



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Akuter psychischer Stress und Leukozyten-Rekrutierung in atherosklerotische Plaques - neue mechanistische Erkenntnisse

Almut Helene Meesmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hendrik Sager
2. Priv.-Doz. Dr. Maria Isabell Bernlochner

Die Dissertation wurde am 15.02.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Zusammenfassung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Koronare Herzkrankheit	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose	2
1.2 Risikofaktoren	4
1.2.1 Nicht-modifizierbare Risikofaktoren	4
1.2.2 Modifizierbare Risikofaktoren	5
1.3 Akuter psychischer Stress und Atherosklerose.....	6
1.3.1 Verminderung von Leukozyten in Blut	7
1.3.2 Rekrutierung von Leukozyten in atherosklerotische Plaques.....	8
1.3.3 Endothelzellen.....	11
1.4 Zielsetzung.....	15
2 Material.....	16
2.1 Tierexperimente	16
2.2 Zelllinie.....	17
2.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	17
2.4 Lösungen und Puffer	18
2.5 Antikörper.....	19
2.6 Verbrauchsmaterialien	20
2.7 Geräte.....	20
2.8 Software.....	21
3 Methoden	22
3.1 Tierstämme	22
3.1.1 Tierhaltung	22

3.1.2	Stressprozedur.....	22
3.1.3	Organentnahme	23
3.1.4	Denervation.....	24
3.2	ELISA.....	25
3.3	Immunhistochemie	26
3.4	Western Blot	27
3.5	Statische Zellkulturexperimente	28
3.6	Dynamische Zellkulturexperimente (Flusskammer)	30
3.7	Durchflusszytometrie.....	33
3.8	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Hormonelle Reaktion auf akuten psychischen Stress	35
4.1.1	Anstieg der Stresshormone	35
4.1.2	Tyrosin Hydroxylase-Spiegel in der Tunica adventitia nach Stress.....	36
4.1.3	Phosphorylierung der der Tyrosin Hydroxylase	38
4.2	Auswirkung der sympathischen Denervation	39
4.2.1	Abfall von Noradrenalin in Aortenbögen	39
4.2.2	Tyrosin Hydroxylase-Spiegel in der Tunica adventitia nach Denervation.....	40
4.3	Phänotypische Veränderungen kultivierter Endothelzellen durch Stress	42
4.3.1	Effekt von Stresshormonen unter statischen Bedingungen	42
4.3.2	Effekt von Scherstress unter Flussbedingungen.....	46
5	Diskussion.....	47
5.1	Hormonelle Reaktion auf akuten psychischen Stress	47
5.2	Auswirkung der sympathischen Denervation	49
5.3	Phänotypische Veränderungen kultivierter Endothelzellen durch Stress	51
5.4	Fazit und Ausblick	54
	Literaturverzeichnis	VI
	Anhang.....	XV

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache. Pathophysiologische Grundlage für viele dieser Erkrankungen ist die Ausbildung atherosklerotischer Plaques, deren Ruptur zu schwerwiegenden oder gar tödlichen Folgen führen kann. Es gibt unterschiedliche Trigger, die eine Plaque-Ruptur auslösen können, so zum Beispiel auch akute emotionale Stress-Situationen. Charakteristikum vulnerabler Plaques ist ein hoher Gehalt an Leukozyten, zu deren Rekrutierung eine enge Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten notwendig ist. Im Fokus dieser Arbeit stehen die physiologische Reaktion auf akuten Stress und die dadurch hervorgerufenen phänotypischen Veränderungen des Endothels.

Hierfür wurden unterschiedliche Stressmodelle angewandt. Im Tiermodell wurden Mäuse durch Immobilisation akutem psychischem Stress ausgesetzt. Dadurch konnten durch Stress hervorgerufene hormonelle Veränderungen im Blut und der Noradrenalin-Spiegel in der Aortenwand analysiert werden. Diese Messungen wurden bei Mäusen mit und ohne Noradrenalin-Depletion (induziert durch chirurgische sympathische Denervation des Aortenbogens) durchgeführt. *In vitro* wurden Endothelzellen unter statischen Bedingungen mit den Stresshormonen Noradrenalin, Adrenalin und Kortikosteron inkubiert und auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Ebenso wurde *in vitro* untersucht, ob ein durch ein Pumpsystem-erzeugter Scherstress, welcher die Scherkräfte auf Gefäße durch Blutdruckschwankungen widerspiegeln soll, zu einer veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen führt.

Es konnte gezeigt werden, dass Stress in unserem Mausmodell dieselben Signalwege wie im Menschen aktiviert und es folglich zur Erhöhung der Stresshormone Noradrenalin, Adrenalin und Kortikosteron kommt. Zusätzlich konnte die gezielte Unterbindung des Noradrenalin-Signalwegs durch chirurgische Denervation bestätigt werden. Des Weiteren zeigen *in vitro* Ergebnisse, dass besonders Noradrenalin eine bedeutende Rolle in der Stressreaktion spielt, da unter Inkubation eine erhöhte Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen beobachtet wurde. Auch die Annahme, dass durch höhere Scherstresswerte stärkere Expressionen von Adhäsionsmolekülen hervorrufen, wurde belegt.

Ergebnisse dieser Arbeit liefern Ansatzpunkte für eine Erklärung von klinisch-kardialen Ereignissen, die durch Stress gehäuft auftreten. Darüber hinaus könnte dieses Modell zur Testung von Medikamenten herangezogen werden, die die Leukozyten-Endothel-Interaktion beeinflussen.

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. The pathophysiological basis in many cases is the formation of atherosclerotic plaques, the rupture of which can lead to serious or even fatal consequences. The mechanism for the increasing instability of the plaques is largely unexplained. However, stressful situations may trigger major adverse cardiovascular events. Vulnerable plaques are characterized by a high content of leukocytes, the recruitment of which requires a close interaction between endothelium and leukocytes. This work focuses on the physiological response to acute stress and the resulting phenotypic changes of the endothelium.

For this purpose different stress models have been applied. In animal models, mice were exposed to acute psychological stress by immobilization. Stress induced hormonal changes in the blood and in norepinephrine levels in the aortic wall could be analyzed. These measurements were performed in mice with and without norepinephrine depletion (induced by surgical sympathetic denervation of the aortic arch). *In vitro*, endothelial cells were incubated under static conditions with the stress hormones norepinephrine, adrenaline and corticosterone and examined for resulting expression of cell adhesion molecules by flow cytometry. We also investigated *in vitro* whether shear stress generated by a pump system, which is supposed to reflect the change in shear force on the vessel due to blood pressure fluctuations, leads to an altered expression of cell adhesion molecules.

It could be shown that stress in our mouse model activates the same signaling pathways as in humans and consequently leads to an increase in the stress hormones norepinephrine, adrenaline and corticosterone. In addition, the targeted suppression of the norepinephrine signaling pathway could be confirmed by surgical denervation. Furthermore, *in vitro* results show that in particular noradrenaline plays a significant role in the stress response, since an increased expression of cell adhesion molecules on endothelial cells was observed under incubation. The assumption that higher shear stress values cause stronger expression of adhesion molecules was also confirmed. The results of this work provide starting points for an explanation of clinical cardiac events that occur more frequently due to stress. Furthermore, this model could be used to test drugs that influence leukocyte-endothelial interaction.

Abkürzungsverzeichnis

ACS	acute coronary syndrome (akutes Koronarsyndrom)
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E Knockout-Maus
BSA	bovine serum albumin (bovines Serumalbumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzymimmunoassay)
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCD	hoch-cholesterinhaltige Diät
HCL	hydrochloric acid (Salzsäure)
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM	intracellular adhesion molecules (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low-density Lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)
mAoECs	murine aortic endothelial cells (Endothelzellen der Mausaorta)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
pTH	Phospho-Tyrosin Hydroxylase
RCF	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
RH	releasing hormone (Liberin)
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer (Radioimmunpräzipitationsassaypuffer)
SAM	sympathetic adrenal medullary axis (Sympathikus-Nebennierenmark-Achse)
SCG	superior cervical ganglion (oberes Halsganglion)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SNS	sympathisches Nervensystem
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TH	Tyrosin Hydroxylase
VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursache nach Krankheitsarten 2017.	1
Abb. 2: Stadien in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.	3
Abb. 3: Schematische Darstellung der Mechanismen einer Stressreaktion.....	6
Abb. 4: Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf Leukozytenzahl im Blut.	8
Abb. 5: Auswirkung von akutem psychischem Stress auf Leukozyten-Rekrutierung in Plaques.	9
Abb. 6: Einfluss von sympathischer Denervation auf Leukozyten-Rekrutierung in Plaques.	10
Abb. 7: Leukozyten Rekrutierungskaskade.....	12
Abb. 8: Genexpressionsanalyse.	13
Abb. 9: Hypothetisches Modell der Faktoren der Stresseinwirkung auf Endothelzellen.....	14
Abb. 10: Restraint zur Simulation von akutem psychischen Stress.....	23
Abb. 11: Schematische Darstellung der Stressexposition.	23
Abb. 12: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs nach Denervation.....	25
Abb. 13: Versuchsschema zur Hormoninkubation.	29
Abb. 14: Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung.	31
Abb. 15: Versuchsaufbau der Flusskammer.	32
Abb. 16: Akuter psychischer Stress führt zum Anstieg von Stresshormonen.	36
Abb. 17: Schematische Darstellung der Katecholamin-Biosynthese.	37
Abb. 18: Stress führt zu keiner Tyrosin Hydroxylase-Erhöhung in der Tunica adventitia der Aortenwurzel.	38
Abb. 19: Akuter psychischer Stress erhöht die Proteinexpression der Phospho-Tyrosin Hydroxylase im Aortenbogen.....	39
Abb. 20: Denervation verhindert Anstieg von Noradrenalin im Aortenbogen nach Stressexposition.	40
Abb. 21: Denervation führt zu keiner Reduktion der Tyrosin Hydroxylase in der Tunica adventitia der Aortenwurzel.	41
Abb. 22: Noradrenalin steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.	43
Abb. 23: Adrenalin hat keinen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.	44
Abb. 24: Kortikosteron hat geringen Einfluss auf Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.	45
Abb. 25: Scherstress führt zu verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchstiere	16
Tabelle 2: Tierfutter	16
Tabelle 3: Apparatur zur Stresssimulation	16
Tabelle 4: Medikamente	16
Tabelle 5: Zelllinie.....	17
Tabelle 6: Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	17
Tabelle 7: Lösungen und Puffer	18
Tabelle 8: FACS Antikörper	19
Tabelle 9: Western Blot Antikörper	19
Tabelle 10: Immunhistochemie Antikörper	19
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 12: Geräte.....	20
Tabelle 13: Software.....	21
Tabelle 14: Pipettierschema zur Hormonverdünnung.	30
Tabelle 15: Druckeinstellungen der Flusskammer.	33

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar (World Health Organization, 2017). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben knapp 18 Millionen Menschen allein 2016 in Folge von kardiovaskulären Erkrankungen, was einen Anteil von 30% aller Todesursachen weltweit ausmacht. Kardiovaskuläre Erkrankungen beschreiben eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen durch Veränderung der Gefäßstruktur die Blutversorgung verschiedener Gewebe wie u.a. Herz, Gehirn und Extremitäten nicht mehr suffizient gewährleistet ist. Unter den kardiovaskulären Erkrankungen ist die koronare Herzkrankheit (KHK) die häufigste (Townsend et al., 2016). Sie entsteht durch die klinische Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien (Toth, 2008). Verhärtung, Elastizitätsverlust und Einengung des Lumens der betroffenen Gefäße führen zu Minderperfusion und zu geringem Sauerstoffangebot im Gewebe (Jackson et al., 2018; Singh et al., 2002).

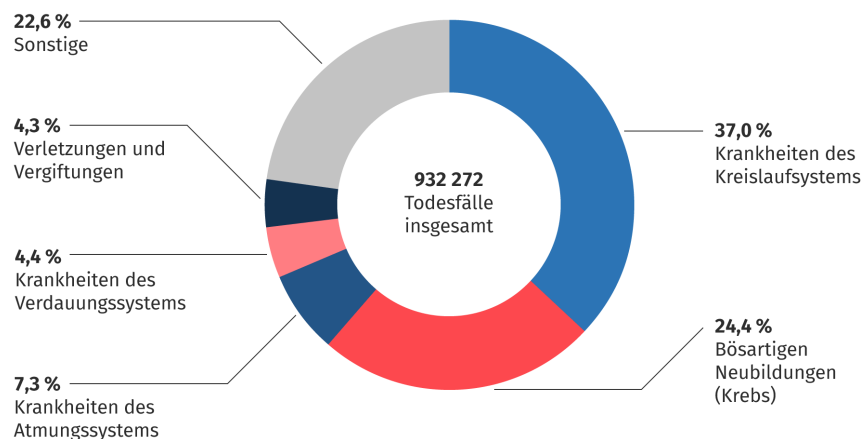


Abb. 1: Todesursache nach Krankheitsarten 2017.

Die Herz-Kreislaufferkrankungen führten 2017 in Deutschland mit einem Anteil von 37% am häufigsten zum Tode (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020b).

Auch in Deutschland sind kardiovaskuläre Erkrankungen die Todesursache Nummer eins. Wie in Abb. 1 zu sehen, ist ihr Anteil mit 37% sogar größer als der tödlicher Krebserkrankungen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020b). Innerhalb dieses Anteils

bildet die chronisch ischämische Herzkrankheit nicht nur den größten Teil, sondern führt auch am häufigsten zum Tode (Finegold et al., 2013; Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020a). Die Lebenszeitprävalenz der KHK liegt in der Altersgruppe 40-79 Jahre bei 9,3% (Gosswald et al., 2013). Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz überproportional an, wobei Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. So liegt in Deutschland die 12-Monats-Prävalenz bei Frauen bei 16% und bei Männern sogar bei bis zu 24% (Busch & Kuhnert, 2017).

Das häufigste Erscheinungsbild der KHK ist das akute Koronarsyndrom (ACS), zu dem die instabile Angina Pectoris und der Myokardinfarkt zählen. In 25% der Fälle ist der plötzliche Herztod die erste Manifestation der KHK (Kirchhof et al., 2006) und selbst nach Überleben eines kardiovaskulären Ereignisses steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines weiteren kardiovaskulären Ereignisses.

Schätzungen zufolge kosten kardiovaskuläre Erkrankungen die europäische Wirtschaft jährlich 210 Milliarden Euro, wobei Deutschland im Staatenvergleich mit 35 Milliarden Euro im oberen Bereich liegt. Diese Zahlen zeigen, dass die globalen Folgen durch kardiovaskuläre Erkrankungen nicht mehr nur ein weltweites Gesundheitsproblem darstellen, sondern auch eine enorme wirtschaftliche Herausforderung für die Gesundheitssysteme bedeuten. Diese wird sich in den kommenden Jahren durch das Bevölkerungswachstum weiter verstärken (Bernick & Davis, 2014; Timmis et al., 2020).

1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Arterienwand besteht aus drei Schichten (Abb. 2a). Die äußerste Schicht, die Tunica adventitia, besteht aus einer Vielzahl an Zelltypen wie Fibroblasten, Mikrogefäßen, Vorläufer- und immunologischen Zellen. Dies ermöglicht eine Verankerung des Gefäßes im umgebenden Gewebe und bietet damit Schutz gegenüber mechanischen Belastungen sowie hormonellen und entzündlichen Prozessen. Über Nerven, die in der Tunica adventitia enden, kann der Sympathikus den Gefäßtonus regulieren (Stenmark et al., 2013). Die mittlere Schicht, die Tunica media, enthält hauptsächlich glatte Gefäßmuskulatur, welche in extrazellulärer Matrix eingebettet ist. Die innerste Schicht, die Tunica intima, schließt das Gefäß zum Lumen hin mit einer einzelligen Endothelschicht ab (Libby et al., 2011).

Lange Zeit wurde angenommen, die Atherosklerose entstehe nur durch passive Lipidaufnahme in die Gefäßwand. Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse hingegen zeigen, dass der Atherosklerose ein chronischer Entzündungsprozess zu Grunde liegt, welcher durch Lipide, *low-density* Lipoproteine (LDL) und Leukozyten angetrieben wird (Swirski &

Nahrendorf, 2013). Pathophysiologisch läuft die Entstehung und Entwicklung in mehreren Stadien ab (Abb. 2).

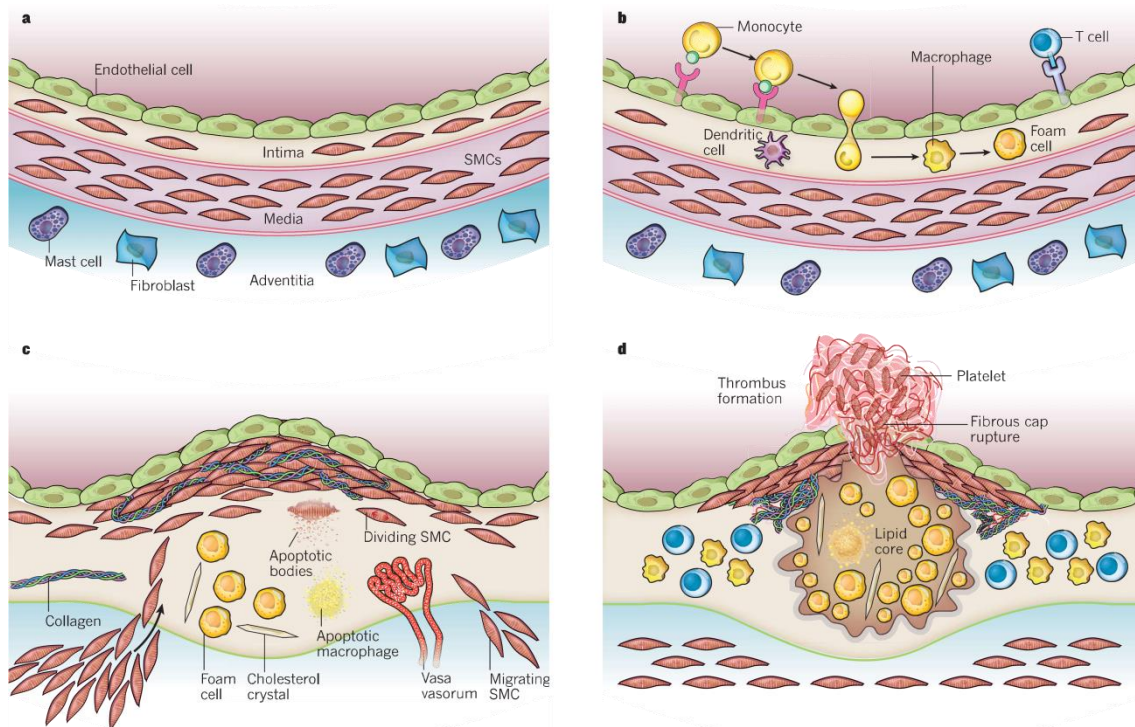


Abb. 2: Stadien in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.

(a) Abbildung eines physiologischen Aufbaus einer Arterienwand. (b) Pathophysiologische Veränderungen bei der Plaque-Initiierung: Andocken und Transmigration von Monozyten in Arealen von Lipidablagerungen (Arealen hier nicht dargestellt), anschließende Differenzierung der Monozyten in Makrophagen. Diese entwickeln sich durch Phagozytose von Lipiden zu Schaumzellen. (c) Einwanderung von glatten Muskelzellen und Produktion von extrazellulärer Matrix. (d) Läsion der Fibrinkappe mit anschließender Thrombose des Gefäßes. Copyright mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (Libby et al., 2011).

Endotheliale Dysfunktion ist eine wissenschaftlich bekannte Reaktion auf kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie zum Beispiel Bluthochdruck oder erhöhte Cholesterinwerte (Hadi et al., 2005) und geht der Entwicklung der Atherosklerose voraus (Ghosh et al., 2017). Begünstigt durch diese Dysfunktion kommt es zum initialen Schritt der Atherosklerose, der Akkumulation von Cholesterin in der Tunica intima, hauptsächlich in Form von LDL. Aufgrund des geringen Durchmessers von LDL-Molekülen von nur 20 nm ist das Endothel dafür permeabel (Albertini et al., 2002; Nielsen, 1996). Aufgenommenes LDL wird anschließend von gewebständigen Zellen oxidiert. Daraus resultierender oxidativer Stress triggert verschiedene entzündliche Prozesse, durch die es unter anderem zur Produktion von Mediatoren kommt, welche Monozyten anlocken (Wu et al., 2017). Das durch Entzündungsprozesse aktivierte Endothel exprimiert Adhäsionsmoleküle, an welche sich Blutmonozyten anheften und in die Tunica

intima migrieren. Sie differenzieren zu Makrophagen und phagozytieren Lipoproteine. Es entstehen sogenannte Schaumzellen (Abb. 2b), der wichtigste Bestandteil sogenannter *fatty streaks*. Mediatoren, die von ihnen und dem aktivierten Endothel abgesondert werden, induzieren in benachbarten glatten Muskelzellen deren Proliferation und die Synthese extrazellulärer Matrix. Diese progressiven strukturellen Veränderungen der Läsion führen zu Entstehung von Plaques (Abb. 2c) (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016). Plaques bestehen im Inneren aus einem nekrotischen Kern, welcher mit Lipiden angereichert ist. Zum Lumen hin wird er von einer Fibrinkappe überdeckt (Libby et al., 2011; Moore & Tabas, 2011). Aus diesen pathophysiologischen Prozessen entstehen Krankheitsbilder wie die chronische KHK oder das ACS. In der chronischen KHK können Plaques bis zu einer Ausdehnung von 70% des Gefäßlumens asymptomatisch bleiben (Nallamothe et al., 2013). Kommt es bei instabilen, vulnerablen Plaques aber zur Ruptur, führt das thrombogene Material zum Verschluss des restlichen Gefäßlumens, der gravierendsten Folge der Atherosklerose (Abb. 2d). Auch ohne Ruptur können oberflächliche Erosionen bereits zur intraluminalen Thrombusbildung und signifikanten klinischen Folgen führen (Ambrose & Singh, 2015).

1.2 Risikofaktoren

Faktoren, die zur Manifestation der KHK bzw. Atherosklerose führen, sogenannte kardiovaskuläre Risikofaktoren, sind zahlreich und vielfältig. Ausgehend von groß angelegten Studien wie der Framingham-Studie und der MONICA Studie der WHO werden verschiedene Faktoren definiert (Nabel & Braunwald, 2012). Je nach Variabilität teilt man die klassischen Risikofaktoren in zwei Gruppen ein, die im Folgenden beschrieben werden. Neben diesen gibt es noch zahlreiche weitere Risikofaktoren, welche stark mit der KHK assoziiert sind, jedoch noch nicht als Standard definiert wurden.

1.2.1 Nicht-modifizierbare Risikofaktoren

Weder beeinflussbar noch veränderbar sind neben der genetischen Disposition Alter und Geschlecht. Männer über 45 Jahre und Frauen über 55 Jahre bzw. in der Menopause, haben ein stark erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil. Dazu kommt bei frühem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Familienmitgliedern eine positive Familienanamnese als Risikofaktor (Francula-Zaninovic & Nola, 2018).

1.2.2 Modifizierbare Risikofaktoren

Modifizierbare Risikofaktoren und damit wichtig für Therapie und Präventionsansätze sind Nikotinabusus, Mangel an physischer Aktivität (Frodermann et al., 2019), erhöhte Blutdruck- und Cholesterinblutwerte, Diabetes mellitus, ungesunde Ernährung, Adipositas, ungenügend Schlaf (McAlpine et al., 2019) und Stress (Hajar, 2017). Psychosozialer Stress steht mit einer Odds Ratio von 2,67 an dritter Stelle der Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt und damit noch vor den klassischen Risikofaktoren Bluthochdruck und Diabetes (Yusuf et al., 2004). Wie diese Risikofaktoren mechanistisch zur Entstehung der KHK beitragen ist noch nicht ausreichend geklärt. Sicher ist jedoch, dass sie sowohl systemische Prozesse wie Hämatopoese als auch angeborene Immunität und Leukozytenproduktion sowie –phänotyp beeinflussen und damit negative Auswirkungen auf den Verlauf der KHK haben (Schloss et al., 2020). In der Literatur werden Bezeichnung wie mentaler, psychosozialer oder psychischer Stress synonym verwendet. Um Missverständnissen vorzubeugen, wird im Laufe dieser Arbeit nur noch vom psychischen Stress gesprochen.

