott, et al. 2021) und später weitere Leukozyten aus Speichern wie der Milz ins Blut freigesetzt werden. Unterstützt wird diese These durch die Ergebnisse des durchgeführten adoptiven Zelltransferexperiments. Hierbei wurden gleiche Mengen von GFP-positiven Monozyten und neutrophilen Granulozyten GFP-negativen ApoE-Knockout-Mäusen (gefüttert mit HFD) intravenös injiziert und die Empfängertiere in eine Stress- bzw. Kontrollgruppe aufgeteilt. In der Stressgruppe zeigten sich signifikant mehr Leukozyten in den Aorten der Tiere als in den Aorten der nicht-gestressten Kontrollgruppe. Entscheidend hierbei war, dass in den Aorten der gestressten Tiere mittels Durchflusszytometrie signifikant mehr myeloische GFP⁺ Zellen nachweisbar waren (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Dies ist nicht durch eine gesteigerte lokale Zellproliferation erklärbar, sondern muss durch eine vermehrte Aufnahme der Zellen ins Gewebe bedingt sein. Dabei ist zu beachten, dass im verwendeten experimentellen Setting aufgrund des fehlenden örtlichen Auflösungsvermögens der Durchflusszytometrie die eingewanderten Leukozyten in den Aorten nicht näher lokalisiert werden konnten. Es kann also nicht explizit eine vermehrte Einwanderung in die aortalen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Allerdings ist sowohl aus pathophysiologischer Sicht als auch in Anbetracht der zuvor geschilderten Ergebnisse der Immunhistochemie davon auszugehen, dass die Akkumulation der Zellen sich hauptsächlich auf die atherosklerotischen Plaques konzentriert und nicht diffus im aortalen Gewebe stattfindet. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass eine Wiederholung des adoptiven Zelltransferexperiments in nicht-atherosklerotischen Wildtypmäusen keine vermehrte aortale Leukozyteneinwanderung nach Stressexposition zeigte (Hinterdobler, Schott, et al. 2021).

Insgesamt betrachtet stützen die dargestellten Daten damit die These, dass akuter psychosozialer Stress zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

2.2. Aktivierung von Endothelzellen

Im nächsten Schritt entwickelten wir die Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress über eine Aktivierung von Endothelzellen zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

Infolge von akutem psychosozialen Stress ließ sich eine veränderte Expression klassischer Zelladhäsionsmoleküle auf aortalen Endothelzellen in atherosklerotischen Mäusen mittels Durchflusszytometrie nachweisen. Die MFI für VCAM1 zeigte sich nach Stressexposition im Verhältnis zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, was einer vermehrten Expression von VCAM1 auf den aortalen Endothelzellen entspricht. Die MFI für ICAM1, ICAM2 und P-Selectin war

nicht signifikant erhöht. In weiteren Untersuchungen von Hinterdobler, Schott, et al. (2021), die die MFI klassischer Zelladhäsionsmoleküle nicht wie hier nach 3 h Stressexposition sondern bereits nach 30 min analysierten, zeigten sich stärkere Unterschiede zwischen Stress- und Kontrollgruppe. In ihren Experimenten wies nach 30 min die MFI für VCAM1 die größte Zunahme auf ($p = .003$), zudem waren die MFI für ICAM1 ($p = .03$) und P-Selectin ($p = .07$) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine Zunahme der Oberflächenexpression klassischer Zelladhäsionsmoleküle ein sehr früher Effekt in der Kaskade der stressinduziert vermehrten Leukozyteneinwanderung ist und daher nach 3 h Stressexposition bereits rückläufig ist. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass VCAM1 - bekanntermaßen ein wichtiger Teil der Leukozytenadhäsionskaskade (Ley et al. 2007) - im Zusammenhang mit akutem psychosozialen Stress eine besondere Rolle spielt.

Neben diesen stressinduzierten Veränderungen auf Proteinebene der aortalen Endothelzellen wurden auch Veränderungen des RNA-Profiles analysiert. Mithilfe eines durchflusszytometrischen Zellsorters wurden die Endothelzellen aus den Aorten atherosklerotischer Mäuse isoliert und mittels qPCR der relative Genexpressionsunterschied verschiedener Zelladhäsionsmoleküle und Chemokine untersucht. In der Stressgruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere relative Expression von ICAM2, VCAM1, P-Selectin und CXCL1 normalisiert auf das Expressionslevel des housekeeping genes GAPDH. Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant, sind allerdings auch vor dem Hintergrund einer Gruppengröße von $n = 8$ pro Gruppe zu sehen. Da der Entschluss zu einer umfassenden Genexpressionsanalyse aortaler Endothelzellen aus gestressten vs. nicht-gestressten atherosklerotischen Mäusen mittels RNA-Sequencing getroffen wurde, sahen wir die Ergebnisse als ersten Hinweis auf ein verändertes Genexpressionsprofil und verzichteten auf eine Wiederholung der qPCR. Das im Nachgang zu dieser Dissertation von Hinterdobler, Schott, et al. (2021) durchgeführte RNA-Sequencing konnte die bisherigen Ergebnisse sowie die Hypothese einer stressinduzierten Endothelzellaktivierung stützen. Die Autoren konnten die Hochregulierung einer Vielzahl von Genen durch akuten Stress nachweisen. Diese konnten sie hauptsächlich Signalwegen zuordnen, die Funktionen wie Zellbewegung, -adhäsion oder -migration steuern und damit entscheidend für die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe sind.

Insgesamt können die gewonnenen Daten zwar eine stressinduzierte Aktivierung aortaler Endothelzellen im Mausmodell zeigen, den Kausalzusammenhang zwischen dieser Aktivierung und der beobachteten vermehrten Leukozyteneinwanderung nach akutem psychosozialen Stress können sie allerdings nicht belegen. Dennoch ist der Schluss, dass die beobachtete stressinduziert gesteigerte Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle zu einer vermehrten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt, naheliegend und pathophysiologisch plausibel. Er deckt sich zudem mit Erkenntnissen aus der Literatur. Beispielsweise wiesen Park et al. (2013) nach, dass eine Hemmung von VCAM1 mittels

monoklonalen Antikörpern im Mausmodell zu einer verminderten Akkumulation von Leukozyten in atherosklerotischen Plaques führt. Auch eine genetische Downregulation von VCAM1 in ApoE-Knockout-Mäusen durch Dansky et al. (2001) resultierte in einer verminderten Monozytenadhäsion und geringeren Plaquegröße. Sager et al. (2016) gelang ein paralleles Gen-Silencing von VCAM1, ICAM1, ICAM2, E-Selectin und P-Selectin in ApoE-Knockout-Mäusen mittels Nanopartikel-basierter RNA-Interferenz. Die Autoren konnten zeigen, dass durch das Gen-Silencing der Zelladhäsionsmoleküle die Einwanderung von Leukozyten in atherosklerotische Plaques vermindert war. In ihren Experimenten zeigte eine alleinige Hemmung von VCAM1 eine Reduktion der Anzahl an aortalen neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, jedoch in geringerem Ausmaß als eine parallele Hemmung aller fünf Zelladhäsionsmoleküle.

