

6 Diskussion

6.1 Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf die Zusammensetzung und die funktionelle Effektorkapazität des peripher zirkulierenden T-Zell-Pools

Es war das Hauptziel der vorliegenden Studie, einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, ob akuter psychischer Stress beim Menschen zu einer selektiven Umverteilung von bestimmten T-Zell-Subpopulationen in diejenigen Kompartimente führt, in denen sie sich am effektivsten an einer Immunreaktion beteiligen können, und somit Funktionen der adaptiven Immunität unter akutem Stress potentiell verstärkt werden.

Zur Erzeugung einer psychischen Stresssituation wurde ein standardisierter mentaler Belastungstest eingesetzt, bei dessen Durchführung die Probanden unter Zeitdruck Aufgaben am Computer zu bewältigen hatten. Um eine daraus resultierende psychophysiologische Stressreaktion zu bestätigen, wurden die Veränderung des Zustandsärgers bestimmt und physiologische Parameter wie Herzfrequenz und Blutdruck gemessen.

Zur Überprüfung von kurzfristigen stressinduzierten immunologischen Veränderungen wurde den Probanden zu drei Zeitpunkten Blut abgenommen. In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob unter akutem Stress die Zusammensetzung der peripheren Leukozyten und insbesondere des zirkulierenden T-Zell-Pools beeinflusst wird. Anschließend wurde überprüft, ob Veränderungen in der Zusammensetzung der untersuchten Zellpopulationen auch unmittelbare funktionelle Konsequenzen für das Effektorpotential des peripheren T-Lymphozyten-Pools haben.

6.1.1 Psychologische Reagibilität

Um zu überprüfen, ob der eingesetzte Laborstressor eine psychische Belastung für die Probanden darstellte, wurde ein standardisierter Fragebogen zur Erfassung des subjektiv empfundenen Zustandsärgers eingesetzt. Die Versuchspersonen füllten den Teil 1 des STAXI jeweils im Anschluss an die Ruhephase 1, die Belastungsphase und die Erholungsphase aus. Im Versuchsverlauf zeigen sich signifikante Änderungen über die drei Versuchsphasen. Dabei kam es zu einem Anstieg der subjektiv empfundenen Ärgerlichkeit von der Ruhephase 1 zur Belastungsphase. Im weiteren Verlauf kam es nach der Erholungsphase wiederum zu einem

Rückgang auf das Niveau der Basalwerte. Somit konnte eine akute Erhöhung der psychologischen Anspannung unter der Belastungssituation nachgewiesen werden.

Der Belastungstest sollte außerdem derart gestaltet sein, dass sich der von den Probanden empfundene kurzfristige psychologische Stress in einer messbaren physiologischen Aktivierung widerspiegeln würde.

6.1.2 Physiologische Reagibilität

Um zu überprüfen, ob die erhöhte subjektive Anspannung tatsächlich von einer physiologisch messbaren Reaktion begleitet war, wurden bei allen Probanden die kardiovaskulären Parameter Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Blutdruck bestimmt. Die Messungen erfolgten während der Ruhephase 1 (prä), der Belastungsphase (Stress) und der Erholungsphase (post) jeweils in 1-Minuten-Abständen über 5-Minuten-Intervalle. Die Messergebnisse wurden anschließend über die Messphasen gemittelt.

Bezüglich der physiologischen Parameter zeigte sich in der Gesamtheit der Stichprobe ein unter der psychischen Belastungssituation im Vergleich zu den Basalwerten stark signifikanter Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks, sowohl systolisch als auch diastolisch. Kurze Zeit nach Beendigung des experimentellen Laborstressors blieb lediglich der diastolische Blutdruck im Vergleich zu den Basalwerten signifikant erhöht, während sowohl der systolische Blutdruck als auch die Herzfrequenz innerhalb weniger Minuten wieder auf das Ausgangsniveau zurückgingen.

Das Ziel, durch den experimentellen Stressor eine akute psychische Stresssituation zu erzeugen, die von den Probanden als subjektiv belastend wahrgenommen wurde und gleichzeitig eine physiologische Reaktion induzierte, konnte somit erreicht werden.