Basierend auf der Expositionsdauer gegenüber den Stressoren, kann psychischer Stress in zwei Gruppen, nämlich akuten und chronischen Stress, eingeteilt werden. Die zeitliche Grenze ist dabei nicht scharf definiert. Oft geht man bei akutem Stress von einer Expositionsdauer von <1 Woche aus. Studien zu chronischem Stress behandeln dagegen langanhaltende Expositionen (Dimsdale, 2008). Akute psychische Stressoren umfassen plötzlich auftretende emotionale Zustände wie Wut oder starke emotionale Erregung (von Kanel, 2015). Zu den chronischen psychischen Stressoren zählen zum Beispiel Depression, Arbeitsstress, soziale Isolation, finanzielle Belastungen und unglückliche Beziehungen. So kann chronischer Stress im Privat- oder Berufsleben das Risiko des Auftretens der KHK um 40-50% steigern (Steptoe & Kivimaki, 2012). Außerdem kann durch chronischen Stress ein ACS oder der plötzliche Herztod provoziert werden (Burg & Soufer, 2014; Vaccarino et al., 2018).

Während chronischer Stress das Risiko einer KHK erhöht und die Prognose langfristig verschlechtert, kann akuter psychischer Stress in gefährdeten Patienten unmittelbar ein ACS triggern (Wirtz & von Kanel, 2017). Akuter Stress ist sogar häufiger mit dem Auftreten eines ACS assoziiert als chronischer Stress (Steptoe & Kivimaki, 2012).

1.3 Akuter psychischer Stress und Atherosklerose

Physiologische Reaktionen auf akuten Stress entstehen durch Aktivierung unterschiedlicher Mechanismen, hauptsächlich aber über zwei grundlegende Signalwege (Abb. 3): Der erste Signalweg verläuft über die Nebenniere, die durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA) und durch das autonome Nervensystem mit der Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (SAM) aktiviert wird. Der zweite Signalweg läuft über das sympathische Nervensystem (SNS), welches über sympathische Fasern postganglionäre Neurone aktiviert, deren Nervenendigungen in die Organe projizieren (Kivimaki & Steptoe, 2018).

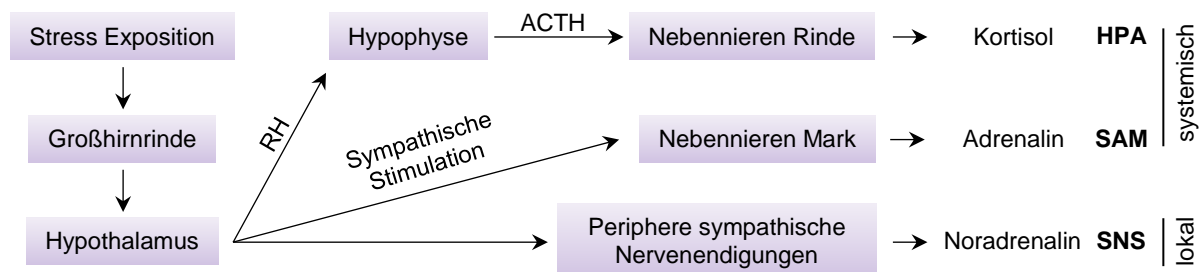


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mechanismen einer Stressreaktion.

Stress aktiviert zwei grundlegende Mechanismen, von denen der eine über die Nebenniere zur systemischen und der andere über Nervenfasern zu lokaler Hormonfreisetzung führt. Systemische Freisetzung von Kortisol durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und von Adrenalin durch die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse; oben abgebildet. Lokale Freisetzung von Noradrenalin durch das SNS (sympathische Nervensystem); unten abgebildet. Kortisol und Adrenalin zirkulieren im Blutkreislauf und gelangen so zum Effektororgan, während Noradrenalin direkt über das SNS lokal am Organ freigesetzt wird. RH (Releasing Hormon), ACTH (Adrenocorticotropes Hormon). Abbildung modifiziert nach Steptoe & Kivimaki, 2012.

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse reguliert die systemische Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde. Stress aktiviert dabei im Hypothalamus die Freisetzung von Corticotropin-Releasing Hormon (RH), welches am Hypophysenvorderlappen zur Freisetzung von Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) führt. Dieses wiederum stimuliert die Nebennierenrinde zur Produktion vom Kortisol (Chu et al., 2020). Ebenfalls systemisch agiert die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse, welche maßgeblich für die Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark verantwortlich ist, dessen Zellen über sympathische Stimulation aktiviert werden. Durch Aktivierung des SNS kommt es zur lokalen Freisetzung von Noradrenalin aus Nervenendigungen. Diese terminieren in jeweiligen Endorganen, wie unter anderem an den Gefäßen (Reimann et al., 2017).

1.3.1 Verminderung von Leukozyten in Blut

Stress beeinflusst das Immunsystem und kann sowohl die humorale als auch zelluläre immunologische Antwort dysregulieren (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). Leukozyten stellen dabei einen wesentlichen Teil des zellulären Immunsystems dar. Zu ihnen zählen u.a. Monozyten und neutrophile Granulozyten. Monozyten spielen im angeborenen Immunsystem die wichtigste Rolle und teilen sich in verschiedene Subgruppen auf. In der ersten Entzündungsphase ist die Gruppe der klassischen Monozyten entscheidend, welche im Menschen das Oberflächenmolekül CD14⁺ exprimieren. Das murine Korrelat zu ihnen sind die Ly6c^{high} Monozyten (Narasimhan et al., 2019). Sie sind hauptsächlich an der Progression der Atherosklerose beteiligt. Ly6c^{high} Monozyten adhärieren am aktivierten Endothel, reichern sich in atherosklerotischen Plaques an und differenzieren zu Makrophagen (Swirski et al., 2007). Im Gewebe aufgenommen produzieren sie proinflammatorische Zytokine und werden deshalb auch inflammatorische Monozyten genannt (Dutta & Nahrendorf, 2015). Somit ist es besonders interessant, diese im Zusammenhang mit Stress zu untersuchen.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es nach akuter Stressexposition zu einer signifikanten Erniedrigung sowohl der totalen Leukozytenzahl als auch der Ly6c^{high} Monozyten im Blut kommt (Abb. 4). Diese Erkenntnisse beruhen auf der Annahme, dass das verwendete Stressmodell vergleichbare Effekte wie im Menschen bedingt, nämlich eine Stresshormon-Erhöhung über Aktivierung der oben genannten Signalwege (HPA, SAM, SNS). Es blieb allerdings bisher unklar, ob der erzeugte akute Stress tatsächlich Einfluss auf die systemischen und lokalen Hormonspiegel nimmt und so die beobachtete Leukozytenreduktion erklärt.

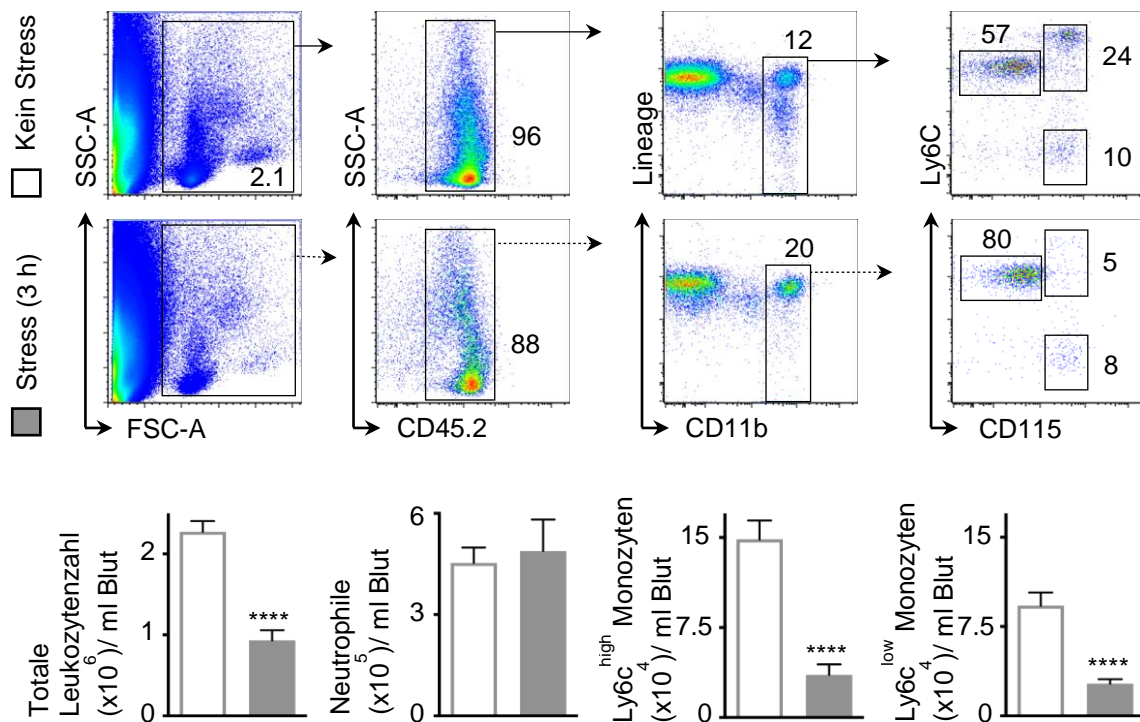


Abb. 4: Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf Leukozytenzahl im Blut.

Stress verringert sowohl die totale Leukozytenzahl, als auch einige Subgruppen im Blut. Exemplarische Durchflusszytometrie-Plots der sukzessiven Auftrennung der Leukozyten in drei Subgruppen anhand von Oberflächenmarkern. Gating und Quantifizierung von Blutleukozyten in nicht-gestressten (oben) und gestressten (unten) ApoE^{-/-} Mäusen (einmalige Stressexposition von 3 h). Abbildung modifiziert nach Hinterdobler et al., 2021.

1.3.2 Rekrutierung von Leukozyten in atherosklerotische Plaques

Das schnelle Verschwinden der Leukozyten aus dem Blut unter Stress lässt sich durch deren Aufnahme in bestimmte Gewebe erklären. Daher liegt die Vermutung nahe, dass unter Stress auch vermehrt Leukozyten in Plaques aufgenommen werden, was sich in weiteren Experimenten bestätigte. Abb. 5 zeigt eine vermehrte Aufnahme, sowohl von neutrophilen Granulozyten als auch Makrophagen und Ly6C^{high} Monozyten, in die Aortenwand von gestressten Mäusen.

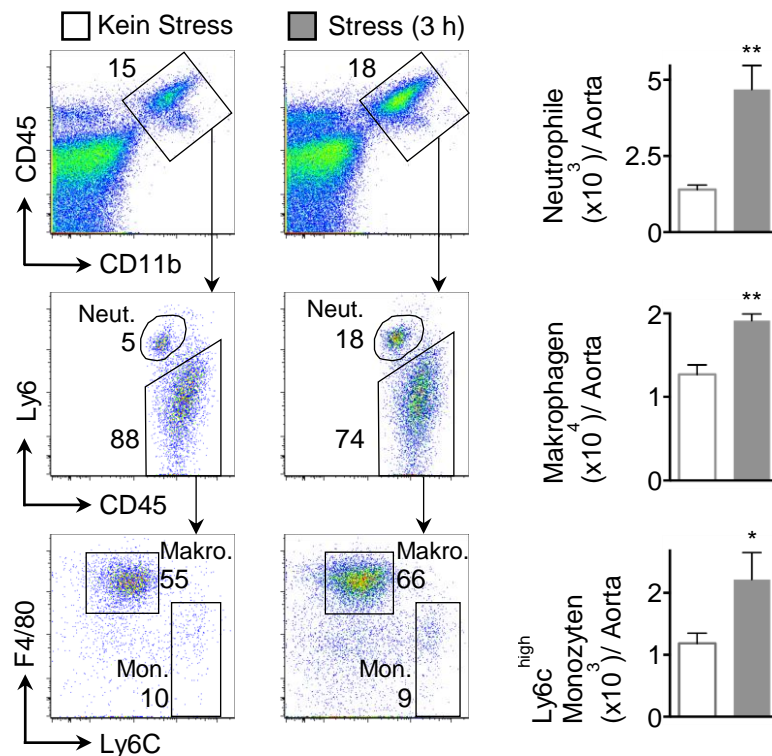


Abb. 5: Auswirkung von akutem psychischem Stress auf Leukozyten-Rekrutierung in Plaques.

Stress führt zu einer rapiden Vermehrung von unterschiedlichen Leukozyten in Plaques. Neut. (neutrophile Granulozyten); Makro. (Makrophagen); Mon. (Ly6c-high Monozyten). Gating und Quantifizierung von Plaqueleukozyten in nicht-gestressten und gestressten (einmalige Stressexposition von 3 h) ApoE^{-/-} Mäusen. Abbildung modifiziert nach Hinterdobler et al., 2021.

Diese Daten (Abb. 4 und Abb. 5) zeigen, dass sich akuter psychischer Stress auf Blutleukozyten und atherosklerotische Plaques auswirkt: Durch Aktivierung der Rekrutierungskaskade kommt es zu einer schnellen Akkumulation der entzündlichen Leukozyten in den Plaques. Charakteristikum instabiler, sogenannter vulnerable Plaques, ist neben einem großen nekrotischen Kern, überdeckt mit einer dünnen Fibrinkappe, ein hoher Gehalt an entzündlichen Zellen (Silvestre-Roig et al., 2014). In Mäusen kennzeichnen sich diese durch Ly6^{high} Monozyten aus, welche in Plaques zu M1-Makrophagen differenzieren und so die Instabilität vorantreiben (Meeuwssen et al., 2019). Tatsächlich konnte unser Labor mittels eines Mausmodells zur Simulation von Plaquerupturen zeigen, dass akuter Stress die tatsächliche Rupturrate erhöht (Hinterdobler et al., 2021).

Weitere Experimente wurden in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, um genauere Hinweise auf den Wirkmechanismus von Stress zu erhalten. Ein Experiment zur Unterdrückung der sympathischen Innervation des Aortenbogens unterstützt die Annahme, dass Stress über lokale Ausschüttung von Noradrenalin direkt auf das Endothel wirkt (Abb. 6). Es zeigte sich, dass durch Unterdrückung der sympathischen Innervation des Aortenbogens die Aufnahme

von Leukozyten in die Plaques nach Stressexposition deutlich erniedrigt ist. In diesem Versuch wurde die sympathische Innervation chirurgisch durchtrennt und kurz vor Stressexposition mit Green Fluoreszenz Protein (GFP⁺) markierte Monozyten und neutrophile Granulozyten den Versuchstieren intravenös appliziert. Das GFP Signal ermöglicht es, injizierte Zellen einfacher zu identifizieren und nachzuverfolgen. Die Anzahl der GFP⁺ Zellen im Plaque kann mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

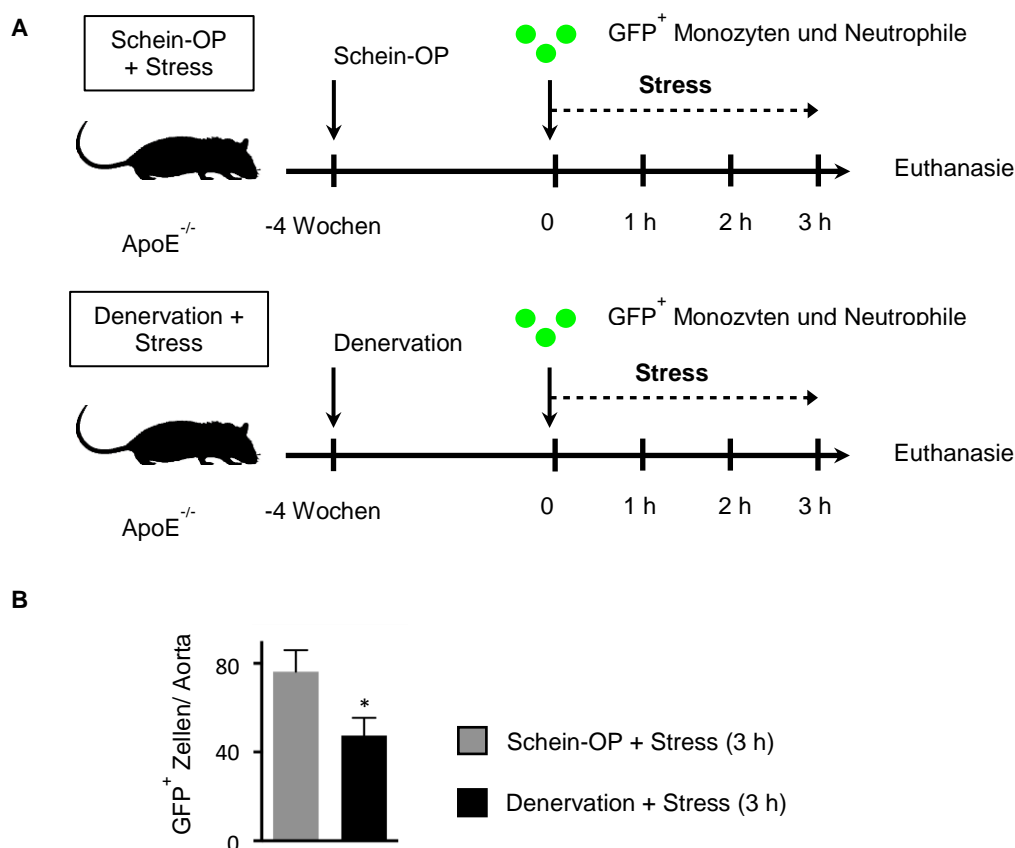


Abb. 6: Einfluss von sympathischer Denervation auf Leukozyten-Rekrutierung in Plaques.

Sympathische Denervation führt zu verringerter Leukozyten-Aufnahme in Plaques nach Stressexposition. **(A)** Zeitleiste des GFP⁺ Versuchablaufs. **(B)** Es zeigt sich eine signifikant erniedrigte GFP⁺ Zellzahl in der Aortenwand der denervierten Mäuse. Quantifizierung der rekrutierten Zellen mittels Durchflusszytometrie in scheinoperierten und denervierten gestressten (einmalige Stressexposition von 3 h) ApoE^{-/-} Mäusen. Abbildung modifiziert nach Hinterdobler et al., 2021.

Da eine verminderte Aufnahme der GFP⁺ Leukozyten in die Plaques beobachtet wurde, impliziert dieses Experiment, dass Noradrenalin einen entscheidenden Einfluss auf die Rekrutierung von Leukozyten unter akutem Stress hat. Allerdings bleibt weiterhin ungeklärt,

ob chirurgische Denervation die Noradrenalin-Synthese gezielt im Aortenbogen unterbindet oder auch systemische Hormonschwankungen bedingt.

1.3.3 Endothelzellen

Grundsätzlich ist die Transmigration zirkulierender Leukozyten durch die Gefäßwand ein komplexer Vorgang. Er ist abhängig von der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen und kann grob in die drei Schritte des „Rollens“, des „Anhaftens“ und der „Transmigration“ unterteilt werden (Ley et al., 2007). Dabei spielt neben den Chemokinen vor allem die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche durch inflammatorische Mediatoren eine wesentliche Rolle (Abb. 7). Adhäsionsmoleküle stellen die molekulare Basis sowohl zur Erkennung der Endothelzellen durch Leukozyten als auch des Abfangens der Leukozyten aus dem Blutstrom und Andocken am Endothel dar (Vestweber, 2015). E-Selektin und P-Selektin werden von aktivierten Endothelzellen exprimiert und vermitteln ein transientes Rollen entlang der Gefäßwand. Durch dieses Selektin-vermittelte Rollen exprimieren Leukozyten Integrine (McEver, 2015). Die Integrine wiederum binden an Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, wie interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und ICAM-2) und vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1) (van Buul et al., 2007). Diese Interaktion bewirkt das feste Anhaften und ermöglicht es Leukozyten entlang der luminalen Gefäßwand bis zu geeigneten Austrittsstellen zu gelangen. Diese sind normalerweise endotheliale Zellkontakte, welche sich durch Triggermechanismen kurzzeitig öffnen (Vestweber, 2015).

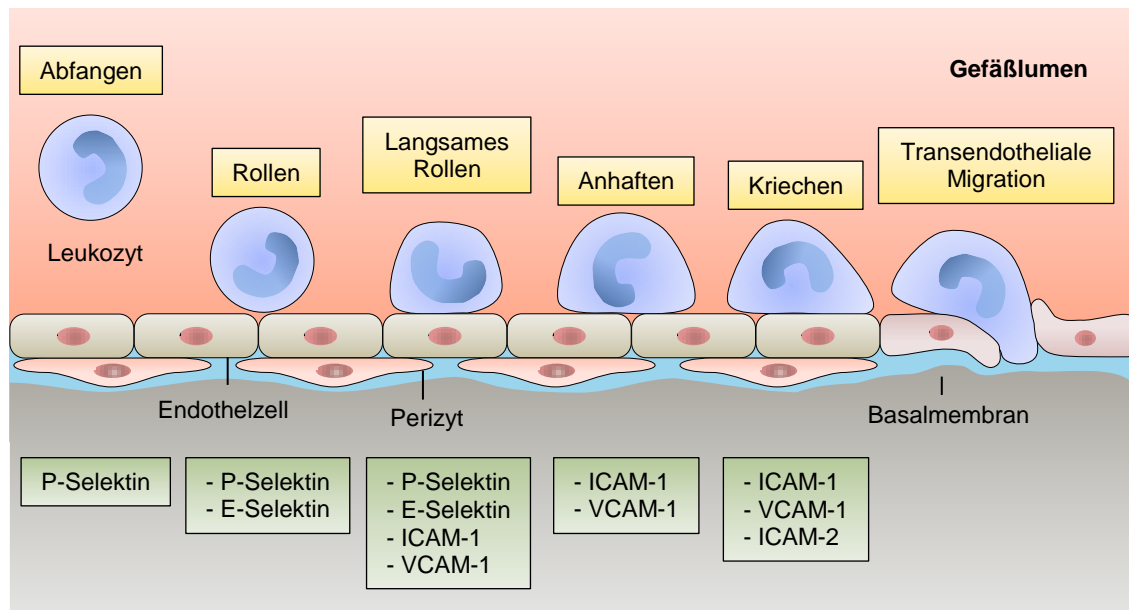


Abb. 7: Leukozyten Rekrutierungskaskade.

Adhäsionsmoleküle (P- & E-Selektin) vermitteln die Anheftung und das Rollen von Leukozyten am Gefäßlumen. Durch Interaktion mit Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie (ICAM-1, ICAM-2 & VCAM-2) kommt es zur Verlangsamung und festen Haftung. Dies bildet die Voraussetzung der eigentlichen Transmigration. Copyright mit freundlicher Genehmigung von Nature Reviews Immunology. Abbildung modifiziert nach Vestweber, 2015.