Zusammenfassend belegen die gewonnenen Daten eine Aktivierung aortaler Endothelzellen durch akuten psychosozialen Stress und lassen auf eine hierdurch verstärkte Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques schließen.

Dabei ist zu beachten, dass sich keine signifikante Veränderung des LDL- bzw. Gesamtcholesterinspiegels im Blutplasma der Versuchstiere nach akutem psychosozialem Stress unabhängig vom verwendeten Stressmodell zeigte. Die stressinduzierte Aktivierung der Endothelzellen steht also nicht in Zusammenhang mit einem veränderten Lipidprofil.

2.3. Vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems ist ein wesentlicher Teil der physiologischen Stressreaktion (Ulrich-Lai and Herman 2009). Noradrenalin wird hierbei im Bereich der Endorgane aus peripheren Nervenendigungen in den Extrazellulärraum freigesetzt (Palkovits 2010). Wir entwickelten die Hypothese, dass akuter psychosozialer Stress vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass akuter psychosozialer Stress im atherosklerotischen Mausmodell zu einem erhöhten Noradrenalingehalt im Bereich der Aortenbögen führt. Ein entsprechender ELISA zur Quantifizierung von Noradrenalin zeigte in der Stressgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Werte im Bereich der Aortenbögen der Tiere, jedoch keinen Unterschied in deren Blutplasma. Daraus lässt sich eine gesteigerte lokale Noradrenalinfreisetzung ohne relevante systemische Komponente infolge von akutem psychosozialem Stress ableiten. (Hinterdobler, Schott, et al. 2021)

In einem zweiten Schritt konnte nachgewiesen werden, dass eine chemische Sympathektomie mittels 6-OHDA im murinen Atherosklerosemodell die stressinduzierte Einwanderung zirkulierender Leukozyten in die Aorta signifikant reduziert. Dazu wurde erneut ein adoptives

Zelltransferexperiment durchgeführt und den Empfängertieren (mit HFD gefütterte ApoE-Knockout-Mäuse) gleiche Mengen GFP⁺ Monozyten und neutrophiler Granulozyten intravenös injiziert. Nach akuter Stressexposition zeigten sich in den Aortenproben der Sympathektomiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Leukozyten und insbesondere weniger myeloische GFP⁺ Zellen (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Wie bereits unter V.2.1 beschrieben, kann hierdurch nicht explizit die Einwanderung der Leukozyten in die aortalen Plaques belegt werden, es ist jedoch davon auszugehen, dass die Zellakkumulation hauptsächlich im Bereich der atherosklerotischen Läsionen und nicht diffus im aortalen Gewebe stattfindet. Die Daten des Inhibitionsmodells sprechen also dafür, dass eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung die stressinduzierte Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques reduziert.

Die Funktion des sympathischen Nervensystems durch ein Inhibitionsmodell zu untersuchen ist ein in der Wissenschaft sehr etablierter Ansatz (Picklo 1997). Bei dem hier angewendeten chemischen Sympathektomiemodell mittels 6-OHDA tritt der neurotoxische Effekt nicht nur lokalisiert im Bereich der Aorta sondern ubiquitär im peripheren Nervensystem auf (siehe I.3.3). Hinterdobler, Schott, et al. (2021) ergänzten daher ein chirurgisches Sympathektomiemodell, bei welchem atherosklerotischen Mäusen bilateral das Ganglion cervicale superius operativ entfernt wurde. Hierdurch konnten sie eine lokale Sympathektomie des Aortenbogens bzw. des kardialen Plexus erreichen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der chemischen Sympathektomie zeigte sich in ihren Experimenten auch nach chirurgischer Sympathektomie eine verminderte stressinduzierte Leukozyteneinwanderung in die Aorta im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe.

Im Umkehrschluss lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass akuter psychosozialer Stress vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in atherosklerotische Plaques führt.

3. Einordnung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben neue Einblicke in die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen akutem psychosozialen Stress und Atherosklerose. Die Daten belegen, dass akuter psychosozialer Stress, vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung, zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in murine atherosklerotische Plaques führt. Dabei scheint es plausibel, dass die im Mausmodell ebenfalls nachgewiesene Endothelzellaktivierung durch akuten psychosozialen Stress der Vermittler dieses Effekts sein könnte. Zusätzliche Evidenz hierfür lieferten weiterführende Zellkulturexperimente von Hinterdobler, Schott, et al. (2021). Sie konnten nachweisen, dass eine

Stimulation mit Noradrenalin zu einer direkten Aktivierung von Endothelzellen führt. Genauer zeigte sich in ihren Experimenten eine vermehrte Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle und eine gesteigerte Chemokinproduktion, was sich in einer Zunahme der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten widerspiegelte.

Interessant ist dabei, dass ähnliche pathophysiologische Kaskaden auch im Zusammenhang mit akuten Myokardinfarkten beschrieben wurden. Sager et al. (2016) konnten in einem murinen Herzinfarktmodell nachweisen, dass eine Koronarligatur vermittelt durch eine erhöhte Sympathikusaktivität mit vermehrter Noradrenalinfreisetzung zu einer gesteigerten Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf aortalen Endothelzellen führt. In den letzten Jahren sind neuroimmunologische Interaktionen wie diese im Rahmen der Atheroskleroseforschung generell immer mehr in den Fokus gerückt (Hinterdobler, Schunkert, et al. 2021; Mohanta et al. 2022).

Adrenalin und Glukokortikoide wie Cortisol sind neben Noradrenalin weitere wichtige Akteure der physiologischen Stressreaktion (Ulrich-Lai and Herman 2009) und mögliche Ausgangspunkte neuroimmunologischer Interaktionen. Im Kontext der direkten Endothelzellaktivierung durch akuten Stress scheinen sie nach Hinterdobler, Schott, et al. (2021) aber keine Rolle zu spielen. Die Autoren wiesen nach akutem psychosozialen Stress zwar eine systemische Erhöhung von Adrenalin und Corticosteron im Mausmodell nach, ein Effekt der beiden auf das Expressionsprofil der Endothelzellen im Zellkulturexperiment zeigte sich anders als nach Stimulation mit Noradrenalin jedoch nicht.