6.1.3 Immunologische Variablen

Weiterhin wurde untersucht, ob der durch den experimentellen Laborstressor erzeugte und durch erhöhte Ärgerlichkeit sowie verstärkte kardiovaskuläre Aktivität gekennzeichnete psychische Stress auch Auswirkungen auf die Anzahl peripherer Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen haben würde. Zu diesem Zweck wurden unmittelbar nach der

Ruhephase 1 (prä), nach der Belastungsphase (stress) und in direktem Anschluss an die Erholungsphase (post) Blutentnahmen durchgeführt.

6.1.3.1 Differentialblutbild

Durch akuten Stress im Differentialblutbild induzierte Veränderungen, die typischerweise beobachtet werden können und in der Literatur bereits vorbeschrieben wurden (Bosch et al., 2003; Schulz & Schulz, 1997; Ader et al., 2001), konnten hier nochmals bestätigt werden: So fand sich in der vorliegenden Studie unter akuter Belastung im Vergleich zu den Basalwerten eine hochsignifikante Erhöhung der Gesamtleukozyten und der Lymphozyten. Ähnlich verhielten sich Monozyten und neutrophile Granulozyten, für die hier stark signifikante bzw. signifikante Anstiege unter der psychischen Belastung nachgewiesen werden konnten. Nach Beendigung des Stressors kehrten die Zellzahlen der genannten Populationen innerhalb kurzer Zeit wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Die Tatsache, dass durch akuten Stress verursachte immunologische Veränderungen im peripheren Blut von kurzer Dauer sind, steht ebenfalls im Einklang mit der heute vorliegenden Literatur (Segerstrom & Miller, 2004)

6.1.3.2 CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, NK- und NK-T-Zellen

Das für immunzelluläre Parameter unter akutem Stress bislang vermutlich am besten untersuchte und in der Psychoneuroimmunologie allgemein bekannte Phänomen der stressinduzierten kurzfristigen Erhöhung von peripheren NK-Zellen konnte auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. In gleicher Weise stehen der signifikante Anstieg CD8-positiver T-Zellen unter der akuten Belastung mit Rückgang der Zellzahlen auf das Ausgangsniveau kurz nach Beendigung des Stressors und die Tatsache, dass kein signifikanter Anstieg der absoluten Anzahl peripherer CD4⁺ T-Zellen über den Versuchsverlauf beobachtet werden konnte, in Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (Segerstrom & Miller, 2004).

Erstmalig nachgewiesen werden konnte durch die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass akuter psychischer Stress beim Menschen zu einem Anstieg der peripheren CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten führt, die den Oberflächenmarker CD56 aufweisen. Humane NK T-Zellen

(NKTC) sind phänotypisch und funktionell heterogen (Hammond et al., 1999), und T-Zellen, die den NK-Zellmarker CD56 exprimieren, repräsentieren eine Subpopulation dieser NKTC.

Es wurde beschrieben, dass $CD8^+CD56^+$ Zellen zirkulierende Effektor-Lymphozyten darstellen (Pittet et al., 2000), die beispielsweise an der antiviralen Immunabwehr beteiligt sind (Kambayashi et al., 2000). Weitere Studien haben gezeigt, dass CD56 sowohl von peripheren (Sato et al., 1996) als auch von gewebeinfiltrierenden $CD4^+$ T-Helferzellen (Barnaba et al., 1994) mit Th1-Cytokinprofil und sehr starkem zytotoxischen Potential exprimiert wird (Ohkawa et al., 2001). Daher könnte die hier dargestellte stressinduzierte Vermehrung peripherer $CD4^+CD56^+$ bzw. $CD8^+CD56^+$ NK-T-Zellen durchaus von klinischer Bedeutung sein.

6.1.3.3 Umverteilung peripher zirkulierender T-Zell-Subpopulationen unter akutem psychischem Stress: Zu Hypothese 1

Von Sallusto et al. (1999) wurde beschrieben, dass $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen anhand ihrer Expression des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7 und von CD45RA in jeweils vier verschiedene Subpopulationen naiver und Gedächtnis-T-Zellen eingeteilt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob akuter psychischer Stress beim Menschen Umverteilungseffekte auf den in der Peripherie zirkulierenden T-Zell-Pool hat.