Der Mechanismus, der im chronischen Stress der Entstehung vulnerabler Plaques zu Grunde liegt, konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden. Stressexposition über einen langen Zeitraum hinweg, führt mittels Aktivierung des sympathischen Nervensystems zur gesteigerten Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und so zu einer größeren Anzahl an inflammatorischen Leukozyten im Blutkreislauf, welche die Plaque-Inflammation fördern (Heidt et al., 2014). Dem akuten Stress hingegen muss aber ein anderer Prozess zu Grunde liegen, da es im Gegensatz zum chronischen Stress bereits innerhalb weniger Stunden zu drastischen Veränderungen kommt und sich das Risiko eines ACS in den ersten beiden Stunden nach Stressbeginn um mindestens das Doppelte erhöht (von Kanel, 2015). Eine Erklärung, wie es zu einer derart rapiden Destabilisierung der Atherosklerose kommt, fehlt bislang. Das Phänomen, dass durch Stress die Aufnahme von Leukozyten in Plaques verstärkt wird, kann grundsätzlich auf die Mechanismen zurückzuführen sein, dass Stress entweder den Phänotyp der Endothelzellen, den der Leukozyten oder beide parallel beeinflusst. Die Annahme, dass vorrangig die Endothelzellen Veränderungen unterliegen, stützen die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse (Abb. 8). Es zeigte sich, dass Stress Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene nimmt. Von 15.054 Genen wurden 533 differenziell exprimiert. Von diesen differenziell exprimierten Genen waren 335 (63%) hoch- und 198 (37%) runterreguliert (Hinterdobler et al., 2021).

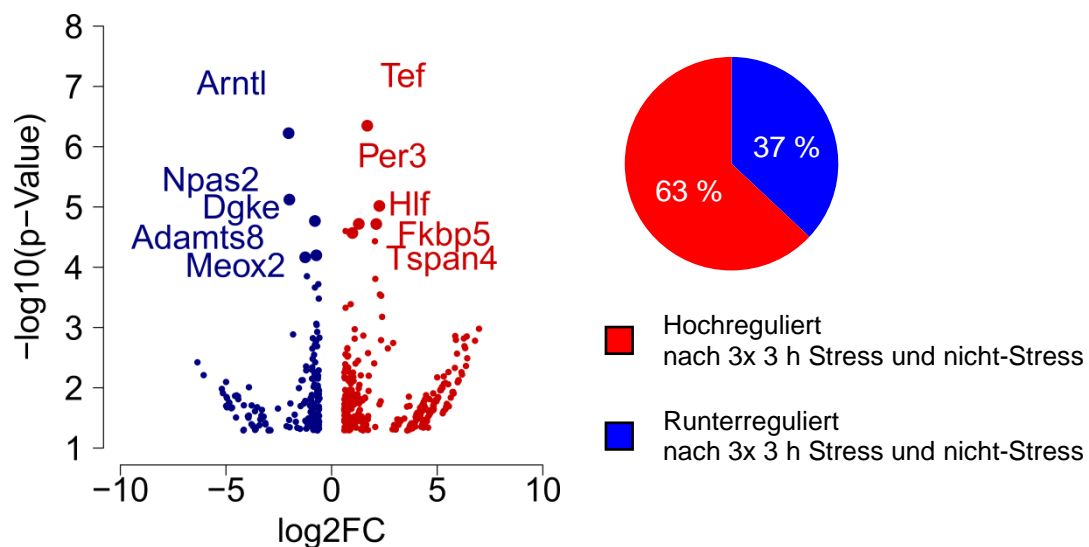


Abb. 8: Genexpressionsanalyse.

Darstellung der differentiell exprimierten Gene nach RNA-Sequenzierung von FACS-isolierten Endothelzellen der Aorta von nicht-gestressten und gestressten (nach 3 Episoden von 3 h Stress, einmal täglich) Mäusen. Abbildung modifiziert nach Hinterdobler et al., 2021.

Eine genauere Analyse der hochregulierten Gene ergab, dass diese vornehmlich in Signalwegen von Zell „Bewegung“, „Fortbewegung“, „Adhäsion“, „Lokalisation“, „Beweglichkeit“ und „Migration“ beteiligt sind (Hinterdobler et al., 2021). Dies schließt zwar die Anpassung von Leukozyten nicht aus, aber unterstreicht den Einfluss von Stress auf den Endothelzell-Phänotyp. Deshalb ist in dieser Arbeit der Fokus auf die Reaktion des Endothels gelegt.

Es gibt mehrere mögliche Einflussfaktoren auf Endothelzellen, die die oben genannten phänotypischen Veränderungen unter akuter Stressexposition auslösen können (Abb. 9). Durch Stress erhöhte Hormone können direkten Einfluss auf das Endothel haben, aber auch indirekt, da sie im Kontext der Kampf-oder-Flucht-Reaktion u.a. den Blutdruck steigern und so zu verstärkten Scherstress auf das Endothel und Gefäßwand führen. Noradrenalin kann als lokaler Stimulus aus der Gefäßwand wirken, Adrenalin und Kortison hingegen systemisch aus dem Blutstrom das Endothel aktivieren. Ob diese Konditionen zu vergleichbaren oder unterschiedlichen phänotypischen Veränderungen des Endothels führen ist u.a. Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

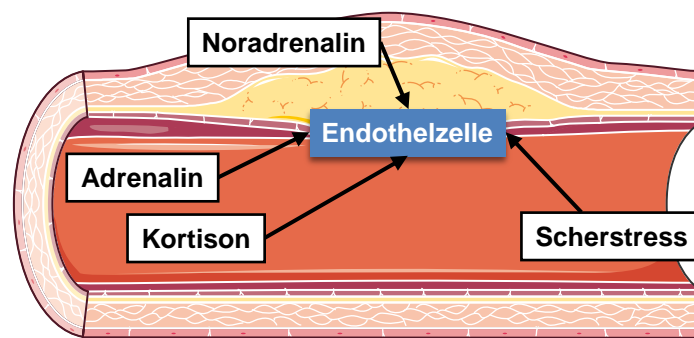


Abb. 9: Hypothetisches Modell der Faktoren der Stresseinwirkung auf Endothelzellen. Noradrenalin könnte die Endothelzellen direkt durch Freisetzung aus lokalen Nervenendigungen in der Tunica adventitia beeinflussen. Adrenalin und Kortison agieren als systemisch zirkulierende Hormone. Durch erhöhten Blutdruck und reaktiver erhöhter Wandspannung könnte Scherstress Auswirkungen auf das Endothel haben.

1.4 Zielsetzung

Die koronare Herzkrankheit entsteht durch eine Atherosklerose der Herzkranzgefäße. Getriggert durch akuten psychischen Stress können atherosklerotische Plaques instabil werden (Sager & Nahrendorf, 2016) und so zu schweren oder gar tödlichen Folgen führen. Pathophysiologische Grundlage dieser Verschlechterung ist unter anderem eine verstärkte Leukozyten-Akkumulation in Plaques (Silvestre-Roig et al., 2014). Die Migration der Leukozyten in die Gefäßwand setzt eine enge Interaktion von Leukozyten und Endothel voraus.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es daher, die pathophysiologischen Mechanismen einer verstärkten Aufnahme von Leukozyten in Plaques zu analysieren. Der Fokus liegt dabei sowohl auf der hormonellen Stressantwort des Körpers als auch auf der Betrachtung des Endothels und dessen phänotypischen Veränderungen unter akutem psychischen Stress.

Es ergeben sich folgende Zielsetzungen:

1) Hormonelle Reaktion auf akuten psychischen Stress:

Ein experimentelles Stressmodell im Tier ist immer ein arbiträrer Ansatz der Stress-Simulation und kann die komplexe humane Stressreaktion nicht gänzlich abbilden. Pathophysiologisch basieren jedoch beide Reaktionen auf denselben Signalwegen (SAM, SNS, HPA). Es soll untersucht werden, ob unser verwendetes Stressmodell dieselben Signalwege aktiviert wie im Menschen.

2) Auswirkung der sympathischen Denervation:

Sympathische Denervation führte in anderen Experimenten bereits zu erniedrigter Aufnahme von Leukozyten in Plaques. Dies erklärt man sich mit einer durch die Denervation lokal unterbundenen Noradrenalin-Synthese. Es bedarf allerdings noch der methodischen Bestätigung, dass eine chirurgische Durchtrennung der sympathischen Innervation tatsächlich zu einem lokalen Abfall des Noradrenalin-Spiegels im Aortenbogen führt.

3) Phänotypische Veränderungen kultivierter Endothelzellen durch Stress:

In vitro werden Endothelzellen durch Hormoninkubation und Scherspannung Stress ausgesetzt. Hierdurch soll die Modulation der Oberflächenmoleküle von Endothelzellen untersucht und dargestellt werden.

2 Material

2.1 Tierexperimente

Tabelle 1: Versuchstiere

Versuchsmodell	Stamm	Lieferant
ApoE ^{-/-} (Atherosklerosemodell)	B6.129P2-Apoetm1nc/J	Zucht des Herzzentrums
Wildtyp	C57BL/6J	Charles River Laboratory

Tabelle 2: Tierfutter

Futter	Zusammensetzung	Firma / Bestellnummer
Haltungsdiät	11 % Fett	Altromin / 1328
Hoch-cholesterinhaltige Diät (HCD)	21,2 % Fett 0,2 % Cholesterin	Envigo / TD.88137
Zuchtdiät	14 % Fett	Altromin / 1318

Tabelle 3: Apparatur zur Stresssimulation

Stressexposition	Hersteller	Bestellnummer
Restrainer	Kent Scientific	HLD-MM

Tabelle 4: Medikamente

Narkotika	Applikationsform	Dosis
Fentanyl	intraperitoneal	0,05 mg/kg Körpergewicht
Medetomidine	intraperitoneal	0,5 mg/kg Körpergewicht
Midazolam	intraperitoneal	5,0 mg/kg Körpergewicht
Anästhetika		
Buprenorphin	subkutan	100 µl
Antagonisten		
Atipamezol	subkutan	3,75 mg/kg Körpergewicht
Flumazenil	subkutan	0,72 mg/kg Körpergewicht
Naloxon	subkutan	1,7 mg/kg Körpergewicht

2.2 Zelllinie

Tabelle 5: Zelllinie

Zelllinie	Hersteller	Katalognummer
Endothelzellen der Mauseorta (mAoECs)	Cell Biologics, Chicago, USA	C57-6052

2.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 6: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Name	Hersteller	Katalognummer
-(-)Epinephrine	Sigma-Aldrich	E4250-1G
-(-)Norepinephrine	Sigma-Aldrich	A7257-1G
4x Laemmli Sample Buffer	Bio Rad	161-0747
Accutase® solution	Sigma-Aldrich	A6964
Aceton	Carl Roth	9372.5
Adrenalin High Sensitive ELISA	DLD Diagnostika GmbH	EA632/96
Bovin serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153-500G
Corticosteron ELISA Kit	Abcam	ab108821
Corticosterone	Sigma-Aldrich	27840-100MG
DMSO	Carl Roth	A994.1
Endothelial Cell Medium	PELO Biotech	PB-M1168
Gelatin-Based Coating Solution	PELO Biotech GmbH	PB-6950
Gibco™ PBS, pH 7.4 (10x)	Fisher Scientific	11593377
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific	78420
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific	78429
Noradrenalin sensitive ELISA	DLD Diagnostika GmbH,	EA633/96
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
Proteinmarker	New England Biolabs® GmbH	P7712
RIPA Buffer (10x)	Cell Signaling Technology	9806S
ROTI® Mount FluorCare DAPI	Carl Roth	HP20.1
Salzsäure (2N)	Carl Roth	T134.1
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34096
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Hartenstein	TTek

Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich	BCBV9580
Tween™ 20	PanReac AppliChem	A4974,0500
Ultra Pure™ Distilled Water	Invitrogen	10977035

2.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
0,5 M HCL	50 ml 2 M HCL 150 ml dH2O
1x PBS	50 ml PBS 450 ml Millipore Wasser Lagerung bei Raumtemperatur
1x PBS-T	1x PBS 0,04 % Tween
1x RIPA-Puffer	10 ml 10xRIPA 100 ml destilliertes H ₂ O
5 % BSA	2,5 g BSA 50 ml PBS
Blocking solution	1x PBS 5 % Ziegenserum
FACS Puffer	500 ml 1x PBS 2,5 g BSA Lagerung auf 4 °C
Stabilisierungspuffer für Katecholamine	250 ml dH2O 1,25 ml 2 M HCL 75 µl 0,5 M EDTA 190 mg Natriummetabisulfit Mit Extraktionspuffer des Kits auf pH ≥ 7,0 titriert
TBS-T	5% BSA 20 mM Tris 150 mM NaCL 0.1 % Tween pH 7.6

2.5 Antikörper

Tabelle 8: FACS Antikörper

Primär Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Seriennummer (Klon)
CD102-biotin (ICAM-2)	1:600	Bio Legend	105604 (3C4)
CD106-PE/Cy7 (VCAM-1)	1:300	Bio Legend	105720 (429)
CD107a (LAMP-1)	1:300	Bio Legend	102424 (390)
CD31-BV421	1:600	Bio Legend	102423 (390)
CD54-APC (ICAM-1)	1:600	Bio Legend	116120 (YN1/1.7.4)
CD62E-PE (E-Selectin)	1:300	BD Bioscience	553751 (10E9.6)
CD62P-FITC (P-Selectin)	1:300	BD Bioscience	553744 (RB40.34)
Sekundär Antikörper			
Streptavidin-BV605	1:600	Bio Legend	405234

Tabelle 9: Western Blot Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer	Spezies
GAPDH	1:50.000	Cell Signaling	5174 P	Kaninchen
pTH	1:500	Merck Millipore	Ab5935	Kaninchen
Sekundärantikörper				
Anti-Rabbit IgG, HRP linked Antibody	1:100.000	Cell Signaling	7074S	Ziege

Tabelle 10: Immunhistochemie Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer	Spezies
Anti-Tyrosin Hydroxylase	1:200	Abcam	ab112	Kaninchen
Sekundärantikörper				
Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 594	1:500	Abcam	Ab150080	Ziege

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Katalognr.	Hersteller
µ-Slide I Luer, channel height 0,2 mm	80166	Ibidi
µ-Slide I Luer, channel height 0,8 mm	80196	Ibidi
4-20% Mini-PROTEAN Protein Gels	4568094	Bio Rad
Cryomold® Einbettschälchen	CMM	Hartenstein
Falcon™ Mikrotiterplatte Corning® 24-Well	FALC353047	Omnilab
Microvette 100 K3E	201278	Sarstedt
PAP pen for immunostaining	Z377821	Sigma-Aldrich
Perfusions Set Yellow/Green	10964	Ibidi
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	0030 120.066	Eppendorf
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	0300 123.344	Eppendorf
Trans-Blot® Turbo™ Midi Transfer Packs	1704157	Bio Rad
Zentrifugenröhrchen (50 ml Falcon)	227261	Hartenstein

2.7 Geräte

Tabelle 12: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analytische Waage	Mettler AE 260	Delta Range®
Biomolekulares Aufnahmegerät	ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare
Disrupter	TH220	Omni International
Elektrophorese-Kammer	Mini Protean® Tetra Cell	Bio Rad
FACS	LSR Fortessa	BD Bioscience
Fluoreszenz Mikroskop	DMRB	Leica
Flusskammer	Pump System	Ibidi
Immunfluoreszenz Kamera	DFC450 C	Leica
Inkubator	Heraeus BB15	Thermo Scientific
Kryostat	CM1850	Leica
Mikroplatten-Lesegerät	Infinite® M200 PRO	Tecan Group
Mikroskop	Axiovert 100	Zeiss
Mikroskop Kamera	AxioCam HRc	Zeiss

Mikrotiterschüttler	MTS 4	IKA®
Millipore Wasser System	Milli-Q® Reference	Merck Millipore
Plattenzentrifuge	Centrifuge 5430	Eppendorf
Roller Mixer	SRT9D	Stuart
Schüttelgerät – wippend	Duomax 1030	Heidolph
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Transfer System	Trans-Blot® Turbo™	Bio Rad
Ultraschallbad	USR 9	Merck Eurolab GmbH
Wärmeplatte	HT 200 W	Minitüb GmbH
Weichgewebsspitzen	32750	Omni International
Zählkammer	Neubauer improved	Brand®
Zentrifuge (24x 1.5/2.0 ml)	5424 R	Eppendorf
Zentrifuge (4x 400 ml)	Megafuge 16R	Heraeus

2.8 Software

Tabelle 13: Software

Software	Hersteller
FlowJo™ 8.8.7.	BD Company
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc.
ImageJ 1.52 q	Wayne Rasband
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare

3 Methoden

3.1 Tierstämme

Es wurden zwei verschiedene Maus-*Strains* verwendet. Zum einen der C57BL/6J Wildtyp, bezogen aus den Charles River Laboratories und zum anderen Apolipoprotein E Knockout (ApoE^{-/-}) Tiere aus der Zucht des Deutschen Herzzentrums, ursprünglich bezogen von Jackson Laboratories. Alle Versuche wurden von den örtlichen Behörden (Regierung von Oberbayern; AZ: 55.1-2-1-55-25-32-244-2015) genehmigt. Unter normalen Umständen entwickeln Wildtypmäuse keine Atherosklerose. Daher ist die ApoE^{-/-} Mauslinie ein häufiges Modell in der Atheroskleroseforschung. Bei dieser Linie handelt es sich um Tiere, denen das ApoE Gen fehlt. ApoE hat normalerweise die Funktion Fette zu transportieren und zu verstoffwechseln. Fehlt ApoE, kommt es zur Hyperlipidämie und Akkumulation von Cholesterin in der Gefäßwand. Besonders unter cholesterinreicher Diät (HCD) kommt es schnell zur Verkleinerung des Gefäßlumens sowie geringerer Elastizität und Atherosklerose (Li et al., 2016).

3.1.1 Tierhaltung

Die ApoE^{-/-} Versuchstiere wurden ab einem Alter von 8-12 Wochen für einen Zeitraum von 8 Wochen auf HCD gesetzt. In einem Käfig wurden 2-4 Mäuse eines Wurfs und gleichen Geschlechts gehalten und wöchentlich gewogen. Für jedes Experiment wurde pro Gruppe auf gleiche Geschlechterverteilung und Alter der Mäuse geachtet und diese zufällig auf Kontroll- oder Versuchsgruppe verteilt.

3.1.2 Stressprozedur

Akuter psychischer Stress wurde durch Einsperren der Mäuse auf engem Raum erzeugt. Die Fixierung in Restrainern (Abb. 10) wurde für jeweils 3 h an 3 aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Dabei wurde halbstündlich kontrolliert, dass die Tiere frei atmen konnten und weder gequetscht noch zusammengedrückt wurden.

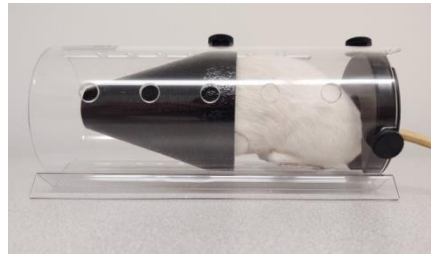


Abb. 10: Restrainer zur Simulation von akutem psychischen Stress.

Copyright mit freundlicher Genehmigung von Kent Scientific Corporation.

Die Tiere der Versuchsgruppe wurden nach Fixation in den Restrainern zurück in ihren ursprünglichen Käfig gesetzt, während die Tiere der Kontrollgruppe in deren Käfigen verblieben ohne Sicht auf die Stressgruppe. Direkt nach Ende der letzten Stressprozedur erfolgte die Euthanasie (Abb. 11).

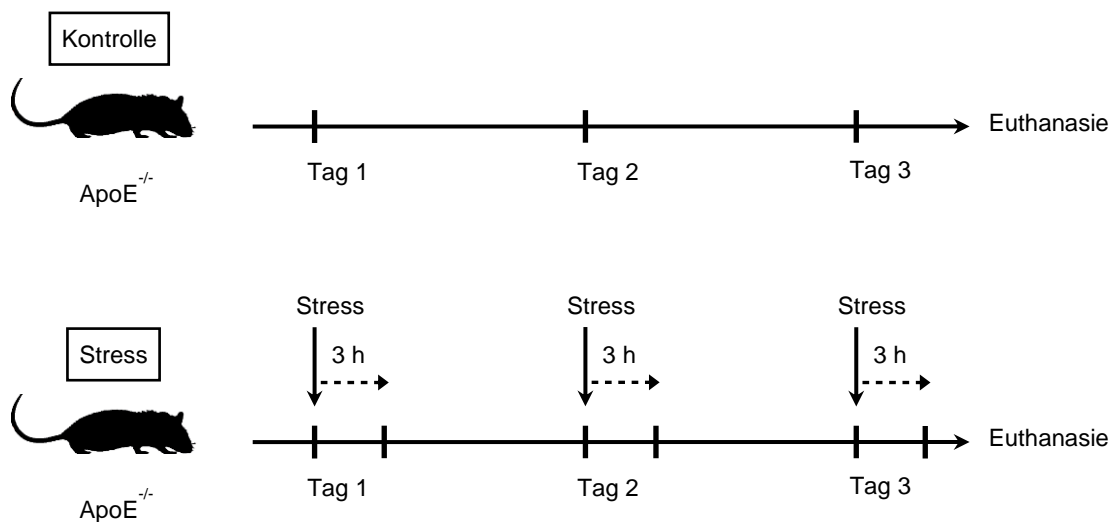


Abb. 11: Schematische Darstellung der Stressexposition.

Einen Tag vor Versuchsstart wurden die Käfige aus dem Tierstall gemeinsam in einen ventilierten Schrank des Labors platziert. Es folgten 3 Stressexpositionen von je 3 h, einmal täglich. Direkt nach der letzten Exposition wurden die Tiere euthanasiert und Blut und Gewebe analysiert.

3.1.3 Organentnahme

Blut und Aortenbogen wurden nach der letzten Stressexposition zur weiteren Analyse entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter Isoflurannarkose retrobulbär mittels einer Kapillare und das Blut wurde in einer Microvette gesammelt. Die Microvette wurden

innerhalb von 20 min nach Entnahme zentrifugiert (2.000 rcf, 15 min, 4 °C) und anschließend das Plasma in je 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die für Noradrenalin- und Adrenalin-ELISA vorgesehenen Plasmaproben wurden mit je 20 µl Katecholamin-stabilisierendem Puffer, hergestellt nach Angaben des jeweiligen Kits, supplementiert. Nach Tötung der Tiere durch Ausbluten erfolgte eine Punktion des linken Ventrikels und Spülung des Kreislaufs mit 20 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Der Aortenbogen wurde als Ganzes entnommen und in 200 µl Stabilisierungspuffer für Katecholamine eingelegt (Tabelle 7). Nach kurzer mechanischer Zerteilung mittels einer Schere wurden die Proben auf -80 °C für maximal eine Woche weggefroren. Die Aortenwurzel wurde mit einem schmalen Randsaum aus Herzmuskel entnommen und in O.C.T. *compound* in eine Plastikmulde eingebettet. Diese wurde auf einem Löffel mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf -80 °C aufbewahrt.

3.1.4 Denervation

Um einen lokalen Verlust von Noradrenalin zu bewirken, wurde die sympathische Innervation des Aortenbogens chirurgisch durchgetrennt. Dazu wurden die Tiere mit MMF (Midazolam, Medetomidin, Fentanyl) narkotisiert. Nach vertikaler Inzision des Halses wurde die Karotisbifurkation aufgesucht und das obere Halsganglion (SCG) lokalisiert. Dieses ist u.a. für die sympathische Innervation des Herzens und Aortenbogen zuständig und befindet sich unterhalb der Karotisbifurkation (Scheiermann et al., 2012). Der Hälfte der Versuchstiere wurde das SCG bilateral entnommen, während die Kontrollgruppe einer Scheinoperation unterlag, ohne tatsächliche Entnahme des Ganglions. Nach Abschluss der Operation wurde die Narkose mit AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon) antagonistisiert. Danach wurde allen Tieren bis 3 Tage nach Operation täglich 100 µl Buprenorphin subkutan gespritzt. Die Stressprozeduren (Abb. 12) wurden nach einer zweiwöchigen Regenerationszeit durchgeführt.