Die Ausschüttung von Noradrenalin kann indes nicht nur direkten Einfluss auf die Endothelzellen selbst ausüben, sondern auch das sie umgebende hämodynamische Milieu beeinflussen (Hinterdobler, Schott, et al. 2021). Die Freisetzung von Stresshormonen führt zu einem Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck, was das Auftreten kardiovaskulärer Events fördern kann (Kivimäki and Steptoe 2018). Es ist nicht auszuschließen, dass die beobachtete stressinduzierte Endothelzellaktivierung zumindest in Teilen durch diese hormonell ausgelösten hämodynamischen Veränderungen hervorgerufen wurde. Entsprechende Untersuchungen von Hinterdobler, Schott, et al. (2021) konnten dies jedoch nicht bestätigen. In Zellkulturexperimenten stellten sie fest, dass sich die beobachtete noradrenalininduzierte Aktivierung von Endothelzellen bei Einwirkung von hohen bzw. niedrigen Scherkräften nicht signifikant unterschied. Den Autoren zufolge ist demnach davon auszugehen, dass Noradrenalin direkt und unabhängig von veränderten hämodynamischen Parametern zu einer Aktivierung von Endothelzellen mit gesteigerter Leukozytenadhäsion im Rahmen der akuten Stressreaktion führt. Dabei betonen die Autoren, dass zusätzlich zu dieser direkten Endothelzellaktivierung auch eine indirekte Stimulation der Endothelzellen durch Noradrenalin eine Rolle spielen könnte. Denkbar wäre ihnen zufolge beispielsweise eine gesteigerte noradrenalininduzierte Zytokinproduktion von Makrophagen und glatten Muskelzellen, die zu einer proinflammatorischen Stimulation von Endothelzellen führt.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die beobachtete noradrenalinvermittelte Leukozyteneinwanderung in atherosklerotische Plaques durch akuten psychosozialen Stress den vielfach in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen akutem Stress und vermehrten kardiovaskulären Events erklären kann (siehe I.2.3). Kardiovaskuläre Events wie Myokardinfarkte gehen häufig von einer Ruptur atherosklerotischer Plaques aus (Falk et al. 2013). Inflammatorische Prozesse innerhalb der atherosklerotischen Plaques können über einen Abbau des Kollagens bzw. eine Hemmung der Kollagenneusynthese zu einer Instabilität der fibrösen Kappe führen (Libby 2002, 2013). Zudem wird beispielsweise von Plaque-Makrophagen Tissue Factor freigesetzt, der im Falle einer Plaqueruptur einen prothrombotischen Trigger und damit möglichen Ausgangspunkt einer thrombotischen Gefäßokklusion darstellt (Libby 2002).

Ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Leukozyteneinwanderung in atherosklerotische Plaques durch akuten psychosozialen Stress und einer zunehmenden Plaquedestabilisierung scheint daher plausibel. Experimentell nachzuweisen, dass eine vermehrte Leukozyteneinwanderung in atherosklerotische Plaques de facto zu gehäuftten Plaquerupturen führt, ist jedoch sehr schwierig. Zur Erforschung der Atherosklerose werden in den meisten Fällen murine Tiermodelle eingesetzt (Getz and Reardon 2012). Murine atherosklerotische Plaques entwickeln jedoch in aller Regel keine Ruptur, wie wir sie von humanen Plaques als Ausgangspunkt thrombotischer Komplikationen kennen (Schwartz et al. 2007; Getz and Reardon 2012). Hinterdobler, Schott, et al. (2021) verwendeten daher ein chirurgisches Modell der Plaquedestabilisierung, um den Einfluss von akutem Stress auf das Auftreten von Plaquerupturen im Mausmodell zu untersuchen. Unter Einsatz dieses Modells konnten sie nach akuter Stressexposition ein vermehrtes Auftreten von Plaquerupturen sowie vermehrt myeloische Zellen bzw. weniger Kollagen und glatte Muskelzellen im Bereich der Plaques nachweisen. Übereinstimmend mit den klinischen Studien konnten die Autoren also einen Zusammenhang zwischen akutem psychosozialen Stress und Plaquerupturen belegen, ohne (bei aller Plausibilität) beweisen zu können, dass dies auf die beobachtete durch Stress induzierte noradrenalinvermittelte Leukozyteneinwanderung zurückzuführen ist. Hinterdobler, Schott, et al. betonen, dass diesbezüglich weitere Forschung notwendig ist.

Heidt et al. (2014) legten dar, dass chronischer psychosozialer Stress im Mausmodell ebenfalls zu einer Akkumulation inflammatorischer Leukozyten in atherosklerotischen Plaques sowie einer als vulnerabel geltenden Plaquemorphologie führt. Pathophysiologisch wiesen die Autoren hier, anders als beim akuten Stress, eine noradrenalininduzierte Proliferationssteigerung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark mit konsekutiver Leukozytose im Blut und Akkumulation der Zellen in den Plaques nach. Akuter und chronischer psychosozialer Stress scheinen also in unterschiedlicher Weise zur Atheroprogression beizutragen. Dennoch lassen sich auch einige Parallelen ziehen. Beide wirken übereinstimmend mit den Ergebnissen vieler klinischer Studien als kardiovaskulärer Risikofaktor (siehe I.2.3). Beide scheinen - wenn

auch in anderem zeitlichen Verlauf - zu einer Leukozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques mit erhöhter Vulnerabilität zu führen und Noradrenalin ist ein entscheidender Protagonist der pathophysiologischen Kaskade.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass Hinterdobler, Schott, et al. (2021) nach akutem psychosozialen Stress nicht nur eine vermehrte Leukozyteneinwanderung im Bereich atherosklerotischer Plaques sondern auch in andere Gewebe und Organe wie Haut, Lunge oder Herz nachweisen konnten. Sie diskutieren daher eine stressinduzierte Zellaufnahme ins Gewebe als pathophysiologisches Muster des Körpers im Rahmen der Stressreaktion. Dhabhar and McEwen (1996) wiesen bereits in den 1990-er Jahren ebenfalls eine vermehrte Leukozyteninfiltration der Haut infolge von akutem psychosozialen Stress im Mausmodell nach. Die Autoren interpretierten dies als Vorbereitung des Organismus auf die möglicherweise aus der Stressor-Einwirkung resultierenden immunologischen Herausforderungen. Anders ausgedrückt, ein Aufeinandertreffen mit einem Räuber wird mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Verletzungen führen, sodass das Immunsystem bereits im Vorfeld präpariert werden soll, um möglicherweise auftretende Wunden oder Infektionen besser bewältigen zu können (Barnum et al. 2012). Hinterdobler, Schott, et al. (2021) interpretieren ihre Ergebnisse in ähnlicher Weise: Es scheint, dass der Organismus verschiedene Gewebe und Organsysteme im Rahmen der Stressreaktion auf mögliche auftretende Herausforderungen wie Verletzungen oder Infektionen vorbereitet, noch bevor diese aufgetreten sind. Die Autoren betonen, dass dieser evolutionäre Mechanismus in früheren Zeiten von „Jagen und Sammeln“ von besonderer Bedeutung war. In der Moderne ergeben sich laut Hinterdobler, Schott, et al. hieraus aber auch nachteilige Interaktionen mit Formen der Atherosklerose - einer Erkrankung, die für unsere Vorfahren noch keine große Rolle gespielt hat.

4. Allgemeine Limitationen

Die dargestellten Untersuchungen und Erkenntnisse unterliegen neben den bereits weiter oben diskutierten experimentspezifischen Limitationen auch verschiedenen allgemeinen Limitationen.