Hypothese 1: Unter akuter mentaler Belastung kommt es zu einer Umverteilung der zirkulierenden T-Zell-Subpopulationen des peripheren Blutes mit einem Anstieg der $CD4^-$ und $CD8^-$ positiven Gedächtnis-/ Effektor-T-Zellen (T_{EM} und T_{EMRA}) und einer Verminderung der naiven T-Zellen (T_{naive}) und der zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten liefern starke Hinweise dafür, dass die Hypothese 1 zutreffend ist.

Unter akutem psychischem Stress, der durch den experimentellen mentalen Laborstressor induziert und anhand der Änderung von psychophysiologischen Parametern bestätigt wurde, kam es wie vermutet zu einer kurzfristigen Umverteilung der untersuchten T-Zell-Subpopulationen (Tabelle 5.6).

Beim Vergleich der Anzahl peripherer T-Lymphozyten konnte verglichen mit den Basalwerten eine signifikante Abnahme der peripheren $CD4^+$ und $CD8^+$ naiven T-Zellen ($CCR7^+ CD45RA^+$) und der $CD4^+ T_{CM}$ ($CCR7^+ CD45RA^-$) unter Stressbedingungen beobachtet werden. Die Anzahl der $CD8^+ T_{CM}$ nahm unter der akuten psychischen Belastung im peripheren Blut ebenfalls erwartungsgemäß ab; die beobachtete Veränderung erreichte jedoch beim Vergleich mit den Ausgangswerten das Signifikanzniveau nicht.

Im Gegensatz dazu konnte, ebenfalls der Hypothese entsprechend, eine Zunahme der Fraktion $CD4$ -positiver T-Effektorgedächtniszellen T_{EM} ($CCR7^- CD45RA^-$) und sogar eine hochsignifikante Zunahme von terminal differenzierten Effektorzellen T_{EMRA} ($CCR7^- CD45RA^+$) sowohl für $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen unter psychischem Stress nachgewiesen werden. Einzig bei den $CD8^+ T_{EM}$ erreichte der erwartungsgemäß beobachtete Anstieg der peripheren Zellzahl unter psychischem Stress das Signifikanzniveau nicht.

Nur kurze Zeit nach dem Ende der psychischen Belastungssituation zeigten sich lediglich für die $CD4^+ T_{naive}$ und T_{EM} weiterhin signifikant erhöhte Zellzahlen, während sich für alle anderen untersuchten Subpopulationen beim Vergleich mit dem Ausgangsniveau keine signifikanten Unterschiede nachweisen ließen.

Obwohl die Änderungen der Zellzahl von $CD8^+ T_{CM}$ und T_{EM} unter Stress das Signifikanzniveau verfehlten, entsprachen die Änderungen in ihrer Richtung der Hypothese. Es ist zu vermuten, dass diese Beobachtung auf die kleine Stichprobengröße ($n=22$) zurückzuführen ist und bei einer erneuten Prüfung einer Stichprobe größeren Umfangs signifikante Ergebnisse erreicht würden. Alle anderen Beobachtungen unter Stress entsprachen sowohl in der Richtung der Hypothese und waren außerdem statistisch signifikant. Obwohl bei streng wissenschaftlicher Betrachtung eine Anpassung des Signifikanzniveaus bei multiplen Tests erfolgen müsste, wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße im Rahmen dieser Arbeit hierauf verzichtet. Das angepasste Signifikanzniveau wäre so gering, dass der verwendete Test aufgrund des verhältnismäßig geringen Stichprobenumfangs die Nullhypothese kaum ablehnen könnte.

6.1.3.4 Auswirkungen akuter mentaler Belastung auf die zytolytische Effektorkapazität des peripheren T-Zellpools: Zu Hypothese 2

Um zu untersuchen, ob die stressinduzierten Anstiege der peripheren Zellzahl von Effektor-T-Zellen ebenfalls Konsequenzen für das zytolytische Effektorpotential des zirkulierenden T-Zell-Pools besitzen, wurde die Expression der intrazellulären Effektormoleküle Granzym B und Perforin in den peripheren T-Zellen der Versuchspersonen analysiert.

Hypothese 2: Unter akuter mentaler Belastung kommt es im Zuge der Mobilisierung von Effektorzellen zu einem Anstieg der CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten im peripheren Blut, die die intrazellulären Effektorenzyme Perforin und Granzym B exprimieren.