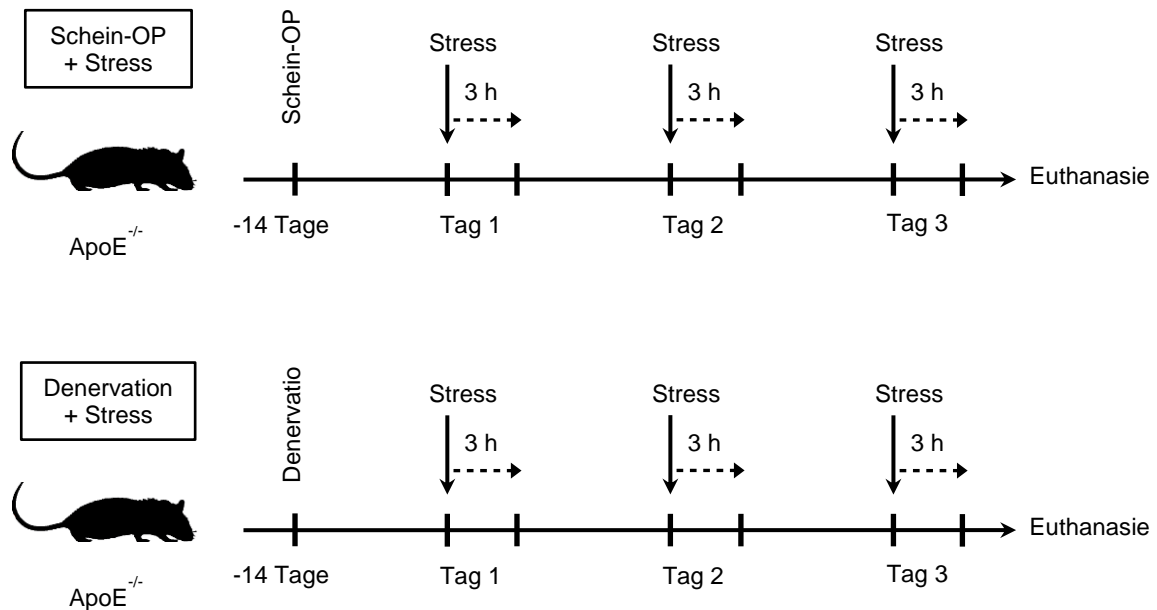


Abb. 12: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs nach Denervation.

Eine Gruppe wurde chirurgisch denerviert, die andere nur scheinoperiert. Nach 14 Tagen wurden alle ApoE^{-/-} Mäuse 3 Stressexpositionen von je 3 h, einmal täglich ausgesetzt. Direkt nach der letzten Exposition erfolgte die Euthanasie.

3.2 ELISA

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient unter anderem dem Nachweis von niedermolekularen Verbindungen, wie zum Beispiel Hormonen. Die Messung der Konzentration basiert auf einem enzymatischen Farbumschlag. Bei den durchgeführten ELISAs handelte es sich um den Typ der kompetitiven Immunassays. Dabei konkurrieren das gesuchte Antigen und ein enzymgekoppeltes Antigen um die Bindung an spezifischen Antikörpern, welche am Boden einer Mikrotiterplatte fixiert sind. Nach Bindung werden freie Antigene durch Waschschriffe entfernt. Nun folgt die Applikation des Substrats. Dieses wird durch das gekoppelte Enzym umgesetzt und bewirkt einen Farbumschlag. Je mehr gesuchtes Antigen bindet, umso weniger enzymgekoppeltes Antigen ist vorhanden und umso weniger Substrat kann umgesetzt werden. Die Signalstärke verhält sich also umgekehrt proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens.

Die Plasmaproben wurden wie oben beschrieben gewonnen. Aortenbögen wurden innerhalb einer Woche nach Organentnahme mit einem mechanischen *disrupter* mit Spitzen für Weichgewebe homogenisiert. Dazu wurden die Proben im Stabilisierungspuffer erst auf niedrigster dann auch höchster Stufe zerkleinert. Nach Zentrifugieren (12.000 rcf, 15 min, 4 °C) zur Entfernung des Zellschrotts wurde der Überstand abgenommen, in dem sich die

freigesetzten intrazellulären Proteine befinden. Die Enzymimmunoassays wurden nach Protokoll des jeweiligen Kits durchgeführt. Die Detektion des Signals erfolgte bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät.

3.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, um bestimmte Gewebe bzw. Proteine durch Anfärbung spezifischer Antigene sichtbar zu machen. Die Antigene werden von einem farbgekoppelten Antikörper gebunden. Ist dieser Farbstoff fluoreszierend nennt man dies Immunfluoreszenz.

Die Aortenwurzel wurde wie oben beschrieben gewonnen. Die O.C.T. Medium Blöcke wurden mit einem Kryomikrotom bei -20 °C in entweder $5\text{ }\mu\text{m}$ oder $10\text{ }\mu\text{m}$ Scheiben geschnitten. Je 2 Schnitte wurden auf einem Objektträger fixiert und bei -80 °C aufbewahrt. Pro Aortenbogen wurden 3 definierte Schnittebenen verglichen: 1. die Ebene des Ansatzes der Aortenklappen; 2. die Ebene von 3 durchgängigen Aortenklappen; 3. die Ebene $30\text{ }\mu\text{m}$ distal der Ebene 2. Diese Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenz analysiert.

Vor dem Färben wurden die Präparate zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, luftgetrocknet und anschließend für 10 min in Aceton fixiert. Das Waschen der Objektträger erfolgte in einem mit 1x PBS gefüllten Glaskasten, der 5 min auf einen Schüttler mit geringer Stufe gestellt wurde. Anschließend wurde mit einem Fettstift ein Kreis um die Gewebeprobe gezogen um die *blocking solution* (Tabelle 7) auf dem Objektträger zu halten. Bei Raumtemperatur folgte 1 h Inkubationszeit mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ *blocking solution* pro Schnitt in einem mit Wasser befeuchteten, lichtundurchlässigen Behälter. Die Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-Tyrosin Hydroxylase (Tabelle 10) erfolgte über Nacht bei 4 °C . Am nächsten Tag wurden die Präparate gewaschen (3x 5 min in phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween (PBS-T), 1x 5 min in PBS) und der Sekundärantikörper (Tabelle 10) für 1 h bei Raumtemperatur appliziert. Es folgte ein weiterer Waschschrift, wie oben beschrieben. Zum Schutz der Fluoreszenzfarben vor Ausbleichen diente am Ende ein Einschlussmittel mit gleichzeitiger Gegenfärbung mit DAPI, was zum Anfärben von DNA eingesetzt wird.

Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in den Vergrößerungsstufen 5x, 10x und 20x aufgenommen. Die Analyse der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ. Hier wurde zunächst der Bereich der Tunica adventitia eingezeichnet, wobei die in grün leuchtenden glatten Muskelzellen als Begrenzung zur Tunica media nach innen und als Orientierung nach außen die blau leuchtend Zellkerne zur Hilfe genommen wurden. Anschließend wurde in

diesem Bereich das Signal der TH gemessen und verglichen. Die Quantifizierung erfolgte durch die Messung der positiven Signalfäche relativ zur Gesamtfläche der Tunica adventitia.

3.4 Western Blot

Ein Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Diese werden in einem Gel durch elektrische Spannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Dort fixiert, können die Proteine durch spezifische Antikörperbindungen detektiert und analysiert werden.

Zur Aufbereitung des Gewebes wurden die Aorten in 2,0 ml Eppendorf-Gefäßen mit je 100 µl *Radioimmunoprecipitation-Assay-Buffer* (RIPA), 1 µl Phosphatase Inhibitor und 1 µl Proteinase Inhibitor, vorgelegt. In diesen erfolgte die Homogenisierung zunächst mittels *disrupter*, analog zur ELISA Vorbereitung, und anschließend im Ultraschallbad (30 sec Ultraschallbad gefolgt von 30 sec Kühlung auf Eis). Die Proben wurden insgesamt 3-mal in das Ultraschallbad eingesetzt und anschließend zentrifugiert, um den Zellschrott zu entfernen (20.000 rcf, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Protokoll des BCA Protein Assay Kits. Dazu wurden je 200 µl Arbeitsreagenz aus dem Kit, 4 µl RIPA-Puffer und 2 µl Probe in eine Mikroplatte pipettiert, diese kurz zentrifugiert und für 1 h auf 37 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde die Absorption mittels eines Mikroplatten-Lesers gemessen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Für die Elektrophorese wurde pro Probe dieselbe Proteinmenge von 35 µg mit RIPA-Puffer auf 15 µl verdünnt und mit je 5 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte im Thermomixer für 5 min bei 95 °C. Das Gel wurde mit gleichen Probenvolumen von 20 µl und 10 µl Proteinleiter geladen. Die Separation erfolgte in einer mit *running buffer* gefüllten Elektrophoresekammer bei 300 V für 18 min. Im Transfer System wurden die Proteine anschließend für 7 min in der Protokolleinstellung „Turbo“ vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Nach kurzem Waschen (5 min in TBS-T) wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5% BSA-TBS-T Lösung inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem Primärantikörper pTH (Tabelle 9). Für die Applikation von Antikörpern wurden diese zunächst in BSA gelöst und die Membran in einem 50 ml Falcon in Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach Waschen (3x 5 min in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 9) inkubiert. Dieser ist mit Meerrettichperoxidase (HRP) Antikörpern konjugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (3x 5 min in TBS-T).

Die Proteinbanden wurden durch Inkubation mit hochempfindlicher Chemilumineszenz (SuperSignal™) sichtbar gemacht. Hierbei katalysiert die HRP die Oxidation des Substrats, welches dadurch lumineszent wird. Diese Chemilumineszenz wurde mit einem biomolekularen Aufnahmegerät detektiert. Um die Proteinleiter zum Vergleich abzubilden, wurde zunächst ein Digitalisierungsbild angefertigt. Anschließend erfolgten die Aufnahmen mit langsam ansteigender Belichtungszeit von 30 sec bis ca. 6 min. Die Auswertung wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) ebenfalls detektiert. Nach Messung der Signalstärke von pTH wurde diese auf GAPDH normalisiert.

3.5 Statische Zellkulturexperimente

Zellkulturexperimente dienen der Untersuchung isolierter Zelllinien außerhalb des Organismus und unter kontrollierten Bedingungen.

Die Versuche wurden mit primären Endothelzellen der Mauseorta (mAoECs) durchgeführt. Diese wurde in normalem Nährmedium in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO₂ Gehalt bei 37°C angezüchtet. Um optimale Versuchskonditionen zu erreichen, wurden zu Beginn Testexperimente durchgeführt. Dabei wurde Zelldichte (50.000 *versus* 200.000 Zellen pro Well), Nährboden (mit Gelatin-basierter Lösung überzogen *versus* blank), Stimulation (Vorstimulation mit IL-1β *versus* keine Stimulation) und Ablösemedium (Trypsin *versus* Accutase) verglichen. Die Entscheidung für die definitiven Versuchskonditionen fiel basierend auf der stärksten basalen Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen in der Durchflusszytometrie.

Die Experimente wurden in einer zuvor mit Gelatin-basierter Lösung überzogenen 24-Wellplatte durchgeführt. Die Konzentration der Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau bestimmt. Pro Well wurden 50 000 Zellen in 500 µl Medium ausgesät und zum Anwachsen für 48 h bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Hormon bzw. der Kontrollsubstanz (Abb. 13).

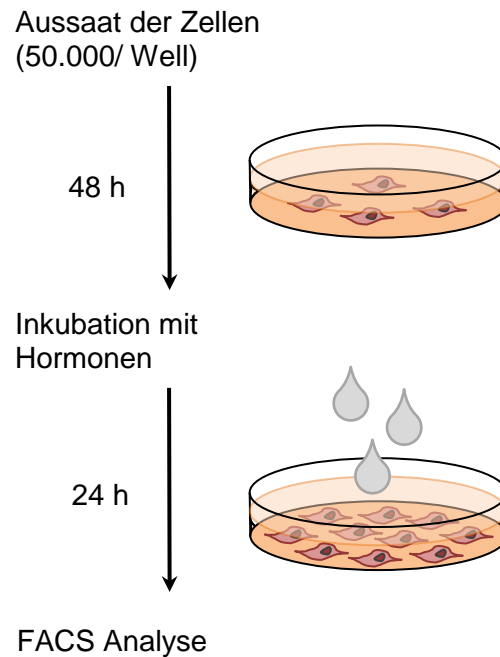


Abb. 13: Versuchsschema zur Hormoninkubation.

Pro Kondition wurden Triplikate von mAoECs ausgesät. Am dritten Tag nach Aussaat wurden die Zellen mit dem jeweiligen Hormon bzw. Trägersubstanz für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Zur hormonellen Stimulation wurde Noradrenalin und Adrenalin in Salzsäure (0,5 M HCL) und Kortikosteron in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Tabelle 14) und steril filtriert. Studienergebnisse zu Stresshormonwerten im Blut von Mäusen variieren je nach Untersuchungsmethode. Zusätzlich kommen physiologische Schwankungen und pulsatile Freisetzung. Orientierend an anderen Publikationen (Gong et al., 2015; Grouzmann et al., 2003; van der Heijden et al., 2020) haben wir daher drei sich in einer 10er Potenz unterscheidenden Hormonkonzentration (10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) vergleichen und uns aufgrund des am stärksten ausgeprägten Effekts für 1 μ M entschieden. Die Hormonkonzentration der Suspension, welche auf die Zellen gegeben wurde, lag bei 10 μ M, sodass pro Well durch Zugabe von 50 μ l eine Hormonkonzentration von 1 μ M entstand. Für jede Kondition wurde eine jeweilige Kontrollgruppe mit der jeweiligen Trägersubstanz angelegt und in Triplikaten ausgesät. Die Hormone blieben für 24 h auf den Zellen.

Tabelle 14: Pipettierschema zur Hormonverdünnung.

Konzentration	Noradrenalin	Adrenalin	Kortikosteron
Hormonlösung (HL)	0,016918 g Noradrenalin + 1 ml 0,5 M HCL	0,01822 g Adrenalin + 1 ml 0,5 M HCL	0,01 g Kortikosteron + 0,58 ml DMSO
1mM Hormon bzw. Kontrolllösung	10 µl HL bzw. HCL + 990 µl H ₂ O		10 µl HL bzw. DMSO + 490 µl H ₂ O
100 µM	40 µl 1mM Lösung + 360 µl H ₂ O		
10 µM	40 µl 100 µM Lösung + 360 µl H ₂ O		

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit Accutase abgelöst. Im Vergleich zu Trypsin, einer anderen häufig verwendeter Substanz zum Ablösen von Zellen, gilt Accutase als besonders schonend gegenüber der Zellen (Li et al., 2015). Da das Wirkmaximum der Accutase bei 37 °C liegt, wurden die Zellen auf einer Heizplatte bei dieser Temperatur für ca. 20 min inkubiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit einer 500 µl Pipette. Durch Auf- und Abpipettieren ließen sich die Zellen von der Unterfläche mechanisch abspülen. Es wurde darauf geachtet, dass jedes Well vergleichbar behandelt wurde. Die abgelösten Zellen wurden in FACS Gefäße übertragen und zentrifugiert (400 rcf, 8 min, 4 °C). Nach Entfernung des Überstands wurden die abgesetzten Zellen in 300 µl FACS Puffer resuspendiert. Die Aufbereitung und das Färben der Zellen erfolgten nach Protokoll wie Kapitel 3.7 beschrieben.

3.6 Dynamische Zellkulturexperimente (Flusskammer)

Eine Flusskammer bietet die Möglichkeit dynamischen Fluss, und damit Scherstress, *in vitro* zu simulieren. Dazu wurde Zellmedium in einer festgelegten Flussgeschwindigkeit über Zellen gepumpt. Diese waren in einem Objektträger in einem kanalartigen Lumen mit definiertem Volumen ausgesät. Die so entstehende Scherspannung übertrug sich auf die Zellen, welche mit Veränderungen in Anordnung (Abb. 14) und Verhalten reagierten. Die Exposition von Endothelzellen mit Scherspannung soll dabei möglichst gut physiologische Zustände in der Zellkultur simulieren.

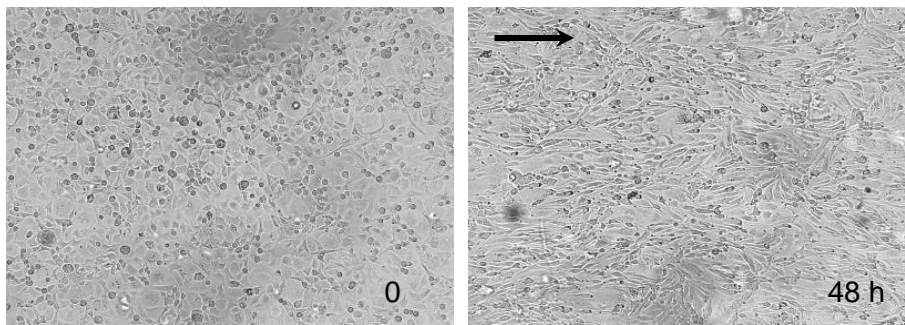


Abb. 14: Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung.

Es sind Mikroskop-Aufnahmen in 10x Vergrößerung von Endothelzellen in 0,2 mm Objektträgern zu sehen. Dabei ist eine deutliche Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung zu erkennen.

Der verwendete Versuchsaufbau zielte darauf ab, Normaldruck mit Hochdruck zu vergleichen. Druck wird durch verschiedene Variablen beeinflusst, u.a. durch den Gefäßdurchmesser. Da zwei unterschiedliche Druckverhältnisse in einem geschlossenen Kreislauf mit einheitlicher Flussrate simuliert werden sollten, wurden Objektträger mit zwei verschiedenen Tunnelhöhen verwendet. Eine Höhe von 0,2 mm ergab ein Tunnelvolumen von 50 μl und eine Höhe von 0,8 mm ein Volumen von 200 μl . Somit erzeugte die gleiche Flussrate von 8,12 ml/ min im Objektträger mit 0,2 mm Tunnelhöhe eine Scherspannung von 30 dyn/cm^2 und im Objektträger mit 0,8 mm Tunnelhöhe von 2 dyn/cm^2 . Der maximal untersuchte Scherstress lag bei 30 dyn/cm^2 , da bei höheren Raten ein Ablösen der Zellen beobachtet wurde.

In beiden Objektträgern wurden 200.000 Zellen/ 2,5 cm^2 ausgesät und zum Anwachsen 2 h bei 37 °C inkubiert. Dieses wurde anschließend per Mikroskop überprüft. Nun folgte das Anschließen des Pumpsystems mit Serienschaltung der Objektträger (Abb. 15).

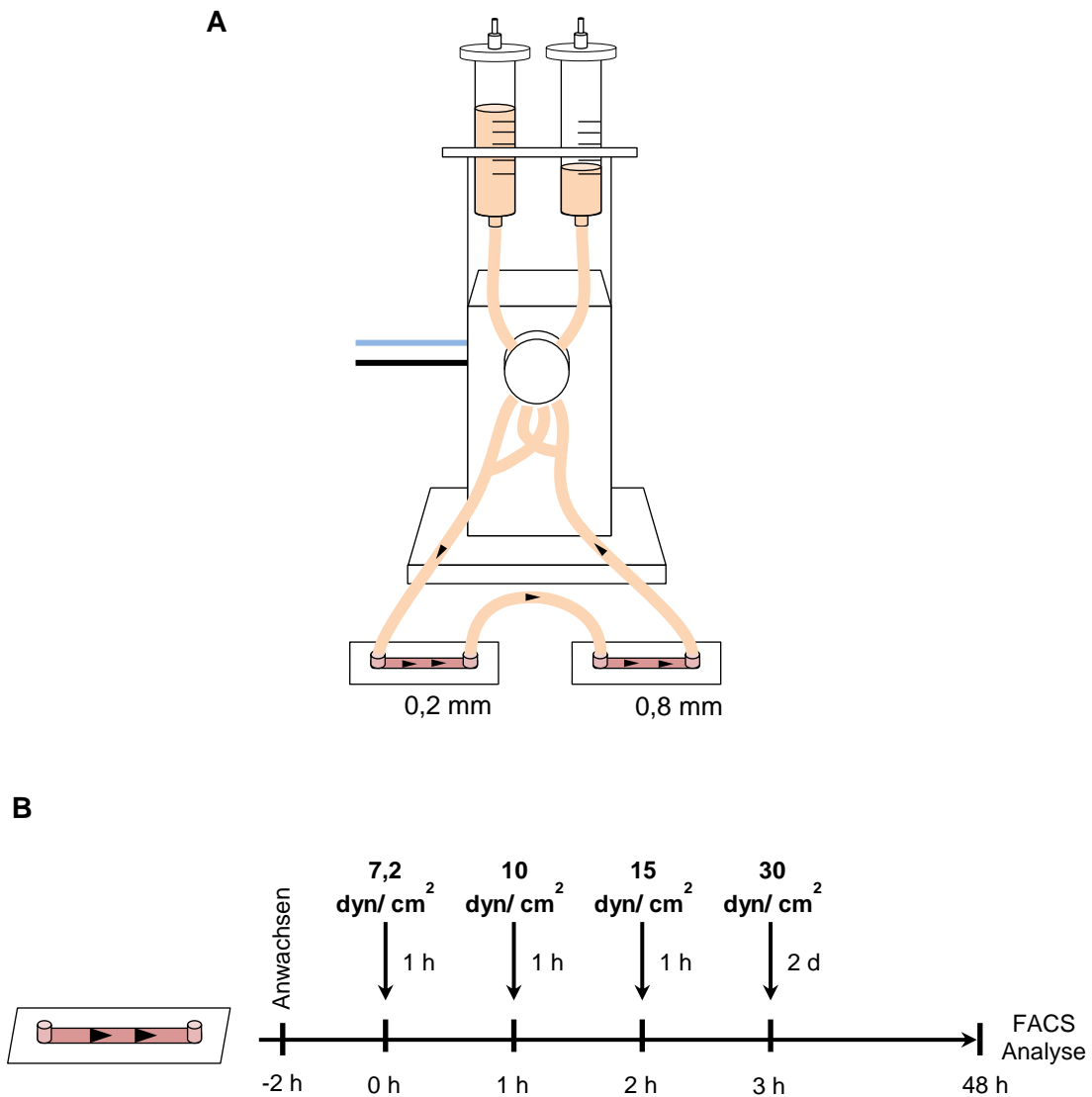


Abb. 15: Versuchsaufbau der Flusskammer.

(A) Darstellung des Pumpsystems mit Objektträgern mit unterschiedlichem Tunnelvolumen in Serienschaltung. (B) Zeitleiste des Versuchsablaufs mit ansteigenden Flussraten.

Um ein Abspülen der Zellen zu vermeiden, wurde zunächst nur geringer Druck angelegt, stündlich gesteigert und der finale Maximaldruck über 2 Tage appliziert (Tabelle 15). Zwischendurch wurden die Zellen per Mikroskop auf Zellausrichtung und Aussehen kontrolliert (Abb. 14).

Tabelle 15: Druckeinstellungen der Flusskammer.

Es wurde das Yellow/Green-System verwendet.

0,2 mm Höhe		0,8 mm Höhe
Flussrate (ml/ min)	Scherstress (dyn/ cm ²)	Scherstress (dyn/ cm ²)
2,00	7,2	0,5
2,71	10	0,7
4,06	15	1,0
8,12	30	2,0

Nach 48 h Scherstress wurden die Objektträger vom Pumpsystem entfernt. Das Medium wurde durch Accutase ersetzt und die Objektträger bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die schon gelösten Zellen wurde in FACS Gefäße übertragen und der Ablöseprozess mit Accutase von der anderen Seite des Objektträgers wiederholt. Durch mechanische Mobilisation ließen sich alle Zellen lösen. Die FACS Gefäße wurden anschließend zentrifugiert (400 rcf, 4 °C, 8 min), der Überstand dekantiert und die abgesetzten Zellen in 300 µl FACS Puffer resuspendiert. Die Aufbereitung und das Färben der Zellen erfolgten nach Protokoll wie im Folgenden beschrieben. Bei Analyse der Endothelzellen lag das Hauptaugenmerk auf denselben Oberflächenmolekülen, die schon unter statischen Bedingungen untersucht wurden.