Zum einen muss berücksichtigt werden, dass die hier verwendeten Stressmodelle relativ starke Stressoren beinhalten und in der Folge mutmaßlich eine ebenso starke Stressreaktion auslösen. Man muss sich daher bewusst sein, dass die beobachteten Effekte wahrscheinlich als Maximalform der Stressreaktion zu interpretieren sind. (Hinterdobler, Schott, et al. 2021)

Zum anderen muss beachtet werden, dass die Daten - wie in der modernen Forschung üblich - mithilfe von Tiermodellen gewonnen wurden. Murine Tiermodelle bieten insbesondere den Vorteil kurzer Generationszeiten, geringer Kosten und vielfältiger Möglichkeit der genetischen

Manipulation (Getz and Reardon 2012). Es bleibt jedoch die Frage, inwieweit die gewonnenen Daten auf den Menschen übertragbar sind. In Bezug auf Atherosklerose z.B. zeigen sich im murinen Atherosklerosemodell Plaques, die in ihren morphologischen Eigenschaften humanen Plaques ähneln, aber nicht gleichen (Schwartz et al. 2007; Jawień, Nastalek, and Korbust 2004). Wie weiter oben bereits diskutiert, ist dabei insbesondere zu beachten, dass bei murinen Atherosklerosemodellen in der Regel keine Plaqueruptur auftritt, wie wir sie vom Menschen als klassischen Ausgangspunkt thrombotischer Komplikationen kennen (Schwartz et al. 2007). Zudem weisen Mäuse generell ein anderes Lipidprofil als Menschen auf (Jawień, Nastalek, and Korbust 2004) und exprimieren u.a. andere Monozytensubpopulationen (Hristov and Heine 2015).

In Anbetracht dieser Differenzen kann keine uneingeschränkte Übertragbarkeit der murinen Daten auf den Menschen angenommen werden. Einige der hier mithilfe muriner Tiermodelle gewonnenen Ergebnisse konnten jedoch auch in einer humanen Studie von Hinterdobler, Schott, et al. (2021) beobachtet werden. Hierbei wurden Fußballfans vor und nach dem Verfolgen eines Fußballspiels ihrer Nationalmannschaft bei der Europameisterschaft untersucht. Das Ansehen des Fußballspiels führte zu einem Anstieg des subjektiv empfundenen Stresslevels. Im Blut der Probanden fiel infolge der Stressexposition übereinstimmend mit den Ergebnissen im Tiermodell eine Abnahme der Leukozytenzahlen, insbesondere der inflammatorischen Monozyten, auf. Heinz et al. (2003) wiederum konnten bei einer Gruppe von Ärzten nach akutem psychosozialen Stress (ausgelöst durch eine mündliche Präsentation) eine Zunahme von IL1 β , IL2 und löslichem ICAM1 im Blut nachweisen. Es lassen sich also in humanen Studien durchaus Parallelen zu den Ergebnissen der murinen Analysen finden. Dennoch bedarf es weiterer humaner Studien, um die Gültigkeit der präklinisch gewonnenen Erkenntnisse für den Menschen zu untersuchen.

5. Ausblick

Die hier gewonnenen präklinischen Daten belegen, dass akuter psychosozialer Stress, vermittelt durch eine vermehrte lokale Noradrenalinfreisetzung, zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Leukozyten in murine atherosklerotische Plaques führt. Darüber hinaus lassen sie vermuten, dass eine stressinduzierte Endothelzellaktivierung der Vermittler dieses Effekts sein könnte.

Die Ergebnisse liefern damit neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Zusammenhänge von akutem psychosozialen Stress und Atherosklerose. Es stellt sich nun die Frage, ob aus diesen pathophysiologischen Erkenntnissen in Anbetracht des klinischen Zusammenhangs zwischen akutem psychosozialen Stress und kardiovaskulären Erkrankungen bzw.

Events eine Therapiemöglichkeit ableitbar ist. Anders formuliert, kann durch eine zielgerichtete Intervention der akuten Stressreaktion bzw. der durch sie ausgelösten vaskulären Inflammation eine Reduktion der kardiovaskulären Komplikationen erreicht werden?

Generell sind in der Therapie der Atherosklerose in den letzten Jahren neben konsequenter Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren anti-inflammatorische Therapieansätze immer mehr in den Fokus gerückt (Libby and Everett 2019). Allerdings lösten diese in einer längerfristigen Anwendung auch relevante Nebenwirkungen aus (Ridker et al. 2017) (siehe I.1.4). Im Rahmen von akutem psychosozialen Stress wären Therapieansätze mittels „pill-in-the-pocket-Medikamenten“ oder psychologischen Akutinterventionen denkbar, die einerseits langfristige Nebenwirkungen vermeiden und - anders als bei einer Dauertherapie - eine hohe Compliance erreichen könnten. Weiter gedacht wäre auch ein präventiver Therapieansatz vor zu erwartenden Stresssituationen wie einer elektiven Operation vorstellbar, um das kardiovaskuläre Risiko zu minimieren. Dabei sollten insbesondere kardiovaskuläre Risikopatienten im Fokus solcher Therapieansätze stehen.

Erste vielversprechende präklinische Ergebnisse eines medikamentösen Therapieansatzes konnten Hinterdobler, Schott, et al. (2021) liefern. Sie zeigten in Erweiterung der hier durchgeführten Experimente, dass die noradrenalinduzierte Endothelzellaktivierung im Rahmen der akuten Stressreaktion zu einer vermehrten Freisetzung der Chemokine CXCL1 und CCL7 führt und eine vermehrte Leukozytenadhäsion fördert. Sie ergänzten daher ein Interventionsexperiment mit Hemmung von CXCL1 und CCL7 durch entsprechende Antikörper, wodurch eine Reduktion der stressinduzierten Leukozytenakkumulation in den Aorten atherosklerotischer Mäuse erreicht werden konnte. Die Autoren sehen darin einen potentiellen Ausgangspunkt für eine zielgerichtete Therapie zur Reduktion stressinduzierter kardiovaskulärer Komplikationen. Insgesamt ist jedoch dringend weitere Forschung nötig, um die präklinisch gewonnenen Erkenntnisse in mögliche humane Therapieansätze transformieren und deren Wirksamkeit verifizieren zu können.

Auch weitere präklinische Forschung zur Pathophysiologie von akutem psychosozialen Stress und Atherosklerose scheint lohnenswert, um zusätzliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Lag der Fokus der hier durchgeführten Untersuchungen auf einer stressinduzierten Endothelzellaktivierung, sollte in weiteren Experimenten z.B. der Stellenwert einer möglichen stressinduzierten Veränderung des Leukozytenphänotyps bzw. einer möglicherweise stressinduziert gesteigerten lokalen Zellproliferation innerhalb der atherosklerotischen Plaques untersucht werden. Je mehr Erkenntnisse über die pathophysiologischen Zusammenhänge von akutem psychosozialen Stress und Atherosklerose gewonnen werden können, desto größer sind die Chancen in der Zukunft wirksame Therapieansätze in Hinblick auf dieses klinisch bedeutsame Themenfeld zu finden.