Hypothese 2 konnte anhand der gewonnenen Untersuchungsergebnisse bestätigt werden.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Anzahl peripherer T-Lymphozyten, die Granzym B oder Perforin exprimierten, unter kurzzeitiger mentaler Belastung deutlich zunahm (Abbildung 5.3). Die Anzahl der CD4⁺ Perforin exprimierenden T-Zellen stieg stark signifikant an, und für die mit Perforin beladenen CD8⁺ T-Lymphozyten sowie die CD4⁺ und CD8⁺ Granzym B-positiven T-Zell-Subpopulationen konnte sogar ein hochsignifikanter Anstieg nachgewiesen werden*.

Nur kurze Zeit nach Beendigung des experimentellen Stressors kehrten die Zellzahlen der Effektormolekül-exprimierenden T-Lymphozyten ausnahmslos wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

6.1.3.5 CCR7 – ein potentieller Marker der stressinduzierten Umverteilung

In einer darauf folgenden Analyse wurde untersucht, ob die beobachteten Anstiege der Granzym B- und Perforin-exprimierenden Effektorzellen und die Anstiege der CD4⁺/ CD8⁺ T_{EM} und

* Bei Anpassung des Signifikanzniveaus (multiple Tests) blieben diese Ergebnisse signifikant.

T_{EMRA} im peripheren Blut unter akutem psychischem Stress miteinander assoziiert waren. Es stellte sich hierbei heraus, dass die Expression der intrazellulären Effektormoleküle tatsächlich weitgehend auf die T-Lymphozyten beschränkt war, die CCR7 lediglich schwach exprimierten (Abbildung 5.4). Dies impliziert, dass eine stressinduzierte Umverteilung phänotypischer Effektor-Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen auch unmittelbare funktionelle Konsequenzen für das zytolytische Potential des peripher zirkulierenden humanen T-Zellpools hat. Außerdem zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass CCR7 einen geeigneten Marker darzustellen scheint, um die T-Lymphozyten, die unter psychischem Stress vermehrt ins Blut gelangen von denen zu unterscheiden, deren Anzahl in der Peripherie abnimmt.

Somit ist es in der vorliegenden Arbeit erstmalig gelungen, die Auswirkungen von kurzzeitigem psychischem Stress auf die Verteilung von T-Zell-Subpopulationen und Effektormechanismen des peripher zirkulierenden T-Zell-Pools beim Menschen umfassend darzustellen. Soweit dem Verfasser bekannt, repräsentieren die auf den Daten dieser Untersuchung basierenden Publikationen (s. Anhang) die einzigen bislang veröffentlichten Ergebnisse zu den durch psychischen Stress induzierten Veränderungen dieser wichtigen Funktionen des menschlichen Immunsystems.

Insgesamt dürften die Ergebnisse dieser Arbeit eine wesentliche Bedeutung für verschiedene Aspekte der adaptiven Immunität besitzen und in der Folge dessen auch wichtige Hinweise auf mögliche Mechanismen bei diversen immunologischen Prozessen mit T-Zell-Beteiligung liefern, die durch Stress beeinflusst werden können. Dies könnte beispielsweise für bestimmte Autoimmunerkrankungen oder Immunisierungsreaktionen von klinischer Bedeutung sein.

6.2 Implikationen für die adaptive Immunität

Effektor-T-Zellen und Effektormoleküle – Mechanismen der adaptiven Immunreaktion

Perforin und Granzym B sind Effektormoleküle, die bei der Granula-vermittelten Zytotoxizität von zytotoxischen T-Lymphozyten eine herausragende Rolle spielen (Shresta et al., 1995). Es gibt Hinweise dafür, dass sie für die Elimination von exogenen Pathogenen wie bestimmten Viren essentiell sind, aber auch in verschiedenen anderen biologischen Szenarien (Russel und Ley, 2002). Beim Kontakt mit ihrer Zielzelle entleeren die zytotoxischen Lymphozyten ihre