3.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) kann Zellen unterschiedlicher Populationen separieren und analysieren. Zuvor markierte Oberflächenmoleküle können durch diese laserbasierte Methode erkannt und gemessen werden. So konnten aus den Zellen der Experimente die vitalen und unbeschädigten Endothelzellen herausgefiltert und die auf ihnen exprimierten Oberflächenmoleküle markiert und verglichen werden.

Alle Färbungen zur Durchflusszytometrie liefen nach demselben Protokoll ab. Genauere Angaben zu den verwendeten Antikörpern sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Zellen lagen in 300 µl FACS Puffer suspendiert vor. Zunächst wurde ICAM-2 mit einem Biotin-gekoppelten Antikörper gebunden. Nach 15 min wurde die Reaktion mit 1000 µl FACS Puffer abgestoppt, die Proben zentrifugiert (400 rcf, 8 min, 4 °C) und erneut in 300 µl FACS Puffer resuspendiert. Nun folgte die Färbung der weiteren zu untersuchenden Oberflächenmoleküle P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, und ICAM-1. Außerdem wurden CD31 und LAMP-1 zur Differenzierung von Endothelzellen und Streptavidin, um Biotin sichtbar zu machen, angefärbt. Parallel wurden Kompensationsfärbungen der einzelnen Farbstoffe hergestellt,

um das FACS-Gerät zu kalibrieren. Die Beendigung der Reaktion erfolgte wie oben beschrieben. Zum Schluss wurden die Zellen in 200 μ l FACS Puffer resuspendiert.

Zur Analyse der Ergebnisse wurden in jedem Experiment zunächst alle lebendigen (FSC-A/ SSC-A) und nichtverklumpten Zellen (FSC-A/ FSC-W und SSC-A/ SSC-W) herausgefiltert. Danach folgte eine Selektierung der Endothelzellen (CD31/ Lamp1). Die Daten wurden an einem Durchflusszytometer LSR Fortessa erhoben und mit der Software FlowJo ausgewertet.

3.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 8 verwendet. Zur Erkennung von Ausreißern wurde der ROUT-Test angewandt und alle identifizierten Werte ausgeschlossen. Anschließend wurden Experimente mit einer Probenanzahl von $n \geq 8$ mit dem D'Agostino-Pearson-Test und Experimente mit einer Probenanzahl von $n < 8$ mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Darauf folgte für die nicht-normalverteilten Daten eine Vergleichsanalyse mittels Mann-Whitney (Testung zweier Gruppen mit Varianz) bzw. Wilcoxon-Test (Testung einer Gruppe mit Varianz gegen den theoretischen Wert 1,0) und für normalverteilte Daten einem ungepaarten T-Test bzw. *one-sample* T-Test (Testung einer Gruppe gegen den theoretischen Wert 1,0). Alle Testarten und Stichprobengrößen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Die Abbildungen stellen die Daten als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

4 Ergebnisse

4.1 Hormonelle Reaktion auf akuten psychischen Stress

4.1.1 Anstieg der Stresshormone

Im Menschen ist bekannt, dass Stress die neuroendokrine Achse aktiviert, die physiologischer Weise zu einer erhöhten Freisetzung von Stresshormonen (Noradrenalin, Adrenalin und Kortikosteron) und so im Verlauf zu einer Erhöhung von Blutdruck und Herzfrequenz führt (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). Daher sollten entsprechende Hormonveränderungen in unserem Tiermodell für akuten Stress untersucht werden. Diese Art, akuten psychischen Stress durch räumliche Enge zu erzeugen, ist in der Forschung ein weit verbreitetes Stressmodell (Buynitsky & Mostofsky, 2009) und imitiert am besten den akuten psychischen Stress bei Menschen (Glavin et al., 1994). Eine Kohorte wurde 3 Episoden von je 3 h Stress einmal täglich ausgesetzt, während die Kontrollgruppe keinem Stress exponiert war. Danach wurde eine Quantifizierung der Stresshormone Noradrenalin, Adrenalin und Kortikosteron im Plasma durchgeführt. Im Menschen ist Kortison die inaktive Form von Kortisol. Kortikosteron ist das murine Pendant zum menschlichen Kortisol. Da Noradrenalin auch lokal in der Tunica adventitia freigesetzt werden kann, wurde zusätzlich der Hormonspiegel im Gewebe des Aortenbogens untersucht. Es zeigt sich in den Tieren nach Stressexposition ein deutlicher Anstieg von Noradrenalin im Aortenbogen, nicht jedoch systemisch im Plasma (Abb. 16A). Für Adrenalin und Kortikosteron konnte ein verstärkter Anstieg im Plasma nachgewiesen werden (Abb. 16B-C).

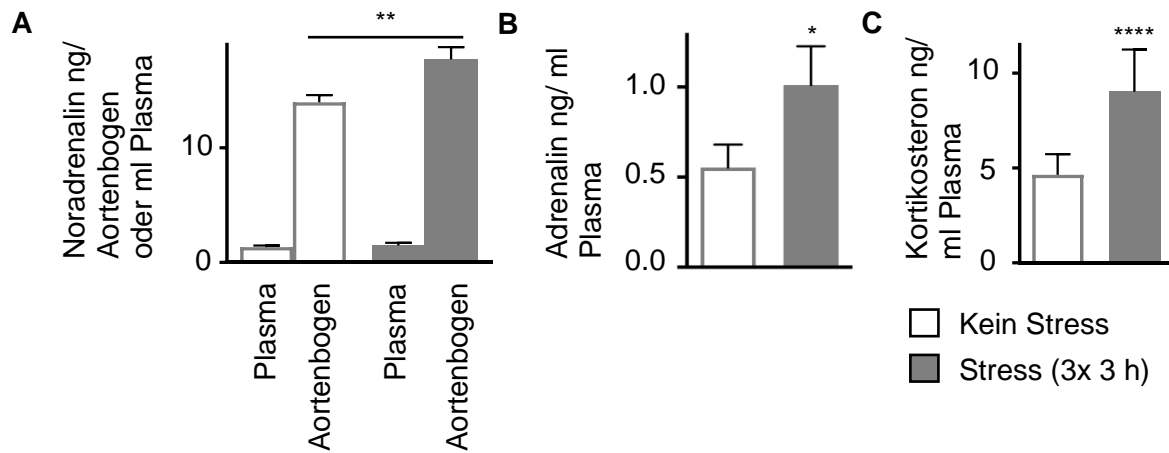


Abb. 16: Akuter psychischer Stress führt zum Anstieg von Stresshormonen.

Hormonspiegel-Bestimmung nach Stressexposition mittels ELISA in Plasma und Aortenbogen von Mäusen. **(A)** Noradrenalin zeigt einen signifikanten Anstieg im Aortenbogen, während der Plasmaspiegel konstant bleibt. Plasma: n=8:8 C57Bl/6 + n=6:5 ApoE^{-/-}, Aortenbogen: n=6:8 C57Bl/6 + n=6:4 ApoE^{-/-}. **(B)** Adrenalin ist im Plasma signifikant erhöht. ApoE^{-/-} n=11:10. **(C)** Der Plasmaspiegel von Kortikosteron ist signifikant erhöht. ApoE^{-/-} n=12:12. Quantifizierung des Hormonspiegels in nicht-gestressten und gestressten (3 Expositionen von je 3 h, einmal täglich) Mäusen. Dargestellt als Mittelwert + SEM. A und B analysiert mit T-Test, C Analysiert mit Mann-Whitney Test, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

4.1.2 Tyrosin Hydroxylase-Spiegel in der Tunica adventitia nach Stress

Wie in Kapitel 1.3 bereits beschrieben, können Stresshormone durch unterschiedliche Signalwege freigesetzt werden. Unter Stress steigt Noradrenalin lokal im Aortenbogen (Abb. 16). Um die Sympathikusaktivität in den lokalen Nervenendigungen genauer zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung der Tyrosin Hydroxylase (TH) in Kryoschnitten der Aortenwurzel durchgeführt. Die TH ist ein wichtiger Bestandteil der Katecholamin-Biosynthese (Abb. 17).

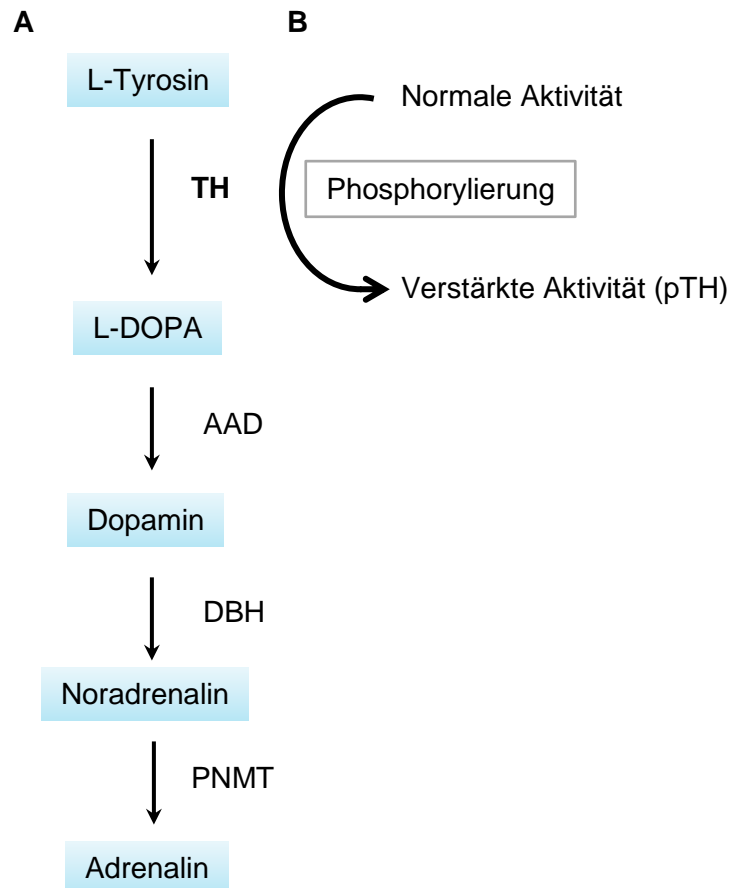


Abb. 17: Schematische Darstellung der Katecholamin-Biosynthese.

(A) Einzelne Syntheseschritte von Katecholaminen. TH (Tyrosin Hydroxylase), pTH (Phospho-Tyrosin Hydroxylase) AAD (Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase), DBH (Dopamin-β-Hydroxylase), PNMT (Phenylethanolamin N-Methyltransferase). **(B)** Verstärkung der enzymatischen Aktivität durch Phosphorylierung. Abbildung modifiziert nach Schulz, Eisenhofer, & Lehnert, 2004.

Im Allgemeinen führt Katecholamin Sekretion zu keinem Levelabfall im Gewebe, da es bei Sekretion zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Syntheserate kommt. Die TH ist dabei das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Synthesevorgangs (Dunkley et al., 2004). Ihre Aktivität wurde durch das TH-Signal im Bereich der Tunica adventitia zwischen Stress- und Kontrollgruppe verglichen (Abb. 18A). Mittels Immunfluoreszenz konnte allerdings kein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden (Abb. 18B).

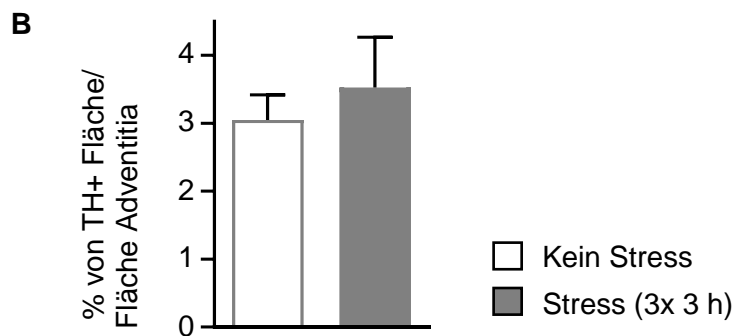
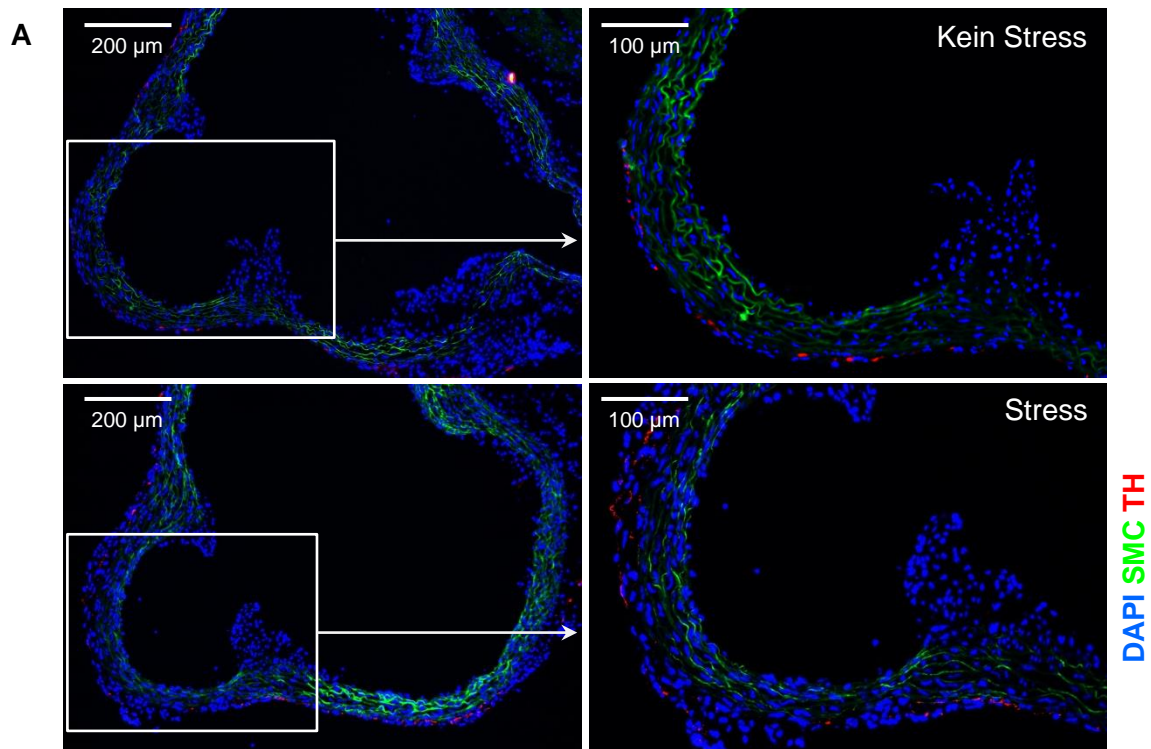


Abb. 18: Stress führt zu keiner Tyrosin Hydroxylase-Erhöhung in der Tunica adventitia der Aortenwurzel.

Anfärbung und Quantifizierung der Tyrosin Hydroxylase durch Immunfluoreszenz-Färbung in gestressten und nicht gestressten Mäusen. **(A)** Repräsentative Fluoreszenzmikroskopbilder der Aortenwurzel aufgenommen in 10 x und 20 x Vergrößerung. **(B)** Quantifizierung der TH. Expression als positive Fläche pro Gesamtfläche der Tunica adventitia. Die Fluoreszenzfärbung zeigte keinen Unterschied in der Expression von TH zwischen nicht-gestressten und gestressten (3 Expositionen von je 3 h, einmal täglich) ApoE^{-/-} Mäusen, n=11:11. Schnittdicke 5 µm. Dargestellt als Mittelwert + SEM, analysiert mit T-Test.

4.1.3 Phosphorylierung der der Tyrosin Hydroxylase

Da mittels der Immunfluoreszenz keine verstärkte TH-Expression nachgewiesen werden konnte, aber, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, erhöhte Noradrenalin-Spiegel im Aortenbogen gestresster Tieren zu finden sind, wurde zusätzlich eine andere Konformation der TH mittels Immunoblotting untersucht. Wie bereits erwähnt, ist die TH der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Katecholamin-Synthese (Abb. 17), welche parallel zur Sekretion

aktiviert wird. Die TH kann durch zwei Mechanismen reguliert werden: Regulierung durch Genexpression (Quantität) und die kurzfristige Regulierung der Enzymaktivität (Qualität). Die Aktivität kann durch negatives Feedback, allosterische Regulation und Phosphorylierung moduliert werden (Schulz et al., 2004). Die Phosphorylierung ist der Hauptmechanismus zur Aufrechterhaltung der Katecholamin-Spiegel im Gewebe nach Sekretion (Dunkley et al., 2004). *In vitro* wurden mehrere Proteinkinasen nachgewiesen, welche die TH phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung kommt es in der Biosynthese unter anderem zu einer stärkeren Affinität der Kofaktoren und einem abgeschwächten negativen Feedbackmechanismus. Dies erhöht die enzymatische Aktivität der TH (Flatmark, 2000). Im Western Blot konnte dementsprechend ein erhöhter pTH-Gehalt in stressexponierten Tieren gegenüber den nicht gestressten nachgewiesen werden.

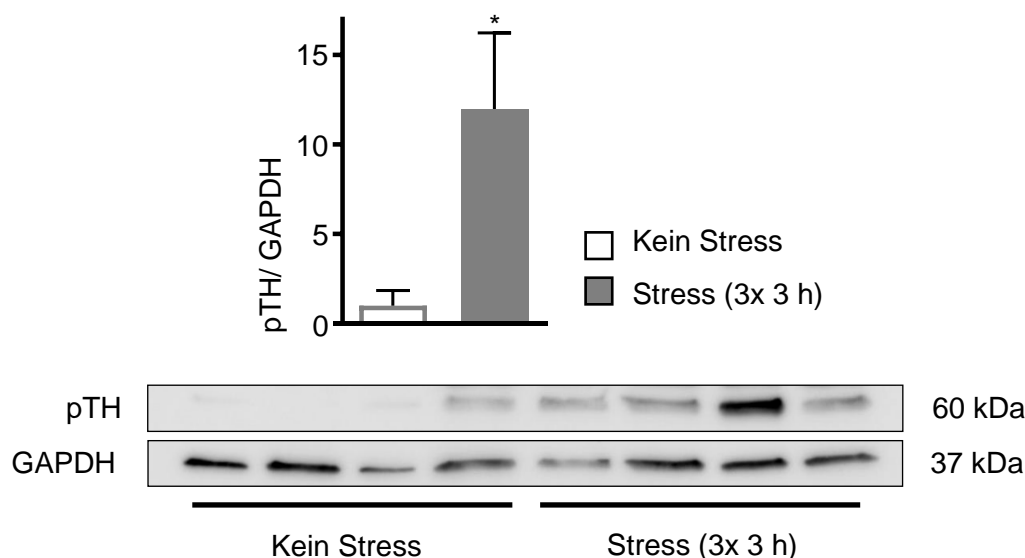


Abb. 19: Akuter psychischer Stress erhöht die Proteinexpression der Phospho-Tyrosin Hydroxylase im Aortenbogen.

Western Blot zur Quantifizierung von pTH in nicht-gestressten und gestressten (3 Expositionen von je 3 h, einmal täglich) C57Bl6J Mäusen. n=4:4. Dargestellt als Mittelwert + SEM, analysiert mit Mann-Whitney Test, *p<0.05.

4.2 Auswirkung der sympathischen Denervation

4.2.1 Abfall von Noradrenalin in Aortenbögen

Wie in Kapitel 4.1.1 gezeigt, hat Stress Einfluss auf den Hormonhaushalt in Mäusen. Mittels der chirurgischen Denervation des Aortenbogens, sollte die lokale Ausschüttung von Noradrenalin unterbunden werden. Durch eine ergänzende Stresshormon-Messung sollte

das Prinzip, dass eine chirurgische Denervation zum lokalen Abfall von Noradrenalin im Aortenbogen führt, bestätigt werden, um so die Aussagekraft des in Abb. 6 dargestellten Experiments zu bekräftigen. Dieses konnte zeigen, dass in denervierten Tieren, im Vergleich zu scheinoperierten Tieren, nach Stressexposition die Rekrutierung von Leukozyten in Plaques erniedrigt ist. In unserem Experiment konnte in der Gruppe der chirurgischen Denervation nach Stressexposition ein erniedrigter Noradrenalin-Spiegel im Aortenbogen verzeichnet werden, im Vergleich zu der scheinoperierten Kontrollgruppe nach Stressexposition (Abb. 20A). Der Plasmaspiegel von Noradrenalin und Kortikosteron blieben unverändert (Abb. 20A+C). Im Gegensatz dazu stieg der Adrenalingehalt im Plasma der Denervationsgruppe an (Abb. 20B).

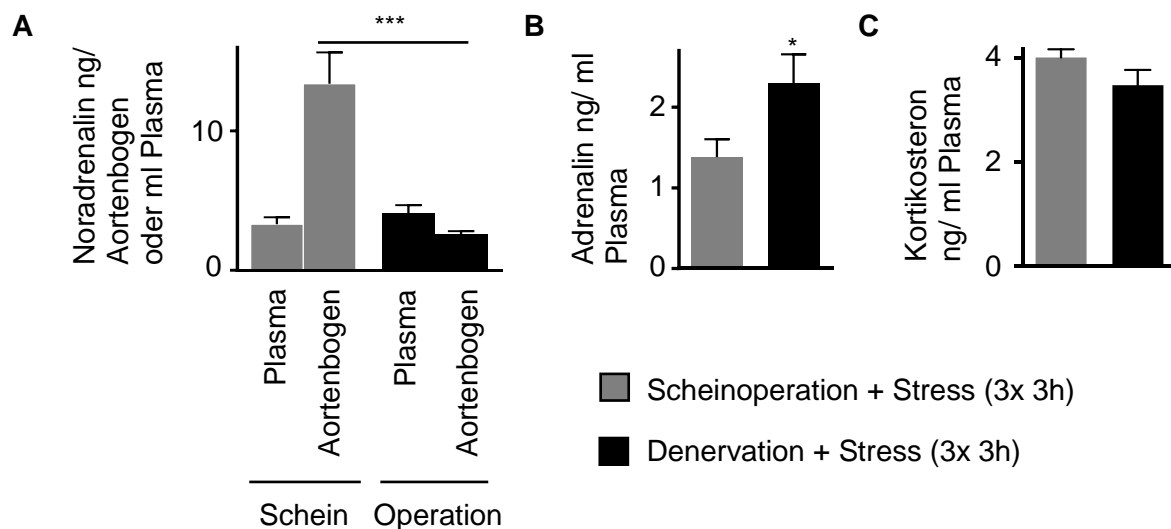


Abb. 20: Denervation verhindert Anstieg von Noradrenalin im Aortenbogen nach Stressexposition.

Hormonspiegel-Bestimmung nach Stressexposition mittels ELISA in Plasma und Aortenbogen von entweder denervierten oder scheinoperierten Mäusen. **(A)** Nach chirurgisch sympathischer Denervation zeigen sich keine Unterschiede von Noradrenalin im Plasma, wohingegen die Aortenbögen signifikant niedrigere Konzentrationen aufweisen. Plasma: ApoE^{-/-} n=7:8, Aortenbogen: ApoE^{-/-} n=11:11. **(B)** Adrenalin steigt signifikant im Plasma an. ApoE^{-/-} n=11:11. **(C)** Der Kortikosteron-Spiegel im Plasma bleibt konstant. ApoE^{-/-} n=10:10. Quantifizierung des Hormonspiegels in gestressten (3 Expositionen von je 3 h, einmal täglich) ApoE^{-/-} Mäusen mit denervierter oder intakter sympathischer Innervation des Aortenbogens. Dargestellt als Mittelwert + SEM, analysiert mit T-Test, *p<0.05, ***p<0.001.