VI. Quellen

- Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. 'Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior', *Science*, 317: 666-70.
- Barnum, C. J., T. W. Pace, F. Hu, G. N. Neigh, and M. G. Tansey. 2012. 'Psychological stress in adolescent and adult mice increases neuroinflammation and attenuates the response to LPS challenge', *J Neuroinflammation*, 9: 9.
- BD Biosciences. 2014. 'Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung', Accessed 04.08.2020. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=31055>.
- Belda, X., C. Márquez, and A. Armario. 2004. 'Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains', *Behav Brain Res*, 154: 399-408.
- Bentzon, J. F., F. Otsuka, R. Virmani, and E. Falk. 2014. 'Mechanisms of plaque formation and rupture', *Circ Res*, 114: 1852-66.
- Bernard, Claude. 1865. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* (J.B. Baillière et Fils: Paris), pp. 101-264.
- . 1878. *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux, Band 1* (J.B. Baillière et Fils: Paris), pp. 111-24.
- Bhattacharyya, M. R., and A. Steptoe. 2007. 'Emotional triggers of acute coronary syndromes: strength of evidence, biological processes, and clinical implications', *Prog Cardiovasc Dis*, 49: 353-65.
- Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadoul, and J. M. Verna. 2001. 'Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease', *Prog Neurobiol*, 65: 135-72.
- Boisvert, W. A., D. M. Rose, K. A. Johnson, M. E. Fuentes, S. A. Lira, L. K. Curtiss, and R. A. Terkeltaub. 2006. 'Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression', *Am J Pathol*, 168: 1385-95.
- Bowers, S. L., S. D. Bilbo, F. S. Dhabhar, and R. J. Nelson. 2008. 'Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice', *Brain Behav Immun*, 22: 105-13.
- Brotman, Daniel J., Sherita H. Golden, and Ilan S. Wittstein. 2007. 'The cardiovascular toll of stress', *The Lancet*, 370: 1089-100.
- Bu, D. X., M. Tarrio, N. Grabie, Y. Zhang, H. Yamazaki, G. Stavrakis, E. Maganto-Garcia, Z. Pepper-Cunningham, P. Jarolim, M. Aikawa, G. García-Cardena, and A. H. Lichtman. 2010. 'Statin-induced Krüppel-like factor 2 expression in human and mouse T cells reduces inflammatory and pathogenic responses', *J Clin Invest*, 120: 1961-70.
- Butcher, E. C. 1991. 'Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity', *Cell*, 67: 1033-6.
- Buynitsky, T., and D. I. Mostofsky. 2009. 'Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments', *Neurosci Biobehav Rev*, 33: 1089-98.
- Cannon, W. B. . 1929. 'ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS', *Physiological Reviews*, 9: 399-431.
- Chrousos, G. P. 2009. 'Stress and disorders of the stress system', *Nat Rev Endocrinol*, 5: 374-81.
- Cochain, C., E. Vafadarnejad, P. Arampatzi, J. Pelisek, H. Winkels, K. Ley, D. Wolf, A. E. Saliba, and A. Zernecke. 2018. 'Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis', *Circ Res*, 122: 1661-74.
- Cohen, S., P. J. Gianaros, and S. B. Manuck. 2016. 'A Stage Model of Stress and Disease', *Perspect Psychol Sci*, 11: 456-63.
- Collins, R. G., R. Velji, N. V. Guevara, M. J. Hicks, L. Chan, and A. L. Beaudet. 2000. 'P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice', *J Exp Med*, 191: 189-94.

- Cybulsky, M. I., K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J. C. Gutierrez-Ramos, P. W. Connelly, and D. S. Milstone. 2001. 'A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis', *J Clin Invest*, 107: 1255-62.
- Dansky, H. M., C. B. Barlow, C. Lominska, J. L. Sikes, C. Kao, J. Weinsaft, M. I. Cybulsky, and J. D. Smith. 2001. 'Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1662-7.
- Dayas, C. V., K. M. Buller, J. W. Crane, Y. Xu, and T. A. Day. 2001. 'Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups', *Eur J Neurosci*, 14: 1143-52.
- Dhabhar, F. S. 2003. 'Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function', *Ann N Y Acad Sci*, 992: 205-17.
- Dhabhar, F. S., and B. S. McEwen. 1996. 'Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity', *J Immunol*, 156: 2608-15.
- . 1997. 'Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking', *Brain Behav Immun*, 11: 286-306.
- Diamandis, E. P., and T. K. Christopoulos. 1991. 'The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology', *Clin Chem*, 37: 625-36.
- Dimsdale, J. E. 2008. 'Psychological stress and cardiovascular disease', *J Am Coll Cardiol*, 51: 1237-46.
- DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH. 2018. 'Arbeitsanleitung Noradrenalin High Sensitive ELISA', Accessed 06.08.2020. https://www.dld-diagnostika.de/uploads/uploads/Nadhs-d_4.pdf.
- Dragano, N., J. Siegrist, S. T. Nyberg, T. Lunau, E. I. Fransson, L. Alfredsson, J. B. Bjorner, M. Borritz, H. Burr, R. Erbel, G. Fahlén, M. Goldberg, M. Hamer, K. Heikkilä, K. H. Jöckel, A. Knutsson, I. E. H. Madsen, M. L. Nielsen, M. Nordin, T. Oksanen, J. H. Pejtersen, J. Pentti, R. Rugulies, P. Salo, J. Schupp, A. Singh-Manoux, A. Steptoe, T. Theorell, J. Vahtera, P. J. M. Westerholm, H. Westerlund, M. Virtanen, M. Zins, G. D. Batty, and M. Kivimäki. 2017. 'Effort-Reward Imbalance at Work and Incident Coronary Heart Disease: A Multicohort Study of 90,164 Individuals', *Epidemiology*, 28: 619-26.
- Falk, E., M. Nakano, J. F. Bentzon, A. V. Finn, and R. Virmani. 2013. 'Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view', *Eur Heart J*, 34: 719-28.
- Falk, E., P. K. Shah, and V. Fuster. 1995. 'Coronary plaque disruption', *Circulation*, 92: 657-71.
- Förster, T. 1948. 'Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz', *Annalen der Physik*, 437: 55-75.
- Fulcher, J., R. O'Connell, M. Voysey, J. Emberson, L. Blackwell, B. Mihaylova, J. Simes, R. Collins, A. Kirby, H. Colhoun, E. Braunwald, J. La Rosa, T. R. Pedersen, A. Tonkin, B. Davis, P. Sleight, M. G. Franzosi, C. Baigent, and A. Keech. 2015. 'Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials', *Lancet*, 385: 1397-405.
- Gameiro, G. H., P. H. Gameiro, S. Andrade Ada, L. F. Pereira, M. T. Arthuri, F. K. Marcondes, and M. C. Veiga. 2006. 'Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress', *Physiol Behav*, 87: 643-9.
- Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. 'Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties', *Immunity*, 19: 71-82.
- Geovanini, G. R., and P. Libby. 2018. 'Atherosclerosis and inflammation: overview and updates', *Clin Sci (Lond)*, 132: 1243-52.
- Getz, G. S., and C. A. Reardon. 2012. 'Animal models of atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 1104-15.
- Glaser, R., and J. K. Kiecolt-Glaser. 2005. 'Stress-induced immune dysfunction: implications for health', *Nat Rev Immunol*, 5: 243-51.
- Golbidi, S., J. C. Frisbee, and I. Laher. 2015. 'Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308: H1476-98.