Effektorproteine per Exozytose aus ihren intrazellulären Granula in die immunologische Synapse. Perforin bewirkt in der Zielzelle eine Störung der Membranintegrität *in vitro* und kann dadurch eine konsekutive osmotische Lyse induzieren. Kagi und Mitarbeiter (1994) fanden heraus, dass Perforin für die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunität bei intrazellulären bakteriellen Infektionen von Bedeutung ist. Allerdings scheint Perforin auch eine Rolle an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu spielen (Russel & Ley, 2002) Seine zytolytische Wirkung *in vivo* scheint jedoch auch wesentlich in einem Synergismus mit den Granzymen begründet zu sein: Diesen Enzymen erleichtert das Perforin den Eintritt in die Zielzelle und kann ihre intrazelluläre Freisetzung aus den Endosomen hervorrufen. Granzym B ist ein wichtiger Vertreter einer Gruppe von zytotoxischen Serinproteasen und kann, nachdem es in das Zytoplasma der Zielzelle gelangt ist, über verschiedene Wege den Zelltod auslösen. Gemeinsam stellt dieser Perforin-/Granzym B-vermittelte Weg eine Schlüsselkomponente der Apoptoseinduktion zytotoxischer Immunzellen dar und führt zu einer sehr schnellen Initialisierung des Zelltodes (Barry & Bleackley, 2002).

Die CCR7-negativen T_{EM} und T_{EMRA} exprimieren Oberflächenrezeptoren für inflammatorische Chemokine, die sie dazu befähigen, zum Ort einer Entzündung zu migrieren (Charo & Ransohoff, 2006). Weitere gewebspezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche ermöglichen ihnen eine gerichtete Migrationsbewegung zu unterschiedlichen Zielgeweben. Ihre Kapazität zur Wanderung in nicht-lymphatische Gewebe, wie beispielsweise in die Haut oder in bestimmte Darmabschnitte, die mögliche Eintrittspforten für Pathogene darstellen können, wird dadurch erhöht (Campbell et al., 1999; Zabel et al., 1999). Beide Subpopulationen sind mit direkten Effektormechanismen zur Abwehr von Pathogenen ausgestattet und können innerhalb kurzer Zeit nach ihrer Stimulation proinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5 und IFN- γ bilden (Sallusto et al., 2004). Große Mengen der intrazellulären Effektorproteine Perforin und Granzym B lassen sich bereits präformiert in ihren Granula nachweisen, was ihre Fähigkeit zur Ausübung unmittelbarer Effektorfunktion noch einmal verdeutlicht. Es gibt Hinweise aus einigen Studien, dass T-Zellen, die in der Peripherie eine Effektorfunktion gegenüber Viren und anderen Pathogenen ausüben, fast ausschließlich CCR7-negativ sind (Chen et al., 2001; Hengel et al., 2003; Hislop et al., 2001; Wolint et al., 2004). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass T_{EM} in der Lage sind, einen effektiven Kurzzeitschutz bei Infektionen zu vermitteln (Zaph et al., 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Anstiege von Perforin-/Granzym B-exprimierenden T-Lymphozyten und phänotypischen Effektor-Gedächtnis-/ Effektor-T-Zellen im peripheren Blut dürften demzufolge eine potentielle Verstärkung der unmittelbaren T-Zell-vermittelten Immunantwort darstellen.

T_{naive} und T_{CM}: Die adaptive Immunantwort aus den sekundären lymphatischen Organen