4.2.2 Tyrosin Hydroxylase-Spiegel in der Tunica adventitia nach Denervation

Wie oben bereits beschrieben, kann durch Immunfluoreszenz die Tyrosin Hydroxylase (TH) als Marker der sympathischen Aktivität angefärbt und dargestellt werden. In diesem

Versuchsaufbau sollte untersucht werden, ob sich die TH-Expression nach Stressexposition durch chirurgische Durchtrennung verringert. Durch Denervation kommt es zur nervalen Degeneration und somit zum Verlust von Enzymen und Enzymaktivität (Scheiermann et al., 2012).

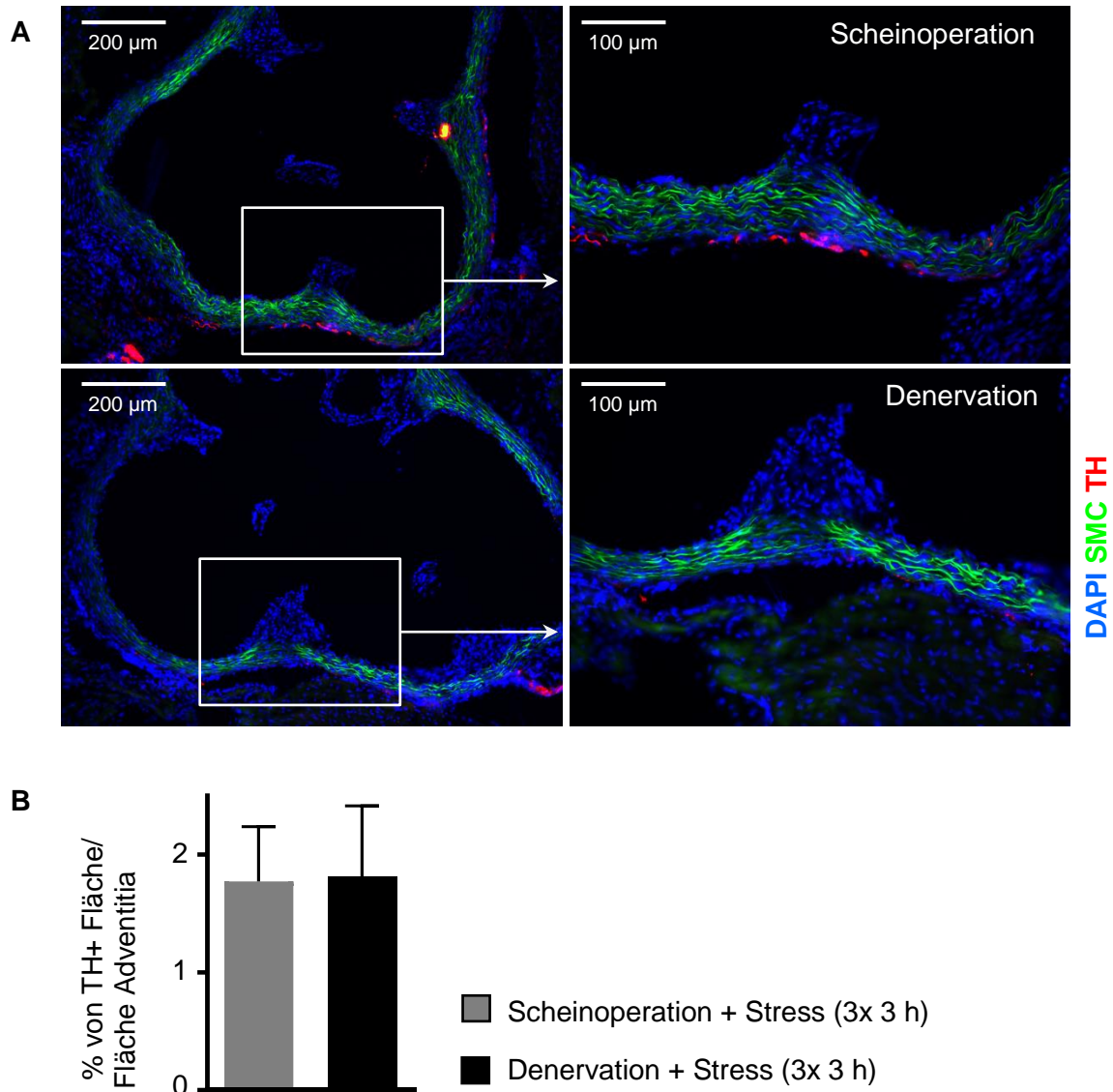


Abb. 21: Denervation führt zu keiner Reduktion der Tyrosin Hydroxylase in der Tunica adventitia der Aortenwurzel.

Anfärbung und Quantifizierung der Tyrosin Hydroxylase durch Immunfluoreszenzfärbung in gestressten Mäusen nach Denervation und Scheinoperation. **(A)** Repräsentative Fluoreszenzmikroskopbilder der Aortenwurzel aufgenommen in 10 x und 20 x Vergrößerung. **(B)** Quantifizierung von Tyrosin Hydroxylase. Expression als positive Fläche pro Gesamtfläche der Tunica adventitia. Die Fluoreszenzfärbung zeigte keinen Unterschied in der Expression von TH nach Stressexposition (3 Expositionen von je 3 h, einmal täglich) in scheinoperierten und denervierten ApoE^{-/-} Mäusen, n=11:11. Schnittdicke 10 μm. Dargestellt als Mittelwert + SEM, analysiert mit T-Test.

Im Vergleich zu dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Versuch, wurden die Präparate diesmal in doppelter Dicke geschnitten, um so ein mögliches Signal zu verstärken. Die Schnitte wurden in identischer Weise gefärbt, fotografiert und analysiert. Allerdings konnte auch in dieser Kohorte kein Unterschied zwischen chirurgisch denervierten und scheinoperierten Tieren nachgewiesen werden.

4.3 Phänotypische Veränderungen kultivierter Endothelzellen durch Stress

4.3.1 Effekt von Stresshormonen unter statischen Bedingungen

Die *in vitro* kultivierten Zellen wurden mit Stresshormonen inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf ihre Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Durch diese Experimente sollten die zugrunde liegenden Mechanismen der vermehrten Rekrutierung von Leukozyten unter Stress (Abb. 5) analysiert werden. Der Versuchsaufbau beruhte auf der Annahme, dass die durch Stress erhöhten Hormone den Phänotyp von Endothelzellen beeinflussen. Im Fokus standen die für Leukozytenadhäsion und -migration relevanten Zelladhäsionsmoleküle (Kapitel 1.3.3). Endothelzellen der Mausaorta wurden entweder mit Noradrenalin, Adrenalin oder Kortikosteron 24 Stunden inkubiert. Abb. 22 zeigt, dass es durch Inkubation mit Noradrenalin im Vergleich zur Inkubation mit Kontrollmedium zu einer vermehrten Expression von P-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 kam. E-Selektin wies ebenfalls einen Trend zu verstärkter Expression auf. Im Gegensatz dazu wurden bei ICAM-2 keine Veränderungen beobachtet.

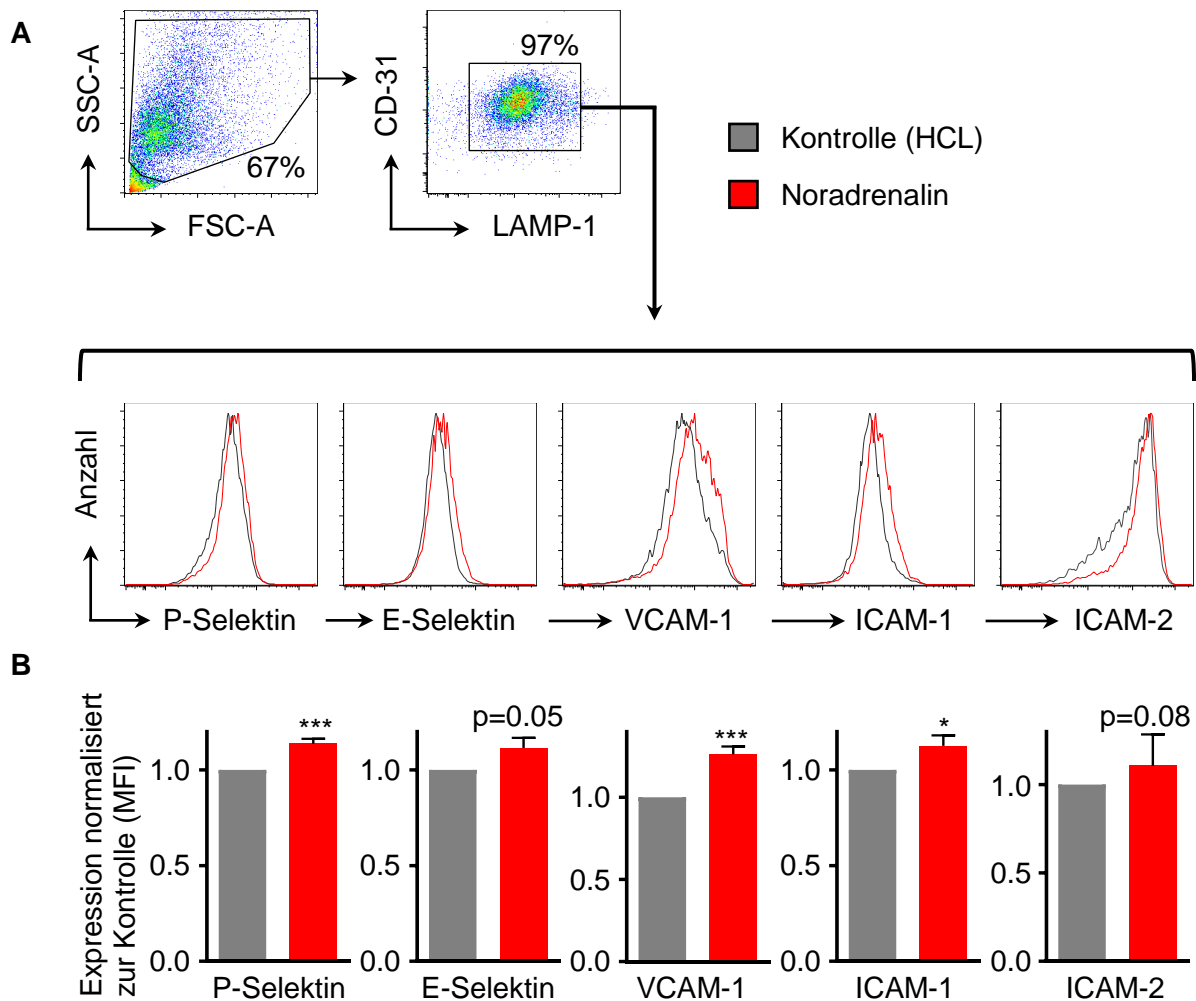


Abb. 22: Noradrenalin steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.

(A) Gating und Histogramme zur durchflusszytometrischen Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf mAoECs. (B) Quantifizierung der Proteinexpression von Zelladhäsionsmolekülen nach Noradrenalin- und Kontroll-Behandlung unter statischen Bedingungen. $n=10$. Dargestellt im Verhältnis zur Kontrolle als Mittelwert + SEM, analysiert mit *one-sample* T-Test, * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

Adrenalin ist ein weiteres Katecholamin, das als Antwort auf Stress sowohl in Menschen als auch im Tier ansteigt. Abb. 23 zeigt die Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation von mAoECs mit Adrenalin. Hier konnten keine Veränderungen in der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche beobachtet werden.

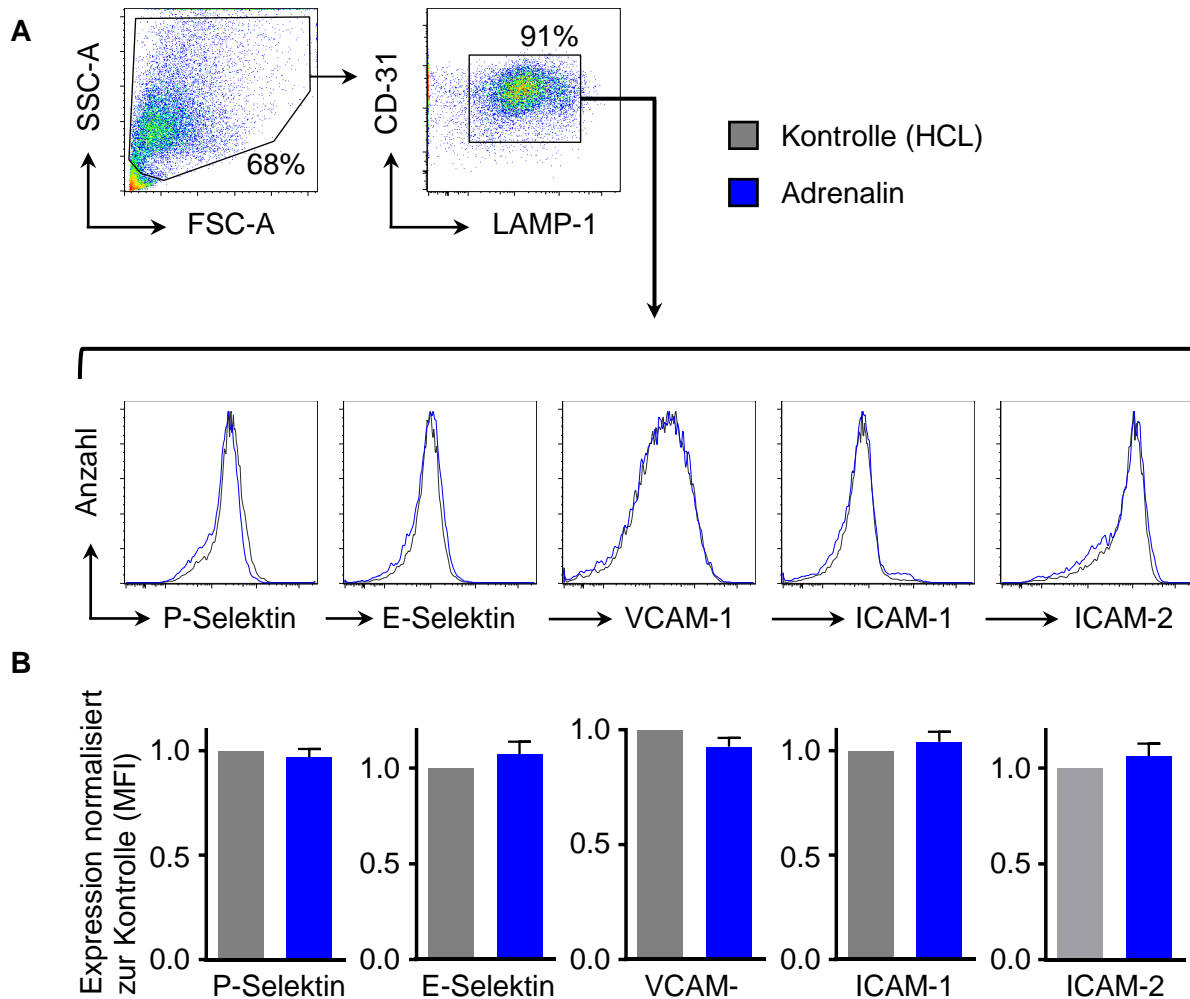


Abb. 23: Adrenalin hat keinen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.

(A) Gating und Histogramme zur durchflusszytometrischen Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf mAoECs. (B) Quantifizierung der Proteinexpression von Zelladhäsionsmolekülen nach Adrenalin- und Kontroll-Behandlung unter statischen Bedingungen. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. $n=9$. Dargestellt im Verhältnis zur Kontrolle als Mittelwert + SEM, analysiert mit *one-sample* T-Test.

In Abb. 24 sind die Ergebnisse der Inkubation mit Kortikosteron dargestellt. Wie Adrenalin bewirkte auch Kortikosteron keine Veränderungen in der Proteinexpression der Zelladhäsionsmoleküle. Lediglich die Expression von ICAM-2 reduziert sich durch die Stimulation mit Kortikosteron. Die anderen Moleküle wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

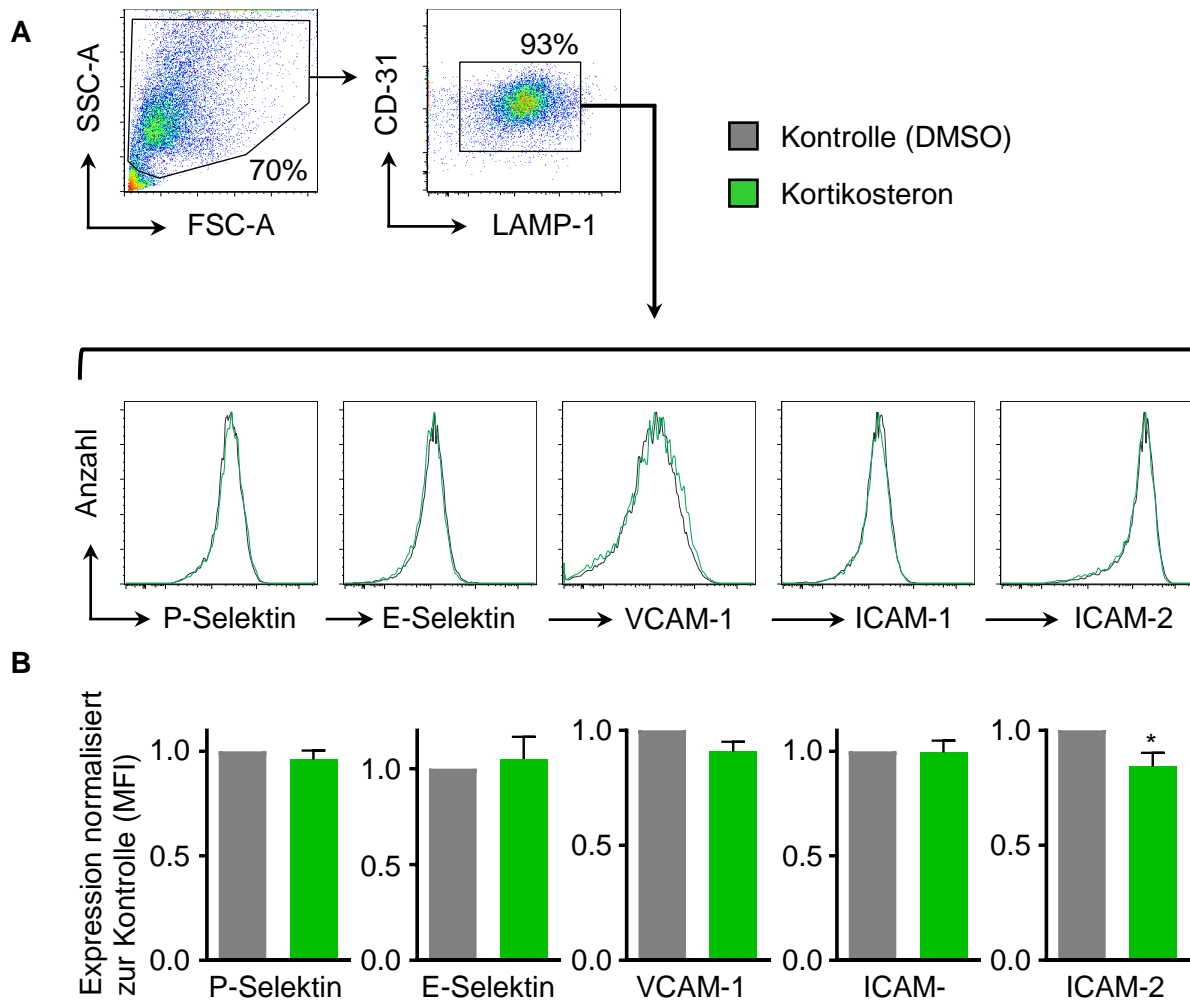


Abb. 24: Kortikosteron hat geringen Einfluss auf Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.

(A) Gating und Histogramm zur durchflusszytometrischen Analyse von Zelladhäsionsmolekülen auf mAoECs. **(B)** Quantifizierung von Proteinexpression nach Kortikosteron- und Kontroll-Behandlung unter statischen Bedingungen. Es zeigt sich eine Runterregulation von ICAM-2. $n=11$. Dargestellt im Verhältnis zur Kontrolle als Mittelwert + SEM, analysiert mit *one-sample* T-Test bzw. Wilcoxon Test, $*p<0.05$.

4.3.2 Effekt von Scherstress unter Flussbedingungen

Mit dem ibidi-Pump-System sollte der Einfluss von Scherstress auf die Proteinexpression von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen untersucht werden. Dabei war für uns besonders der Vergleich zwischen Nieder- und Hochdruck interessant, um künstlich stressbedingte Blutdruckunterschiede zu simulieren. Unter höherem Scherstress kam es zu einer verstärkten Proteinexpression von E-Selektin und ICAM-1. Auch bei P-Selektin war ein Trend zu beobachten. VCAM-1 und ICAM-2 wiesen keine Veränderungen auf.

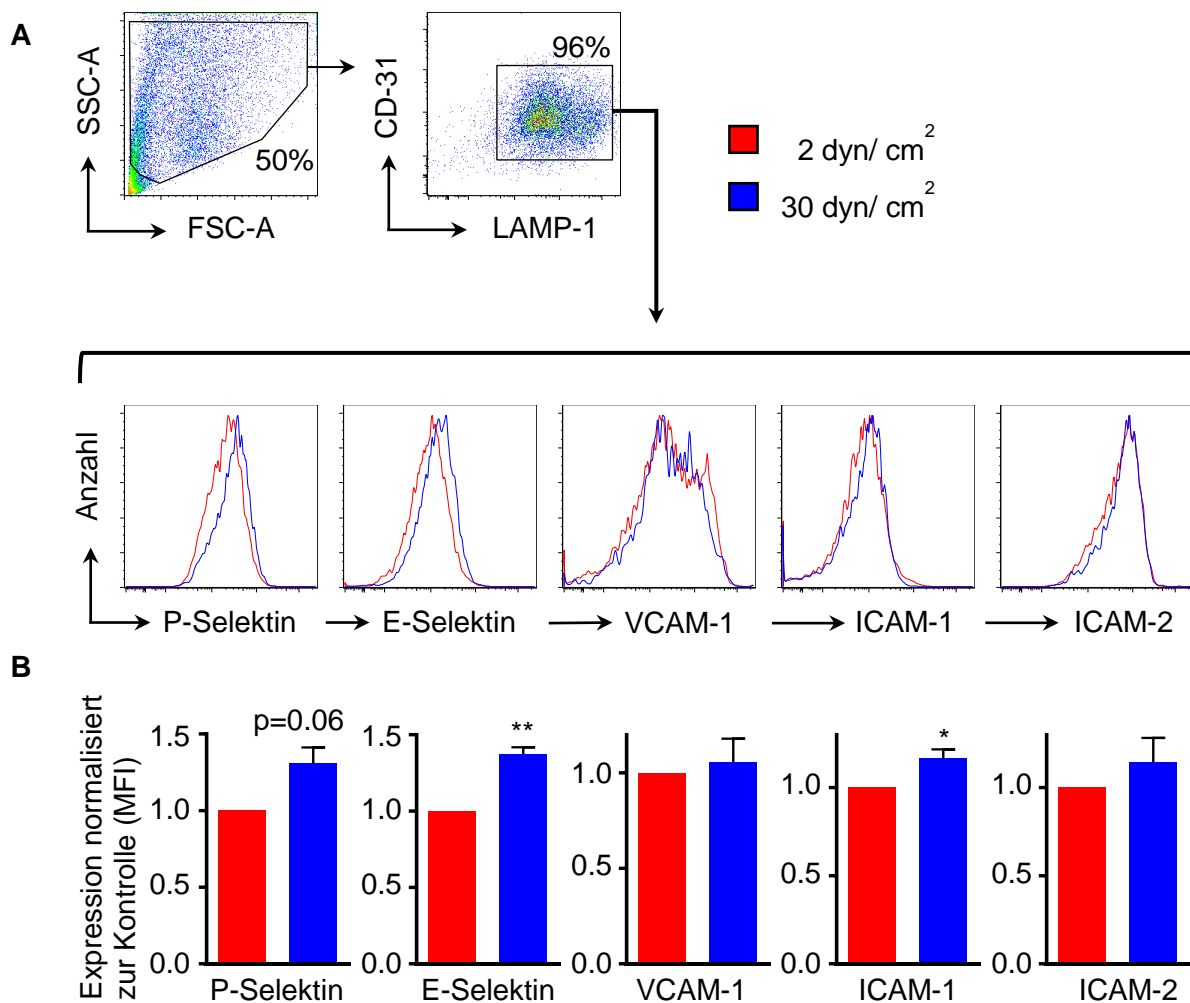


Abb. 25: Scherstress führt zu verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von mAoECs.