- Goldstein, D. S. 2010. 'Sympathetic Nervous System.' in G. Fink (ed.), *Stress Science: Neuroendocrinology* (Academic Press: San Diego), pp. 290-96.
- Goldstein, D. S., and I. J. Kopin. 2007. 'Evolution of concepts of stress', *Stress*, 10: 109-20.
- Goldyn, B., M. Hromada, A. Surmacki, and P. Tryjanowski. 2003. 'Habitat use and diet of the red fox *Vulpes vulpes* in an agricultural landscape in Poland', *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 49: 191-200.
- Graham, R. C., Jr., U. Lundholm, and M. J. Karnovsky. 1965. 'CYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF PEROXIDASE ACTIVITY WITH 3-AMINO-9-ETHYLCARBAZOLE', *J Histochem Cytochem*, 13: 150-2.
- Gu, L., Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby, and B. J. Rollins. 1998. 'Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice', *Mol Cell*, 2: 275-81.
- Hau, J. 2011. 'Animal models.' in J. Hau and S. Shapiro (eds.), *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume II* (CRC Press: Boca Raton), pp. 1-10.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. 1996. 'Real time quantitative PCR', *Genome Res*, 6: 986-94.
- Heidt, T., H. B. Sager, G. Courties, P. Dutta, Y. Iwamoto, A. Zaltsman, C. von Zur Muhlen, C. Bode, G. L. Frischione, J. Denninger, C. P. Lin, C. Vinegoni, P. Libby, F. K. Swirski, R. Weissleder, and M. Nahrendorf. 2014. 'Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells', *Nat Med*, 20: 754-58.
- Heinz, A., D. Hermann, M. N. Smolka, M. Rieks, K. J. Gräf, D. Pöhlau, W. Kuhn, and M. Bauer. 2003. 'Effects of acute psychological stress on adhesion molecules, interleukins and sex hormones: implications for coronary heart disease', *Psychopharmacology (Berl)*, 165: 111-7.
- Herzenberg, L. A., R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg. 1976. 'Fluorescence-activated cell sorting', *Sci Am*, 234: 108-17.
- Hilgendorf, I., F. K. Swirski, and C. S. Robbins. 2015. 'Monocyte fate in atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35: 272-9.
- Hinterdobler, J., S. Schott, H. Jin, A. Meesmann, A. L. Steinsiek, A. S. Zimmermann, J. Wobst, P. Müller, C. Mauersberger, B. Vilne, A. Baecklund, C. S. Chen, A. Moggio, Q. Braster, M. Molitor, M. Krane, W. E. Kempf, K. H. Ladwig, M. Hristov, M. Hulsmans, I. Hilgendorf, C. Weber, P. Wenzel, C. Scheiermann, L. Maegdefessel, O. Soehnlein, P. Libby, M. Nahrendorf, H. Schunkert, T. Kessler, and H. B. Sager. 2021. 'Acute mental stress drives vascular inflammation and promotes plaque destabilization in mouse atherosclerosis', *Eur Heart J*, 42: 4077-88.
- Hinterdobler, J., H. Schunkert, T. Kessler, and H. B. Sager. 2021. 'Impact of Acute and Chronic Psychosocial Stress on Vascular Inflammation', *Antioxid Redox Signal*, 35: 1531-50.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991. 'Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 7276-80.
- Hristov, M., and G. H. Heine. 2015. 'Monocyte subsets in atherosclerosis', *Hamostaseologie*, 35: 105-12.
- Hristov, M., and C. Weber. 2011. 'Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis', *Thromb Haemost*, 106: 757-62.
- Hsu, S. M., L. Raine, and H. Fanger. 1981. 'Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures', *J Histochem Cytochem*, 29: 577-80.
- Huo, Y., C. Weber, S. B. Forlow, M. Sperandio, J. Thatte, M. Mack, S. Jung, D. R. Littman, and K. Ley. 2001. 'The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium', *J Clin Invest*, 108: 1307-14.
- Jawień, J., P. Nastalek, and R. Korbut. 2004. 'Mouse models of experimental atherosclerosis', *J Physiol Pharmacol*, 55: 503-17.
- Kent Scientific Corporation. n.d. 'CODATM Animal Holders. Medium Mouse Holder (Mice 25 to 50 g)', Accessed 29.07.2020. <https://www.kentscientific.com/products/coda-animal-holders/>.

- Kivimäki, M., S. T. Nyberg, G. D. Batty, E. I. Fransson, K. Heikkilä, L. Alfredsson, J. B. Björner, M. Borritz, H. Burr, A. Casini, E. Clays, D. De Bacquer, N. Dragano, J. E. Ferrie, G. A. Geuskens, M. Goldberg, M. Hamer, W. E. Hoofman, I. L. Houtman, M. Joensuu, M. Jokela, F. Kittel, A. Knutsson, M. Koskenvuo, A. Koskinen, A. Kouvonen, M. Kumari, I. E. Madsen, M. G. Marmot, M. L. Nielsen, M. Nordin, T. Oksanen, J. Pentti, R. Rugulies, P. Salo, J. Siegrist, A. Singh-Manoux, S. B. Suominen, A. Väänänen, J. Vahtera, M. Virtanen, P. J. Westerholm, H. Westerlund, M. Zins, A. Steptoe, and T. Theorell. 2012. 'Job strain as a risk factor for coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of individual participant data', *Lancet*, 380: 1491-7.
- Kivimäki, M., and A. Steptoe. 2018. 'Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease', *Nat Rev Cardiol*, 15: 215-29.
- Koolhaas, J. M., A. Bartolomucci, B. Buwalda, S. F. de Boer, G. Flugge, S. M. Korte, P. Meerlo, R. Murison, B. Olivier, P. Palanza, G. Richter-Levin, A. Sgoifo, T. Steimer, O. Stiedl, G. van Dijk, M. Wöhr, and E. Fuchs. 2011. 'Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept', *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 1291-301.
- Kostrzewa, R. M. 2007. 'The blood-brain barrier for catecholamines - revisited', *Neurotox Res*, 11: 261-71.
- Kostrzewa, R. M., and D. M. Jacobowitz. 1974. 'Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine', *Pharmacol Rev*, 26: 199-288.
- Lagraauw, H. M., J. Kuiper, and I. Bot. 2015. 'Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies', *Brain Behav Immun*, 50: 18-30.
- Larsen, L. E., R. M. Stoeckenbroek, J. J. P. Kastelein, and A. G. Holleboom. 2019. 'Moving Targets: Recent Advances in Lipid-Lowering Therapies', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39: 349-59.
- Lee, S., G. A. Colditz, L. F. Berkman, and I. Kawachi. 2003. 'Caregiving and risk of coronary heart disease in U.S. women: a prospective study', *Am J Prev Med*, 24: 113-9.
- Leor, J., and R. A. Kloner. 1996. 'The Northridge earthquake as a trigger for acute myocardial infarction', *Am J Cardiol*, 77: 1230-2.
- Levine, S., and H. Ursin. 1991. 'What is Stress?' in M.R. Brown, G.F. Koob and C. Rivier (eds.), *Stress: neurobiology and neuroendocrinology* (Marcel Dekker, Inc.: New York), pp. 3-21.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. 'Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated', *Nat Rev Immunol*, 7: 678-89.
- Libby, P. 2002. 'Inflammation in atherosclerosis', *Nature*, 420: 868-74.
- . 2013. 'Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy', *N Engl J Med*, 368: 2004-13.
- Libby, P., and B. M. Everett. 2019. 'Novel Antiatherosclerotic Therapies', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39: 538-45.
- Libby, P., G. Pasterkamp, F. Crea, and I. K. Jang. 2019. 'Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes', *Circ Res*, 124: 150-60.
- Libby, P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. 2011. 'Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis', *Nature*, 473: 317-25.
- Lin, J. H., Y. Zhu, H. L. Liao, Y. Kobari, L. Groszek, and M. B. Stemerman. 1996. 'Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein', *Atherosclerosis*, 127: 185-94.
- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. 1995. 'Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization', *PCR Methods Appl*, 4: 357-62.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Lusis, A. J. 2000. 'Atherosclerosis', *Nature*, 407: 233-41.
- Luttmann, Werner. 2009. *Der Experimentator: Immunologie* (Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg), pp. 73-5.
- . 2014. *Der Experimentator: Immunologie* (Springer Spektrum: Berlin [u.a.]), pp. 73-101.

- Mahley, R. W. 1988. 'Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology', *Science*, 240: 622-30.
- Malmfors, T., and C. Sachs. 1968. 'Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-hydroxydopamine', *Eur J Pharmacol*, 3: 89-92.
- McEwen, B. 2010. 'Stress: Homeostasis, Rheostasis, Allostasis and Allostatic Load.' in G. Fink (ed.), *Stress Science: Neuroendocrinology* (Academic Press: San Diego), pp. 10-14.
- McEwen, B. S., and R. M. Sapolsky. 1995. 'Stress and cognitive function', *Curr Opin Neurobiol*, 5: 205-16.
- Meisel, S. R., I. Kutz, K. I. Dayan, H. Pauzner, I. Chetboun, Y. Arbel, and D. David. 1991. 'Effect of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians', *Lancet*, 338: 660-1.
- Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. n.d. 'MACS Handbook. Magnetic cell separation', Accessed 08.09.2023. <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macs-handbook/macs-technologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html>.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. 'High gradient magnetic cell separation with MACS', *Cytometry*, 11: 231-8.
- Mittleman, M. A., M. Maclure, J. B. Sherwood, R. P. Mulry, G. H. Tofler, S. C. Jacobs, R. Friedman, H. Benson, and J. E. Muller. 1995. 'Triggering of acute myocardial infarction onset by episodes of anger. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators', *Circulation*, 92: 1720-5.
- Mohanta, S. K., L. Peng, Y. Li, S. Lu, T. Sun, L. Carnevale, M. Perrotta, Z. Ma, B. Förstera, K. Stanic, C. Zhang, X. Zhang, P. Szczepaniak, M. Bianchini, B. R. Saeed, R. Carnevale, D. Hu, R. Nosalski, F. Pallante, M. Beer, D. Santovito, A. Ertürk, T. C. Mettenleiter, B. G. Klupp, R. T. A. Megens, S. Steffens, J. Pelisek, H. H. Eckstein, R. Kleemann, L. Habenicht, Z. Mallat, J. B. Michel, J. Bernhagen, M. Dichgans, G. D'Agostino, T. J. Guzik, P. S. Olofsson, C. Yin, C. Weber, G. Lembo, D. Carnevale, and A. J. R. Habenicht. 2022. 'Neuroimmune cardiovascular interfaces control atherosclerosis', *Nature*, 605: 152-59.
- Nahrendorf, M. 2018. 'Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease', *Nat Med*, 24: 711-20.
- Nahrendorf, M., and F. K. Swirski. 2016. 'Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function', *Circ Res*, 119: 414-7.
- Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow, and R. Ross. 1994. 'ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree', *Arterioscler Thromb*, 14: 133-40.
- Pacák, K., and M. Palkovits. 2001. 'Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders', *Endocr Rev*, 22: 502-48.
- Pacak, K., M. Palkovits, G. Yadid, R. Kvetnansky, I. J. Kopin, and D. S. Goldstein. 1998. 'Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity', *Am J Physiol*, 275: R1247-55.
- Palkovits, M. 2010. 'Sympathoadrenal System: Neural Arm of the Stress Response.' in G. Fink (ed.), *Stress Science: Neuroendocrinology* (Academic Press: San Diego), pp. 284-90.
- Park, J. G., S. Y. Ryu, I. H. Jung, Y. H. Lee, K. J. Kang, M. R. Lee, M. N. Lee, S. K. Sonn, J. H. Lee, H. Lee, G. T. Oh, K. Moon, and H. Shim. 2013. 'Evaluation of VCAM-1 antibodies as therapeutic agent for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice', *Atherosclerosis*, 226: 356-63.
- Patchev, V. K., and A. V. Patchev. 2006. 'Experimental models of stress', *Dialogues Clin Neurosci*, 8: 417-32.
- Picklo, M. J. 1997. 'Methods of sympathetic degeneration and alteration', *J Auton Nerv Syst*, 62: 111-25.
- Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow. 1992. 'Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells', *Cell*, 71: 343-53.

- Pritchard, K. A., Jr., R. R. Tota, J. H. Lin, K. J. Danishefsky, B. A. Kurilla, J. A. Holland, and M. B. Stemerman. 1991. 'Native low density lipoprotein. Endothelial cell recruitment of mononuclear cells', *Arterioscler Thromb*, 11: 1175-81.
- Ray, K. K., and C. P. Cannon. 2005. 'The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes', *J Am Coll Cardiol*, 46: 1425-33.
- Ridker, P. M. 2016. 'Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin', *Eur Heart J*, 37: 1720-2.
- Ridker, P. M., B. M. Everett, T. Thuren, J. G. MacFadyen, W. H. Chang, C. Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S. D. Anker, J. J. P. Kastelein, J. H. Cornel, P. Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kobalava, L. Vida-Simiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M. Dellborg, P. R. F. Rossi, R. P. T. Troquay, P. Libby, and R. J. Glynn. 2017. 'Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease', *N Engl J Med*, 377: 1119-31.
- Ridker, P. M., J. G. MacFadyen, B. M. Everett, P. Libby, T. Thuren, and R. J. Glynn. 2018. 'Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial', *Lancet*, 391: 319-28.
- Robbins, C. S., I. Hilgendorf, G. F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J. L. Figueiredo, R. Gorbatov, G. K. Sukhova, L. M. Gerhardt, D. Smyth, C. C. Zavitz, E. A. Shikatani, M. Parsons, N. van Rooijen, H. Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F. K. Swirski. 2013. 'Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis', *Nat Med*, 19: 1166-72.
- Rosengren, A., S. Hawken, S. Ounpuu, K. Sliwa, M. Zubaid, W. A. Almahmeed, K. N. Blackett, C. Sitthi-amorn, H. Sato, and S. Yusuf. 2004. 'Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study', *Lancet*, 364: 953-62.
- Ross, R. 1999. 'Atherosclerosis--an inflammatory disease', *N Engl J Med*, 340: 115-26.
- Ross, R., and L. Harker. 1976. 'Hyperlipidemia and atherosclerosis', *Science*, 193: 1094-100.
- Sachs, C. 1973. 'Development of the blood-brain barrier for 6-hydroxydopamine', *J Neurochem*, 20: 1753-60.
- Sager, H. B., P. Dutta, J. E. Dahlman, M. Hulsmans, G. Courties, Y. Sun, T. Heidt, C. Vinegoni, A. Borodovsky, K. Fitzgerald, G. R. Wojtkiewicz, Y. Iwamoto, B. Tricot, O. F. Khan, K. J. Kauffman, Y. Xing, T. E. Shaw, P. Libby, R. Langer, R. Weissleder, F. K. Swirski, D. G. Anderson, and M. Nahrendorf. 2016. 'RNAi targeting multiple cell adhesion molecules reduces immune cell recruitment and vascular inflammation after myocardial infarction', *Sci Transl Med*, 8: 342ra80.
- Schaefer, B. C., M. L. Schaefer, J. W. Kappler, P. Marrack, and R. M. Kedl. 2001. 'Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo', *Cell Immunol*, 214: 110-22.
- Schwartz, S. M., Z. S. Galis, M. E. Rosenfeld, and E. Falk. 2007. 'Plaque rupture in humans and mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 705-13.
- Selye, H. 1973. 'The evolution of the stress concept', *Am Sci*, 61: 692-9.
- Smalley, D. M., J. H. Lin, M. L. Curtis, Y. Kobari, M. B. Stemerman, and K. A. Pritchard, Jr. 1996. 'Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16: 585-90.
- Staples, L. G. 2010. 'Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: learning-mediated consequences beyond the initial exposure', *Neurobiol Learn Mem*, 94: 435-45.
- Statistisches Bundesamt (Destatis). 2017. 'Todesursachen in Deutschland', Accessed 02.01.2024. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publikationen/Downloads-Todesursachen/todesursachen-2120400157004.pdf?__blob=publicationFile.
- Steptoe, A. 2000. 'Stress effects, overview.' in G. Fink (ed.), *Encyclopedia of Stress* (Academic Press: San Diego), pp. 510-11.
- Steptoe, A., and L. Brydon. 2009. 'Emotional triggering of cardiac events', *Neurosci Biobehav Rev*, 33: 63-70.