(A) Gating und Histogramm von Adhäsionsmolekülen auf mAoECs nach 2 bzw. 30 dyn/ cm² über 36 h. (B) Quantifizierung von Proteinexpression nach Scherstress. Es zeigt sich ein Anstieg der Expression in E-Selektin, ICAM-1 und eine Tendenz in P-Selektin. n=5:5. Dargestellt im Verhältnis zur Kontrolle als Mittelwert + SEM, analysiert mit *one-sample* T-Test, *p<0.05, **p<0.01.

5 Diskussion

Bei der KHK entstehen Plaques in den Koronarterien, welche klinische lange stumm bleiben können (Nallamothu et al., 2013). Kommt es allerdings zur Ruptur, ist mit schwerwiegenden oder gar tödlichen Folgen zu rechnen. Eine Plaqueruptur wird durch unterschiedliche Faktoren getriggert, wobei dem akuten Stress, der zu inflammatorischen Prozessen führt (Sager & Nahrendorf, 2016; Wirtz & von Kanel, 2017), eine besondere Bedeutung zukommt. Komplikationen entstehen typischerweise in Plaques mit einer erhöhten Leukozyten-Aufnahme, welche zur Plaque-Destabilisation beiträgt (Silvestre-Roig et al., 2014). Dies setzt eine enge Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel mittels Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen voraus. Welche Mechanismen auf zellulärer Ebene bei akutem Stress zu erhöhter Rekrutierung von Leukozyten in Plaques führen, ist noch nicht ausreichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, genauere Erkenntnisse zum Mechanismus der rapiden Verschlechterung der Atherosklerose unter Stress zu gewinnen. Dazu wurden sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Stressmodelle generiert, diese auf hormoneller Ebene analysiert und Endothelzellen auf ihre Expression von Zelladhäsionsmolekülen untersucht.

5.1 Hormonelle Reaktion auf akuten psychischen Stress

Die akute Stressreaktion wird hauptsächlich über Katecholamine und Glukokortikoide vermittelt (Abb. 3). Zirkulierende Neurohormone und lokales Noradrenalin direkt aus Synapsen in Endorganen führen u.a. zu einer Erhöhung des Blutdrucks, der Herzfrequenz und Kontraktionsfähigkeit (Tank & Lee Wong, 2015; Yaribeygi et al., 2017). Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin sowie dem Glukokortikoid Kortikosteron (Kapitel 4.1.1.) nach Stressexposition steht im Einklang mit der wissenschaftlich anerkannten Stressreaktion. Wir konnten eine lokale Erhöhung von Noradrenalin in der Aortenwand, nicht aber systemisch im Plasma nachweisen. Dies bestätigt frühere Befunde, dass hämodynamische und metabolischen Effekte von Noradrenalin überwiegend durch die lokale Freisetzung und nicht durch die, ohnehin nur geringe, systemische Zirkulation bedingt werden (Silverberg et al., 1978). Im Sinne der physiologischen Stressreaktion wurde der Anstieg von Adrenalin im Plasma ebenfalls von uns erwartet, zumal mit diesem Stressmodell in einem separat durchgeführten Experiment unserer Arbeitsgruppe ein Blutdruckanstieg beobachtet werden konnte (Hinterdobler et al., 2021). Auch der von uns beobachtete Anstieg von Kortikosteron wurde ebenfalls bereits in anderen Studien beobachtet (Dhabhar et al., 2000; Gong et al., 2015). Unser Tiermodell ist damit ein valides Instrument zur Simulation von akutem Stress, weil die erzeugten

hormonellen Effekte denen der menschlichen Stressreaktion entsprechen (Ulrich-Lai & Herman, 2009; Xu et al., 2020).

In der Noradrenalin-Biosynthese ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym die Tyrosin Hydroxylase (TH). Da Stressexposition eine verstärkte Sekretion von Noradrenalin bedingt, wurde für die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung (Kapitel 4.1.2) ein TH-Anstieg in der Tunica adventitia der Kohorte nach Stressexposition erwartet. Dies ließ sich immunhistochemisch allerdings nicht zeigen, wofür es unterschiedliche Erklärungsansätze gibt. Da das Endprodukt (Noradrenalin im ELISA) nachweisbar in gestressten Tieren erhöht war, liegt der ausbleibenden Signaldifferenz der Färbungen vermutlich ein methodisches Problem zugrunde. Störfaktoren sind in mehreren Schritten des Experiments möglich: Um einen fehlerhaften Antikörper auszuschließen, wurden bereits verschiedene Antikörper verglichen (Ergebnisse nicht gezeigt), aber dennoch konnten keine unterschiedlichen Signalstärken beobachtet werden. Daher liegt die Fehlerquelle am wahrscheinlichsten im Prozess der Bildaufnahme und v.a. im anschließenden Quantifizierungsprozess, da die Einstellungen der Immunfluoreszenzkamera nicht standardisierbar sind. Die Färbungen wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt und deswegen jeweils Präparate unterschiedlicher Tiere verwendet, um einen möglichst guten Querschnitt der Versuchstiere abzubilden. Allerdings wiesen die Präparatgruppen der einzelnen Färbetage unterschiedlich starke Intensitäten auf, weswegen zwischen Aufnahmen der einzelnen Färbetage Belichtungszeit, Helligkeit und Leuchtdichtenfaktor der Immunfluoreszenzkamera angepasst und verändert werden mussten. Innerhalb einer Gruppe konnten die Einstellungen beibehalten werden, trotzdem waren die Einstellungen deswegen uneinheitlich und damit störanfällig. Zusätzlich variierte die Fläche der Tunica adventitia von Tier zu Tier. Zwar wurde versucht, sich beim Einzeichnen der Fläche der Tunica adventitia in den Aufnahmen an Begrenzungen wie den glatten Muskelfasern der Tunica media zu orientieren, allerdings fiel auf, dass sich die Dicke der Tunica adventitia je nach Anatomie bzw. möglichen Beschädigung bei Organentnahme unterschied. Dies wurde versucht auszugleichen, indem eine standardisierte Tiefe eingezeichnet wurde, was aber nicht immer die tatsächliche Tunica adventitia abbildete. Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass mit der Auswertung der Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen lediglich ein zweidimensionaler Ausschnitt einer dreidimensionalen Struktur untersucht wird. Die einzelnen Aufnahmen könnten dadurch nicht repräsentativ genug sein und daher eine Erklärung geben, weshalb unsere Daten kein signifikantes Ergebnis hervorbringen. In unseren nachfolgenden Versuchen konnten wir eine Erhöhung der phosphorylierten Form (pTH im Western Blot) nachweisen. Diese pTH-Erhöhung (Kapitel 4.1.3) steht im Einklang mit der bei Sekretion zeitgleich gesteigerten Noradrenalin-Biosynthese. Die Phosphorylierung stellt dabei einen der Hauptmechanismen zur Kontrolle der Aktivität der TH dar (Dunkley & Dickson, 2019). Dies bekräftigt die

Vermutung eines methodischen Problems der vorherigen Färbung, da selbst bei Verwendung eines pTH Antikörpers (Ergebnisse nicht gezeigt) in den Immunfluoreszenz-Schnitten kein stärkeres Signal detektiert werden konnte.

5.2 Auswirkung der sympathischen Denervation

In Kapitel 4.2.1 wurden die Unterschiede der Hormonspiegel in denervierten bzw. scheinoperierten Tieren nach Stressexposition untersucht. Der fehlende Anstieg von Noradrenalin im Aortenbogen beweist die Wirksamkeit des experimentellen Modells der chirurgischen Denervation. Der Plasmaspiegel von Noradrenalin als auch von Kortikosteron war bei beiden Versuchsgruppen (Schein-OP *versus* chirurgische Denervation) auf demselben Niveau. Adrenalin allerdings weist bei den denervierten Tieren eine Erhöhung auf, die auf den ersten Blick nicht direkt nachvollziehbar ist. Noradrenalin und Adrenalin zählen beide zu den Stresshormonen, allerdings gibt es Unterschiede sowohl bei der Freisetzung als auch ihrer Effekte im Körper. Da beide Gruppen demselben Stress durch Restraint als auch Operation ausgesetzt waren, liegt die Vermutung nahe, dass die Entnahme und damit Verlust des oberen Halsganglion (SCG) ursächlich für diese Veränderung ist.

Sowohl das rechte als auch das linke SCG geben Fasern an den kardialen Plexus ab (Pather et al., 2003). Ein Teil dieses Plexus bildet ein Nervengeflecht, das entlang des Aortenbogens zieht (Kapa et al., 2016; Tanaka et al., 2007). Diese anatomische Tatsache bildet den Ansatz des Modells der chirurgischen Denervation. Es gibt in der Literatur unterschiedliche Angaben zum genauen Innervationsgebiet und es können zusätzlich interindividuelle Variationen auftreten (Wink et al., 2020). Dennoch konnten wir durch die Reduktion des Noradrenalin-Spiegels im Aortenbogen dessen Innervation durch das SCG bestätigen (Abb. 20). Neben dieser Funktion ist das SCG aber auch für die sympathische Innervation verschiedener anderer Bereiche einschließlich des Hypothalamus und der Hypophyse (Castrillon et al., 2001), der zerebralen Blutversorgung (Cassaglia et al., 2008) und des Herzmuskels (Ziegler et al., 2018) verantwortlich. Die chirurgische Entfernung des SCG führt demnach auch zu zahlreichen weiteren entsprechenden Funktionsausfällen wie Dysbalance in Blutzuckerspiegel und Insulinausschüttung (Garcia et al., 1988), Tag-/Nachtaktivität und Hormonausschüttung der Hypophyse und des Hypothalamus (Mul Fedele et al., 2017). Dementsprechend ist es gut vorstellbar, dass die denervierten Tiere bereits vor Durchlaufen des Stressmodells einen erhöhten Adrenalin-Spiegel aufwiesen, entweder kompensatorisch, um die ausgefallene Funktion des SCG auszugleichen, oder weil bereits eine erhöhte Sensibilität gegenüber äußeren Triggerfaktoren bestand. Diese Hypothese kann untersucht werden, indem man bei einer weiteren Kohorte das SCG entfernt und die Adrenalin-Spiegel zwischen nicht-gestressten und gestressten Tieren untersucht. Falls diese

Hormonspiegel dasselbe Niveau aufweisen ist eine weitere Überlegung, ob unter Stress ein Feedback-Mechanismus über den Gefäßtonus aktiviert wird. Bei ausfallender Aktivität von Noradrenalin könnte der Körper versuchen, die Blutdruckerhöhung durch systemische Freisetzung von Adrenalin zu bewirken. Gegen diese Überlegung spricht allerdings, dass nur ein begrenzter Abschnitt des Aortenbogens von der sympathischen Innervation abgetrennt war und vermutlich nicht zu einer generellen Blutdruckerniedrigung geführt hat. Allerdings sind durch Denervation auch Fasern des kardialen Plexus durchtrennt, welche direkt zum Herzen ziehen, Teile des Herzmuskels innervieren und dadurch Einfluss auf die muskuläre Funktion haben (Ziegler et al., 2018). Die abgeschwächte sympathische Innervation könnte das Herzzeitvolumen soweit beeinflussen, dass es zu einem systemischen Anstieg von Adrenalin kommt um diese Veränderungen auszugleichen. Nichtsdestotrotz führt die lokale Reduktion von Noradrenalin im Aortenbogen mittels sympathischer Denervation, unabhängig von einem systemischen Anstieg von Adrenalin, zu einer verminderten Leukozyten-Rekrutierung (Abb. 5). Dies unterstreicht die bedeutende Rolle von lokal freigesetztem Noradrenalin im Kontext von akutem Stress und Atherosklerose.

Der Immunfluoreszenz-Färbung der Denervations-Kohorte liegt eine andere Fragestellung zugrunde als der, die Stress und Kontrolle vergleicht. Der erwartete, aber fehlende Abfall des TH-Signals lässt mehrere Hypothesen aufkommen. Er kann durch dieselben methodischen Fehler wie in 5.1 beschrieben bedingt sein. Wie bereits erwähnt, wurden mehrere Aortenabschnitte verglichen, um spezifische anatomische Varianzen auszugleichen. Doch möglicher Weise inserieren in dem von uns untersuchten Areal zusätzlich Kollateralen anderer Nervenplexus oder Fasern anderer Ganglien (Wink et al., 2020), die das Ergebnis verfälschen. In einem weiter distal gelegenen und damit „sauberen“ Abschnitt könnte daher der Wegfall der Fasern des SCG deutlicher darstellbar sein. Ein neues Experiment könnte nicht mehr nur das Schneiden der Aortenwurzel sondern des gesamten Aortenbogens umfassen, aus dem die Noradrenalin-Spiegel gemessen wurden. Bei Auswahl eines neuen Abschnitts des Aortenbogens müsste darauf geachtet werden, dass dieser definiert und damit in unterschiedlichen Tieren vergleichbar ist. Man kann sich beispielsweise an einem Aortenbogen-Segment distal des Truncus brachiocephalicus orientieren.

Alternativ kann auch der Zeitraum zwischen Durchtrennung und Euthanasie zu kurz berechnet sein. Durch chirurgische Durchtrennung kommt es zur nervalen Degeneration. Diese erfolgt nicht sofort, sondern entwickelt sich über einen gewissen Zeitraum. In diesem weisen Nerven - trotz Durchtrennung - weiterhin Aktivität auf. Unser Versuch hat einen Zeitraum von 14 Tage zwischen Denervation und Euthanasie eingerechnet. Studien zeigen, dass eine Freisetzung des Inhalts von Nerven, einschließlich des Neurotransmitters Noradrenalin ca. 8- 12 h nach Ausschaltung des SCG beginnt und über 14-20 h anhält, bis die Degeneration der Nervenendigungen abgeschlossen ist (Garcia et al., 1988), was unser

Versuchsaufbau abgedeckt. Ob Enzyme, wie die TH in degenerierten Nerven über diesen Zeitraum hinweg erhalten bleiben können, ist unwahrscheinlich und im Sinne unserer Fragestellung irrelevant, da ihre Aktivität durch ausbleibende Produktion von Noradrenalin nachweislich eingestellt ist. Andere Studien hingegen wählen in diesem Kontext einen Zeitpunkt 4 Wochen nach Ausschaltung des SCG um mittels Verlust der TH in der Immunhistochemie erfolgreich die Methode zu bestätigen (Scheiermann et al., 2012). Ungeachtet dessen, führt eine Entnahme des SCG in unseren Experimenten bereits nach 14 Tagen zu einem signifikanten Abfall des lokalen Noradrenalin-Spiegels im Aortenbogen, was Ziel des Versuchs war und einen Funktionsverlust der Nerven bestätigt. Zusammenfassend ist es daher zwar empfehlenswert, den Versuchsaufbau anzupassen, indem der Zeitraum zur Erholung der Tiere verlängert wird, allerdings eher um die Wiedereinstellung der hormonellen Balance zu ermöglichen und diese auch zu kontrollieren bzw. zu quantifizieren, als um die definitive optisch darstellbare Degeneration der Nerven zu gewährleisten.

5.3 Phänotypische Veränderungen kultivierter Endothelzellen durch Stress

Merkmal vulnerabler Plaques ist ein hoher Gehalt an Leukozyten. Dafür bedarf es einer verstärkten Rekrutierung, für die die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf dem Endothel essentiell ist (Silvestre-Roig et al., 2014; Vestweber, 2015). Mit unseren Daten können wir zeigen, dass Noradrenalin stärker zur Stresshormon-induzierten Überexpression von Zelladhäsionsmolekülen beiträgt als Adrenalin oder Kortikosteron. Der im Vergleich zu den anderen Adhäsionsmolekülen geringe Anstieg von ICAM-2 wurde auch schon in früheren Versuchen beobachtet. Dort zeigte Inkubation von humanen Endothelzellen der Nabelschurvenen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF α bzw. IL-1 β sogar eine Reduktion von ICAM-2 um 50% (McLaughlin et al., 1998). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ICAM-2 eher in der basalen als der induzierten Leukozyten-Rekrutierung beteiligt ist (van Buul et al., 2007). Exposition mit Adrenalin führt nicht zu einer Aktivierung der Endothelzellen hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies weist auf Unterschiede in der zugrundeliegenden Aktivierung und/oder der Signalwege hin. Unter Inkubation der Endothelzellen der Mauseorta (mAoECs) mit dem Glukokortikoid Kortikosteron konnte eine erniedrigte Expression von ICAM-2 gezeigt werden. Die Tatsache, dass Glukokortikoide wie Kortikosteron als anti-inflammatorisches Hormon die Expression von Zelladhäsionsmolekülen verringern, findet sich auch in anderen Experimenten wieder. So führt Dexamethason, ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid, in Wildtyp-Mäusen zu geringerer Adhäsion von vorstimulierten Leukozyten (Gregory et al., 2009). Die Wirkung von Glukokortikoiden verläuft über den Glukokortikoidrezeptor, dessen Bindung eine Inhibition

des NF- κ B Signalweges bewirkt, wodurch es über mehrere anschließende Schritte unter anderem zur Reduktion von Zelladhäsionsmolekülen kommt (Zielinska et al., 2016). In weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurden dieselben Beobachtungen gemacht (Hinterdobler et al., 2021). Hier wurde die Hormoninkubation unter gleichzeitigem Scherstress durchgeführt. ICAM-2 ist selbst nach Inkubation mit Noradrenalin im Scherstress nicht signifikant erhöht. Adrenalin und Kortikosteron haben auch hier keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung der Endothelzellen hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen. Über welche Rezeptoren Katecholamine zur Expression von Adhäsionsmolekülen und zur Leukozyten-Rekrutierung beitragen, ist noch nicht ausreichend geklärt (Ince et al., 2018). Der Phänotyp von Endothelzellen ist heterogen und variiert zwischen unterschiedlichen Organen, verschiedenen Segmenten des Gefäßbetts im selben Organ und sogar zwischen Endothelzellen desselben Organs und Gefäßstyps (Aird, 2012). Daher ist es nachvollziehbar, dass die Aktivierung der gleichen Adrenorezeptoren auf Endothelzellen verschiedenen Gewebes zu unterschiedlich starker Expression von Adhäsionsmolekülen führt und deutet auf gewebespezifische Signalwege hin. Bei der Maus führt die Aktivierung von β -Adrenorezeptoren zur Hochregulierung von ICAM-1 in Endothelzellen aus dem Skelettmuskel und VCAM-1, E- und P-Selektin bei Endothelzellen im Knochenmark (Scheiermann et al., 2012). Versuche unserer Arbeitsgruppe hingegen deuten auf eine Aktivierung der α -Adrenorezeptoren hin. Nach Inkubation von mAoECs mit entweder einem unselektiven α -Blocker oder unselektiven β -Blocker und zusätzlicher repetitiver Stimulation durch Noradrenalin wurde eine verringerte Adhäsion von Leukozyten auf Endothelzellen nach Inkubation mit dem α -Blocker beobachtet (Hinterdobler et al., 2021). Unsere Befunde, dass hauptsächlich Noradrenalin in der Stresssituation zu einer Veränderung führt, zeigen sich auch in anderen Stressmodellen. Im chronischen Stress aktiviert Noradrenalin über β 3-Adrenorezeptoren hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark zur erhöhter Proliferation (Heidt et al., 2014). Auch in Haarfollikeln führt Stress, vermittelt über lokales Noradrenalin zur Erniedrigung der Melanozytenstammzellen und so zum Ergrauen der Haare (Zhang et al., 2020). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung von Noradrenalin in der akuten Kampf-oder-Flucht-Reaktion, deren schnelle Komponente durch Katecholamine ausgetragen wird (Tank & Lee Wong, 2015). Interessant wäre allerdings weiterführend zu untersuchen, ob die systemisch erhöhten Hormone Adrenalin und Kortikosteron einen zusätzlichen Effekt auf Leukozyten haben und deren Adhäsion verstärken.

Im Zuge der Kampf-oder-Flucht-Reaktion kommt es, vermittelt über Stresshormone, im ganzen Körper zu einem Blutdruckanstieg (Yaribeygi et al., 2017). Veränderungen des Blutflusses führen neben anderen Faktoren zur Aktivierung des Endothels. In der Literatur

werden zum Thema Scherstress und endotheliale Aktivierung hauptsächlich die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin untersucht und deren Erhöhung als Marker aktivierten Endothels definiert (Chiu & Chien, 2011; Liao, 2013). Unsere Ergebnisse zum Vergleich des Effekts von Scherstress im Nieder- (2 dyn/ cm^2) und Hochdrucksystem (30 dyn/ cm^2) zeigen eine Adhäsionsmolekül-Erhöhung von P- und E-Selektin, sowie von ICAM-1, nicht jedoch von VCAM-1 und ICAM-2. Der nicht-signifikante Anstieg von ICAM-2 passt damit ebenfalls zu der bereits besprochenen Annahme, dass dieses Adhäsionsmolekül eher für die basale als die induzierte Rekrutierung wichtig ist. Der fehlende signifikante Anstieg von VCAM-1 könnte einerseits durch die geringe Fallzahl ($n=5$) zu erklären sein. Andererseits wurde dasselbe Phänomen (Anstieg von ICAM-1, P- und E-Selektin nicht aber VCAM-1) in einer Studie beobachtet, die lösliche Adhäsionsmoleküle, deren Wert mit der Expression auf Zelloberfläche korreliert, in Patienten mit Hypertension im Vergleich zu Normaldruck beobachtet (Shalia et al., 2009). Dabei wurde Hypertension ab einem Blutdruck von $> 135/85 \text{ mmHg}$ definiert und keine weitere Stadien-Einteilung vorgenommen. Eine weitere Erklärung in unserem Experiment könnte eine zu niedrig angelegte Scherspannung sein. Im Menschen reicht die Scherspannung im arteriellen System von $10-70 \text{ dyn/ cm}^2$. In der normalen Mauseorta kann die Scherspannung *in vivo* sogar bis zu einer 10er Potenz höher sein (Chiu & Chien, 2011). Trotzdem werden in den meisten *in vitro*-Versuchsmodellen die Werte der menschlichen Scherspannung verwendet (Hwang et al., 2003; Sorescu et al., 2004), mit dem Hintergrund, dass selbst bei geringer absoluter Spannung die relativen Unterschiede in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen vergleichbar ist (Suo et al., 2007). Auch während des Aufbaus unseres Experiments haben wir in Vorversuchen bereits bei einer Spannung von 60 dyn/ cm^2 ein Ablösen der Zellen beobachtet und so unser Maximum auf 30 dyn/ cm^2 gesetzt. Obwohl murine Endothelzellen in natürlicher Umgebung viel höheren Scherstress ausgesetzt sind, erklären wir uns das Ablösen dadurch, dass sie *in vivo* wesentlich fester im Gefäßbett verankert sind. In unseren *in vitro*-Bedingungen lässt sich diese Adhärenz nicht aufbauen. Auf dennoch zu niedrige Scherspannung deutet hin, dass langanhaltender niedriger Scherstress (in dieser Studie bei 12 dyn/ cm^2) atheroprotektiv wirken kann (Zhou et al., 2014) und in diesem Sinne das Endothel nicht zur verstärkten Expression aktiviert. Möglicherweise wird VCAM-1 also im Vergleich zu den anderen Adhäsionsmolekülen erst bei einer höheren Spannung aktiviert. Kontrovers dazu stehen die äußerst interessanten Ergebnisse eines *in vivo*-Mausversuchs, die in Arealen von niedrigem Scherstress sogar eine stärkere Erhöhung der Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 beobachten, als in Bereichen von hohem Scherstress (Suo et al., 2007). Daraus stellen die Autoren die Hypothese auf, dass die Aktivierung der Adhäsionsmolekül-Expression mehr durch wechselnde Stärke des Scherstress getriggert wird als durch die absolute Stärke, deren Bedeutung damit in den Hintergrund rutscht. Zu dieser Hypothese wiederum passt,

dass durch Exposition mit turbulentem Fluss auf Genexpressionsebene ICAM-1 und E-Selektin hochreguliert werden, nicht jedoch VCAM-1 (Chiu 2003). Diese verschiedenen Erkenntnisse spiegeln die große Variabilität von Scherstress wider und zeigen, dass unterschiedliche Scherstress-Raten wiederum unterschiedliche Effekte auf das Endothel haben. So ist nicht nur der hohe Scherstress pathogen, denn auch niedriger Scherstress kann das Endothel aktivieren und zur Makrophagen-Akkumulation führen. Hoher Scherstress triggert eher in bereits vulnerablen Plaques eine Ruptur (Seneviratne et al., 2013). Allerdings sind die verschiedenen Signalwege und Einflussfaktoren noch immer ungeklärt und ein spannendes Thema für weitergehende Studien. Mögliche Variablen weiterer Experimente können unterschiedliche Flussraten und damit veränderte Scherspannung (Nieder-, Mittel-, oder Hochdruck) beinhalten, als auch unterschiedliche Flussarten (laminar, pulsatil, turbulent). Besonders der Vergleich, welche Variablen in der Aktivierung eine entscheidende Rolle spielen, ist interessant zu untersuchen.