- Steptoe, A., and M. Kivimäki. 2012. 'Stress and cardiovascular disease', *Nat Rev Cardiol*, 9: 360-70.
- Steptoe, A., and M. Kivimäki. 2013. 'Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge', *Annu Rev Public Health*, 34: 337-54.
- Swirski, F. K., M. J. Pittet, M. F. Kircher, E. Aikawa, F. A. Jaffer, P. Libby, and R. Weissleder. 2006. 'Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 10340-45.
- Tranzer, J. P., and H. Thoenen. 1968. 'An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine', *Experientia*, 24: 155-6.
- Ulrich-Lai, Y. M., and J. P. Herman. 2009. 'Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses', *Nat Rev Neurosci*, 10: 397-409.
- Verna, L., C. Ganda, and M. B. Stemerman. 2006. 'In vivo low-density lipoprotein exposure induces intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 correlated with activator protein-1 expression', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 1344-9.
- Vernet-Maury, E. 1980. 'Trimethyl-thiazoline in fox feces: A natural alarming substance for the rat.' in H. Van der Starre (ed.), *Olfaction and Taste VII: Proceedings of the seventh International Symposium on Olfaction and Taste and of the fourth congress of the European Chemoreception Research Organization* (IRL Press: London), pp. 407.
- Vernet-Maury, E., E. H. Polak, and A. Demaël. 1984. 'Structure-activity relationship of stress-inducing odorants in the rat', *J Chem Ecol*, 10: 1007-18.
- Virmani, R., A. P. Burke, A. Farb, and F. D. Kolodgie. 2002. 'Pathology of the unstable plaque', *Prog Cardiovasc Dis*, 44: 349-56.
- Visseren, F. L. J., F. Mach, Y. M. Smulders, D. Carballo, K. C. Koskinas, M. Bäck, A. Benetos, A. Biffi, J. M. Boavida, D. Capodanno, B. Cosyns, C. Crawford, C. H. Davos, I. Desormais, E. Di Angelantonio, O. H. Franco, S. Halvorsen, F. D. R. Hobbs, M. Hollander, E. A. Jankowska, M. Michal, S. Sacco, N. Sattar, L. Tokgozoglu, S. Tonstad, K. P. Tsoufis, I. van Dis, I. C. van Gelder, C. Wanner, and B. Williams. 2021. '2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice', *Eur Heart J*, 42: 3227-337.
- Viswanathan, K., and F. S. Dhabhar. 2005. 'Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 5808-13.
- Wakade, A. R. 1979. 'Recent developments in degeneration of the sympathetic neuron', *Gen Pharmacol*, 10: 351-7.
- Weber, C. 2003. 'Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules', *J Mol Med (Berl)*, 81: 4-19.
- Weber, C., and H. Noels. 2011. 'Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options', *Nat Med*, 17: 1410-22.
- Wilbert-Lampen, U., D. Leistner, S. Greven, T. Pohl, S. Sper, C. Völker, D. Güthlin, A. Plasse, A. Knez, H. Küchenhoff, and G. Steinbeck. 2008. 'Cardiovascular events during World Cup soccer', *N Engl J Med*, 358: 475-83.
- Willemsen, L., and M. P. de Winther. 2020. 'Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies', *J Pathol*, 250: 705-14.
- Woollard, K. J., and F. Geissmann. 2010. 'Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions', *Nat Rev Cardiol*, 7: 77-86.
- World Health Organization. 2020. 'The top 10 causes of death', Accessed 02.01.2021. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Zernecke, A., and C. Weber. 2010. 'Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis', *Cardiovasc Res*, 86: 192-201.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, B. Burkey, and N. Maeda. 1994. 'Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption', *J Clin Invest*, 94: 937-45.

- Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda. 1992. 'Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E', *Science*, 258: 468-71.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. 2010. 'Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood', *Blood*, 116: e74-80.

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen und Institutionen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hendrik Sager, für die Möglichkeit meine Promotion unter seiner Anleitung anzufertigen. Seine Begeisterung für wissenschaftliche Forschung war ansteckend und ich bin für seine konstruktive und herzliche Betreuung sehr dankbar.

Meine Promotion durfte ich am Deutschen Herzzentrum München in der Klinik für Herz-Kreislauferkrankungen absolvieren. Ich möchte Prof. Dr. Heribert Schunkert, dem Direktor dieser Klinik, meinen großen Dank für diese Möglichkeit aussprechen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinem Mentor Prof. Dr. Thorsten Kessler sowie allen Mitgliedern der AG Schunkert und AG Sager. Ich habe das kollegiale Miteinander und den gemeinsamen Austausch als sehr bereichernd erlebt. Besonders möchte ich Anna-Lena Steiniek und Julia Hinterdobler für ihr wertvolles Feedback und ihre Unterstützung danken.

Auch bei PD Dr. Michael Hristov vom IPEK der LMU München möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung des FACS Zellsortings bedanken.

Besonderer Dank gilt darüber hinaus der Munich Heart Alliance und dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V., die die Anfertigung dieser Dissertation im Rahmen eines Doktorandenstipendiums unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation während aller Phasen dieser Dissertation bedanken. Ohne euren Rückhalt wäre das alles nicht möglich gewesen!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Anna-Sophia Zimmermann, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Der Einfluss von akutem psychosozialen Stress auf den Progress der Atherosklerose –
noradrenalinvermittelte Leukozyteneinwanderung in murine atherosklerotische Plaques
durch akuten psychosozialen Stress

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, den 02.01.2024

Anna-Sophia Zimmermann