5.4 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend beantwortet diese Arbeit große Teile der in der Einleitung formulierten Fragestellungen. Unser Stressmodell erzeugt in der Maus dieselbe physiologische Stressreaktion, wie sie auch im Menschen bekannt ist. Das zeigt, dass der Signalweg der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA), der Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (SAM) und das sympathische Nervensystem (SNS) aktiviert werden und es zur Erhöhung von Noradrenalin, Adrenalin und Kortikosteron kommt. Auch die Hypothese, dass die lokale sympathische Innervation des Aortenbogens durch das SNS und dessen chirurgische Durchtrennung gezielt unterbunden werden kann, wurde bestätigt und damit die wichtige Rolle, die lokal freigesetztes Noradrenalin in der Rekrutierung von Leukozyten hat, bestätigt. Allerdings konnte in dieser Arbeit nach Stress weder erhöhte Synthesestufen von Noradrenalin, noch ein Wegfall dieser nach zusätzlicher Denervation immunhistochemisch in den Nervenendigungen der Tunica adventitia nachgewiesen werden. Hormonelle Stressbedingungen *in vitro* bewirken auf Endothelzellen eine verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Zusammen mit den *in vivo*-Befunden unterstreicht dies den Ansatz, dass hauptsächlich Noradrenalin für die Endothel-Aktivierung verantwortlich ist. Verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen werden auch durch erhöhten Scherstress beobachtet. Die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen führen damit alle gemeinsam zur Aktivierung des Endothels, welches in enger Wechselbeziehung mit der endothelialen Dysfunktion steht, und damit gemeinsam eine Schlüsselfunktion sowohl in der Entstehung der Atherosklerose als auch im akuten Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen spielen.

Ausblickend können diese drei Stressmodelle herangezogen werden, um die erhöhte Herzinfarktrate durch akuten Stress genauer zu analysieren. In diesem Ansatz könnten auch weitere vasoaktive Substanzen die bei einem stressinduzierten akuten Koronarsyndrom bereits in anderen Studien (Wilbert-Lampen et al., 2010) nachweislich erhöhte sind, pathophysiologisch untersucht werden. Auf welcher Ebene sich Endothel-stabilisierende Effekte, hervorgerufen zum Beispiel durch Medikamente wie Statine (Altun et al., 2014) oder Lebensstil wie körperliches Training (Kadoglou et al., 2013) abbilden, wäre ein weiterer interessanter Ansatz anhand dieser Modelle zu verfolgen.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass hinter der akuten Plaque-Destabilisation komplexe Vorgänge stehen. Die genaue Identifizierung und Abgrenzung einzelner Signalwege ist kompliziert und Bedarf weiterhin intensiver Forschung, vor allem ob und welche Unterschiede sich dabei zwischen physiologischem Gefäßendothel und Plaque-Endothel ergeben. Zweifellos spielen dabei die hier untersuchten Signalwege eine zentrale Rolle und können helfen, die klinischen Beobachtungen besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- Aird, W. C. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1), a006429. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>
- Albertini, R., Moratti, R., & De Luca, G. (2002). Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. *Curr Mol Med*, 2(6), 579-592. <https://doi.org/10.2174/1566524023362177>
- Altun, I., Oz, F., Arkaya, S. C., Altun, I., Bilge, A. K., Umman, B., & Turkoglu, U. M. (2014). Effect of statins on endothelial function in patients with acute coronary syndrome: a prospective study using adhesion molecules and flow-mediated dilatation. *J Clin Med Res*, 6(5), 354-361. <https://doi.org/10.14740/jocmr1863w>
- Ambrose, J. A., & Singh, M. (2015). Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000Prime Rep*, 7, 08. <https://doi.org/10.12703/p7-08>
- Bernick, S., & Davis, C. (2014). The economic cost of cardiovascular disease from 2014–2020 in six European economies. *Centre for Economics and Business Research*.
- Burg, M. M., & Soufer, R. (2014). Psychological Stress and Induced Ischemic Syndromes. *Curr Cardiovasc Risk Rep*, 8(4), 377. <https://doi.org/10.1007/s12170-014-0377-6>
- Busch, M., & Kuhnert, R. (2017). 12-Monats-Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit in Deutschland. *Journal of Health Monitoring*, 2(1), 64–69.
- Buynitsky, T., & Mostofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(7), 1089-1098. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.004>
- Cassaglia, P. A., Griffiths, R. I., & Walker, A. M. (2008). Sympathetic nerve activity in the superior cervical ganglia increases in response to imposed increases in arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(4), R1255-1261. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00332.2007>
- Castrillon, P. O., Cardinali, D. P., Pazo, D., Cutrera, R. A., & Esquifino, A. I. (2001). Effect of superior cervical ganglionectomy on 24-h variations in hormone secretion from the anterior hypophysis and in hypothalamic monoamine turnover during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats. *J Neuroendocrinol*, 13(3), 288-295. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00627.x>
- Chiu, J. J., & Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*, 91(1), 327-387. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009>

- Chu, B., Marwaha, K., & Ayers, D. (2020). Physiology, Stress Reaction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing LLC. <https://www-ncbi-nlm-nih.gov.eaccess.ub.tum.de/books/NBK541120/>
- Dhabhar, F. S., Satoskar, A. R., Bluethmann, H., David, J. R., & McEwen, B. S. (2000). Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2846-2851. <https://doi.org/10.1073/pnas.050569397>
- Dimsdale, J. E. (2008). Psychological stress and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 51(13), 1237-1246. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.12.024>
- Dunkley, P. R., Bobrovskaya, L., Graham, M. E., von Nagy-Felsobuki, E. I., & Dickson, P. W. (2004). Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem*, 91(5), 1025-1043. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02797.x>
- Dunkley, P. R., & Dickson, P. W. (2019). Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. *J Neurochem*, 149(6), 706-728. <https://doi.org/10.1111/jnc.14675>
- Dutta, P., & Nahrendorf, M. (2015). Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(5), 1066-1070. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.114.304652>
- Finegold, J. A., Asaria, P., & Francis, D. P. (2013). Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol*, 168(2), 934-945. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.10.046>
- Flatmark, T. (2000). Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand*, 168(1), 1-17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00596.x>
- Francula-Zaninovic, S., & Nola, I. A. (2018). Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Curr Cardiol Rev*, 14(3), 153-163. <https://doi.org/10.2174/1573403x14666180222102312>
- Frodermann, V., Rohde, D., Courties, G., Severe, N., Schloss, M. J., Amatullah, H., . . . Nahrendorf, M. (2019). Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*, 25(11), 1761-1771. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0633-x>
- Garcia, J. B., Romeo, H. E., Basabe, J. C., & Cardinali, D. P. (1988). Effect of superior cervical ganglionectomy on insulin release by murine pancreas slices. *J Auton Nerv Syst*, 22(2), 159-165. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(88\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0165-1838(88)90089-6)
- Ghosh, A., Gao, L., Thakur, A., Siu, P. M., & Lai, C. W. K. (2017). Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci*, 24(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0357-5>

- Gimbrone, M. A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, 118(4), 620-636. <https://doi.org/10.1161/circresaha.115.306301>
- Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 243-251. <https://doi.org/10.1038/nri1571>
- Glavin, G. B., Pare, W. P., Sandbak, T., Bakke, H. K., & Murison, R. (1994). Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*, 18(2), 223-249. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)90027-2)
- Gong, S., Miao, Y. L., Jiao, G. Z., Sun, M. J., Li, H., Lin, J., . . . Tan, J. H. (2015). Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One*, 10(2), e0117503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117503>
- Gosswald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., & Busch, M. A. (2013). Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 650-655. <https://doi.org/10.1007/s00103-013-1666-9> (Pravalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1).)
- Gregory, J. L., Hall, P., Leech, M., Morand, E. F., & Hickey, M. J. (2009). Independent roles of macrophage migration inhibitory factor and endogenous, but not exogenous glucocorticoids in regulating leukocyte trafficking. *Microcirculation*, 16(8), 735-748. <https://doi.org/10.3109/10739680903210421>
- Grouzmann, E., Cavadas, C., Grand, D., Moratel, M., Aubert, J. F., Brunner, H. R., & Mazzolai, L. (2003). Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pflugers Arch*, 447(2), 254-258. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1140-x>
- Hadi, H. A., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 1(3), 183-198.
- Hajar, R. (2017). Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views*, 18(3), 109-114. https://doi.org/10.4103/heartviews.Heartviews_106_17
- Heidt, T., Sager, H. B., Courties, G., Dutta, P., Iwamoto, Y., Zaltsman, A., . . . Nahrendorf, M. (2014). Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20(7), 754-758. <https://doi.org/10.1038/nm.3589>
- Hinterdobler, J., Schott, S., Jin, H., Meesmann, A., Steinsiek, A. L., Zimmermann, A. S., . . . Sager, H. B. (2021). Acute mental stress drives vascular inflammation

- and promotes plaque destabilization in mouse atherosclerosis. *Eur Heart J*, 42(39), 4077-4088. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab371>
- Hwang, J., Saha, A., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., McNally, J. S., Holland, S. M., . . . Jo, H. (2003). Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J Biol Chem*, 278(47), 47291-47298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305150200>
- Ince, L. M., Weber, J., & Scheiermann, C. (2018). Control of Leukocyte Trafficking by Stress-Associated Hormones. *Front Immunol*, 9, 3143. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03143>
- Jackson, A. O., Regine, M. A., Subrata, C., & Long, S. (2018). Molecular mechanisms and genetic regulation in atherosclerosis. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 21, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2018.09.006>
- Kadoglou, N. P., Moustardas, P., Kapelouzou, A., Katsimpoulas, M., Giagini, A., Dede, E., . . . Liapis, C. D. (2013). The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. *Eur J Histochem*, 57(1), e3. <https://doi.org/10.4081/ejh.2013.e3>
- Kapa, S., DeSimone, C. V., & Asirvatham, S. J. (2016). Innervation of the heart: An invisible grid within a black box. *Trends Cardiovasc Med*, 26(3), 245-257. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.07.001>
- Kirchhof, P., Breithardt, G., & Eckardt, L. (2006). Primary prevention of sudden cardiac death. *Heart*, 92(12), 1873-1878. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.087957>
- Kivimaki, M., & Steptoe, A. (2018). Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 15(4), 215-229. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.189>
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Li, T., Li, C., Zhang, C. Y., & Zhao, J. (2015). Effect of accutase or trypsin dissociation on the apoptosis of human striatum-derived neural stem cells. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 37(2), 185-194. <https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.2015.02.009>
- Li, Y., C, G. Z., Wang, X. H., & Liu, D. H. (2016). Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(18), 3863-3867.
- Liao, J. K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest*, 123(2), 540-541. <https://doi.org/10.1172/jci66843>
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317-325. <https://doi.org/10.1038/nature10146>

- McAlpine, C. S., Kiss, M. G., Rattik, S., He, S., Vassalli, A., Valet, C., . . . Swirski, F. K. (2019). Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis. *Nature*, *566*(7744), 383-387. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0948-2>
- McEver, R. P. (2015). Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, *107*(3), 331-339. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv154>
- McLaughlin, F., Hayes, B. P., Horgan, C. M., Beesley, J. E., Campbell, C. J., & Randi, A. M. (1998). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 expression on the endothelium. *Cell Adhes Commun*, *6*(5), 381-400. <https://doi.org/10.3109/15419069809109147>
- Meeuwssen, J. A. L., de Vries, J. J., van Duijvenvoorde, A., van der Velden, S., van der Laan, S. W., van Koeverden, I. D., . . . de Jager, S. C. A. (2019). Circulating CD14(+)CD16(-) classical monocytes do not associate with a vulnerable plaque phenotype, and do not predict secondary events in severe atherosclerotic patients. *J Mol Cell Cardiol*, *127*, 260-269. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.01.002>
- Moore, K. J., & Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, *145*(3), 341-355. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>
- Mul Fedele, M. L., Galiana, M. D., Golombek, D. A., Munoz, E. M., & Plano, S. A. (2017). Alterations in Metabolism and Diurnal Rhythms following Bilateral Surgical Removal of the Superior Cervical Ganglia in Rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *8*, 370. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00370>
- Nabel, E. G., & Braunwald, E. (2012). A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*, *366*(1), 54-63. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1112570>
- Nallamothu, B. K., Spertus, J. A., Lansky, A. J., Cohen, D. J., Jones, P. G., Kureshi, F., . . . Krumholz, H. M. (2013). Comparison of clinical interpretation with visual assessment and quantitative coronary angiography in patients undergoing percutaneous coronary intervention in contemporary practice: the Assessing Angiography (A2) project. *Circulation*, *127*(17), 1793-1800. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.113.001952>
- Narasimhan, P. B., Marcovecchio, P., Hamers, A. A. J., & Hedrick, C. C. (2019). Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*, *37*, 439-456. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053119>
- Nielsen, L. B. (1996). Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *123*(1-2), 1-15. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(96\)05802-9](https://doi.org/10.1016/0021-9150(96)05802-9)

- Pather, N., Partab, P., Singh, B., & Satyapal, K. S. (2003). The sympathetic contributions to the cardiac plexus. *Surg Radiol Anat*, 25(3-4), 210-215. <https://doi.org/10.1007/s00276-003-0113-2>
- Reimann, M., Qin, N., Gruber, M., Bornstein, S. R., Kirschbaum, C., Ziemssen, T., & Eisenhofer, G. (2017). Adrenal medullary dysfunction as a feature of obesity. *Int J Obes (Lond)*, 41(5), 714-721. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.36>
- Sager, H. B., & Nahrendorf, M. (2016). Inflammation: a trigger for acute coronary syndrome. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 60(3), 185-193.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J. E., Zhang, D., . . . Frenette, P. S. (2012). Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 37(2), 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.021>
- Schloss, M. J., Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2020). Modifiable Cardiovascular Risk, Hematopoiesis, and Innate Immunity. *Circ Res*, 126(9), 1242-1259. <https://doi.org/10.1161/circresaha.120.315936>
- Schulz, C., Eisenhofer, G., & Lehnert, H. (2004). Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Front Horm Res*, 31, 1-25. <https://doi.org/10.1159/000074656>
- Seneviratne, A., Hulsmans, M., Holvoet, P., & Monaco, C. (2013). Biomechanical factors and macrophages in plaque stability. *Cardiovasc Res*, 99(2), 284-293. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt097>
- Shalia, K. K., Mashru, M. R., Vasvani, J. B., Mokal, R. A., Mithbawkar, S. M., & Thakur, P. K. (2009). Circulating levels of cell adhesion molecules in hypertension. *Indian J Clin Biochem*, 24(4), 388-397. <https://doi.org/10.1007/s12291-009-0070-6>
- Silverberg, A. B., Shah, S. D., Haymond, M. W., & Cryer, P. E. (1978). Norepinephrine: hormone and neurotransmitter in man. *Am J Physiol*, 234(3), E252-256. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1978.234.3.E252>
- Silvestre-Roig, C., de Winther, M. P., Weber, C., Daemen, M. J., Lutgens, E., & Soehnlein, O. (2014). Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res*, 114(1), 214-226. <https://doi.org/10.1161/circresaha.114.302355>
- Singh, R. B., Mengi, S. A., Xu, Y. J., Arneja, A. S., & Dhalla, N. S. (2002). Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*, 7(1), 40-53.
- Sorescu, G. P., Song, H., Tressel, S. L., Hwang, J., Dikalov, S., Smith, D. A., . . . Jo, H. (2004). Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res*, 95(8), 773-779. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000145728.22878.45>

- Statistisches Bundesamt (Destatis). (2020a). *Häufigste Todesursachen 2017*. Statistisches Bundesamt (Destatis). Retrieved April from https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html (03.04.2020)
- Statistisches Bundesamt (Destatis). (2020b). *Todesursachen nach Krankheiten 2017*. Retrieved April from https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html (03.04.2020)
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., . . . Frid, M. G. (2013). The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol*, 75, 23-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>
- Stephens, A., & Kivimaki, M. (2012). Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 9(6), 360-370. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.45>
- Suo, J., Ferrara, D. E., Sorescu, D., Gulberg, R. E., Taylor, W. R., & Giddens, D. P. (2007). Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(2), 346-351. <https://doi.org/10.1161/01.Atv.0000253492.45717.46>
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, 117(1), 195-205. <https://doi.org/10.1172/jci29950>
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*, 339(6116), 161-166. <https://doi.org/10.1126/science.1230719>
- Tanaka, A., Tanaka, S., Miyamoto, K., Yi, S. Q., & Nakatani, T. (2007). Gross anatomical study of the sympathetic cardiac nerves in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Anat Rec (Hoboken)*, 290(5), 468-476. <https://doi.org/10.1002/ar.20510>
- Tank, A. W., & Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol*, 5(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C. P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S. E., . . . Vardas, P. (2020). European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J*, 41(1), 12-85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>
- Toth, P. P. (2008). Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *Int J Clin Pract*, 62(8), 1246-1254. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2008.01804.x>
- Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., & Nichols, M. (2016). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*, 37(42), 3232-3245. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw334>

- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10(6), 397-409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Vaccarino, V., Sullivan, S., Hammadah, M., Wilmot, K., Al Mheid, I., Ramadan, R., . . . Raggi, P. (2018). Mental Stress-Induced-Myocardial Ischemia in Young Patients With Recent Myocardial Infarction: Sex Differences and Mechanisms. *Circulation*, 137(8), 794-805. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030849>
- van Buul, J. D., Kanters, E., & Hordijk, P. L. (2007). Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(9), 1870-1876. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.145821>
- van der Heijden, C., Groh, L., Keating, S. T., Kaffa, C., Noz, M. P., Kersten, S., . . . Riksen, N. P. (2020). Catecholamines Induce Trained Immunity in Monocytes In Vitro and In Vivo. *Circ Res*, 127(2), 269-283. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315800>
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*, 15(11), 692-704. <https://doi.org/10.1038/nri3908>
- von Kanel, R. (2015). ACUTE MENTAL STRESS AND HEMOSTASIS: WHEN PHYSIOLOGY BECOMES VASCULAR HARM. *Thromb Res*, 135(Suppl 1), S52-s55. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(15\)50444-1](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(15)50444-1)
- Wilbert-Lampen, U., Nickel, T., Leistner, D., Güthlin, D., Matis, T., Völker, C., . . . Steinbeck, G. (2010). Modified serum profiles of inflammatory and vasoconstrictive factors in patients with emotional stress-induced acute coronary syndrome during World Cup Soccer 2006. *J Am Coll Cardiol*, 55(7), 637-642. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.07.073>
- Wink, J., van Delft, R., Notenboom, R. G. E., Wouters, P. F., DeRuiter, M. C., Plevier, J. W. M., & Jongbloed, M. R. M. (2020). Human adult cardiac autonomic innervation: Controversies in anatomical knowledge and relevance for cardiac neuromodulation. *Auton Neurosci*, 227, 102674. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102674>
- Wirtz, P. H., & von Kanel, R. (2017). Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease. *Curr Cardiol Rep*, 19(11), 111. <https://doi.org/10.1007/s11886-017-0919-x>
- World Health Organization. (2017). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (21.02.2020)
- Wu, M. Y., Li, C. J., Hou, M. F., & Chu, P. Y. (2017). New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102034>

- Xu, C., Lee, S. K., Zhang, D., & Frenette, P. S. (2020). The Gut Microbiome Regulates Psychological-Stress-Induced Inflammation. *Immunity*, 53(2), 417-428.e414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.025>
- Yaribeygi, H., Panahi, Y., Sahraei, H., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2017). The impact of stress on body function: A review. *Excli j*, 16, 1057-1072. <https://doi.org/10.17179/excli2017-480>
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., . . . Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364(9438), 937-952. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17018-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17018-9)
- Zhang, B., Ma, S., Rachmin, I., He, M., Baral, P., Choi, S., . . . Hsu, Y. C. (2020). Hyperactivation of sympathetic nerves drives depletion of melanocyte stem cells. *Nature*, 577(7792), 676-681. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1935-3>
- Zhou, J., Li, Y. S., & Chien, S. (2014). Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(10), 2191-2198. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.114.303422>
- Ziegler, K. A., Ahles, A., Wille, T., Kerler, J., Ramanujam, D., & Engelhardt, S. (2018). Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*, 114(2), 291-299. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx227>
- Zielinska, K. A., Van Moortel, L., Opdenakker, G., De Bosscher, K., & Van den Steen, P. E. (2016). Endothelial Response to Glucocorticoids in Inflammatory Diseases. *Front Immunol*, 7, 592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00592>

Anhang

Danksagung

Herr Prof. Dr. Hendrik Sager danke ich für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Seine herzliche und unkomplizierte Art, gepaart mit seiner fachlichen Kompetenz und Erfahrung hat es sehr einfach gemacht, mich in seiner Arbeitsgruppe wohlfühlen zu lassen.

Frau Dr. Julia Hinterdobler danke ich für die außerordentlich gute Betreuung während meiner Promotion. Ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und fachliche Kompetenz haben in hohem Maße dazu beigetragen, mein Verständnis für kardiovaskuläre Inflammation und experimentelles Arbeiten in einer sehr freundschaftlichen Atmosphäre zu fördern.

Dr. Julia Werner danke ich für das geduldige und einfühlsame Training im Umgang mit den Versuchstieren.

Dr. Jana Wobst, Tan An Dang, Carina Mauersberger und dem ganzen Team der Abteilung Erwachsenen-Kardiologie danke ich für die unzähligen Hinweise und Anleitungen bei der Durchführung meiner Experimente.

Chien-Sin Chen danke ich für die Durchführung der chirurgischen Denervation.

Außerdem danke ich allen Arbeitskollegen und Doktoranden, die meine Zeit im Labor sehr bereichert haben.

Diese Promotionsarbeit entstand an der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen am Deutschen Herzzentrum München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Heribert Schunkert. Ich danke ihm für diese Möglichkeit.