Der beobachtete Abfall von naiven und zentralen Gedächtnis-T-Zellen unter akutem Stress im peripheren Blut könnte in ähnlicher Weise eine wichtige Bedeutung für das adaptive Immunsystem besitzen: Beide CCR7-positiven Fraktionen zirkulieren auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen zwischen dem Blut und den lymphatischen Organen (Jenkins et al., 2001; Charo & Ransohoff, 2006). Naive und zentrale Gedächtnis-T-Zellen besitzen zwar keine ausgeprägten unmittelbaren Effektorfunktionen und sind normalerweise auch nicht in der Lage, andere Gewebe zu infiltrieren (Sallusto et al., 1999). Allerdings sind T_{CM} im Falle einer adäquaten Stimulierung zur Produktion großer Mengen von IL-2 und zur ausgedehnten proliferativen Expansion in der Lage (Sallusto et al., 2004). Obwohl im Vergleich zu den T_{EM} nur marginale Mengen von intrazellulärem Granzym/ Perforin in den T_{CM} nachweisbar sind, besitzen sie dennoch eine ausgeprägte Fähigkeit zur Produktion von Perforin, wofür allerdings mehrere Zellzyklen notwendig sind. Bei diesem Prozess erfolgt gleichzeitig eine Downregulation von CCR7 (Meng et al., 2006). T_{CM} benötigen für ihre Aktivierung auch weniger kostimulatorische Signale als naive T-Zellen, und ihre Differenzierung zu IFN- γ und IL-4 produzierenden Effektorzellen erfolgt in kürzerer Zeit. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl systemische als auch periphere Infektionen von T_{CM} effizient kontrolliert werden können (Wherry et al., 2003; Zajac et al., 1998). Ihre Fähigkeit zur Migration in lymphatische Organe wird als wesentliche Voraussetzung dafür angesehen, da dort eine effiziente Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen oder andere APC stattfinden kann, was für die T-Zell-Fitness und ihre Differenzierung zu Effektor-T-Zellen von großer Bedeutung ist (Gett et al., 2003; Lanzavecchia & Sallusto, 2000). T_{CM} leisten in Kombination dieser Eigenschaften zusammen mit ihrer hohen *in vivo*-Persistenz einen wesentlichen Beitrag zum Langzeitschutz bei Infektionen, für deren Eindämmung eine Sekundärreaktion notwendig ist (Lanzavecchia & Sallusto, 2005; Zaph et al., 2004).

Eine stressinduzierte Migration von naiven T-Zellen und T_{CM} in lymphatische Gewebe würde demnach ebenfalls zu einer Verstärkung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion führen. Obwohl

zu vermuten ist, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der CCR7⁺ T-Lymphozyten unter akutem psychischem Stress durch eine Rekrutierung der Zellen in lymphatische Organe bedingt war, bleiben diese Vermutungen vorläufig unbestätigt, da keine Biopsien sekundärer lymphatischer Gewebe durchgeführt wurden, wie dies beispielsweise häufiger in Studien an Mäusen geschieht.

6.3 Akuter psychischer Stress und Immunfunktionen: Konzepte im Wandel

Über eine lange Zeit wurde Stress generell als immunsuppressiv angesehen, und etliche Studien konnten bisher einen Zusammenhang von chronischem Stress und verminderten Immunfunktionen herstellen (McEwen, 1998; Vedhara, 1999). Weniger einheitlich hingegen verhält es sich bei den Auswirkungen von akutem Stress auf die Immunfunktionen. In einer kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse mit Einschluss von über 300 Studien kommen Segerstrom und Miller (2004) zu dem Schluss, dass akuter psychischer Stress etliche Funktionen des Immunsystems stärkt, manche hingegen schwächt. Insgesamt führe akuter psychischer Stress zu einer Verschiebung von Immunfunktionen: Die rascher einsetzende und Energie sparende angeborene Immunität würde diesem Konzept zufolge zuungunsten der langsameren und Energie konsumierenderen adaptiven Immunität in ihren Funktionen verstärkt werden (Dopp et al., 2000; Nguyen et al., 1998).

Andererseits wird aktuell ein weiteres Konzept diskutiert, nach dem die akute Stressantwort einen evolutionär adaptiven psychophysiologischen Überlebensmechanismus darstellen soll, welcher neben metabolischen, zentralnervösen und kardiovaskulären Anpassungsvorgängen (McEwen & Seeman, 1999) auch eine Verstärkung von angeborenen und adaptiven Immunfunktionen beinhaltet (Dhabhar & McEwen, 1997, 2001; Edwards et al., 2006). Diesem Konzept zufolge würden Situationen, die zur Auslösung einer *fight-or-flight*-Antwort führen, wahrscheinlich auch von einer Verletzung gefolgt sein. Dadurch wiederum sei eine Antigenexposition sehr wahrscheinlich, die zu einer konsekutiven Infektion führen könnte. Die akute Stressantwort würde demzufolge erst dann einen Überlebensvorteil bieten, wenn durch sie tatsächlich eine adäquate Immunantwort vorbereitet würde.

Es liegen bereits etliche Untersuchungen vor, die Hinweise dafür bieten, dass akuter Stress nicht nur bestimmte Funktionen der angeborenen Immunität, sondern in der Tat auch wesentliche Funktionen der adaptiven zellulären und humoralen Immunität verstärken kann (Bosch et al., 2003; Saint-Mezard et al., 2003; Wood et al., 1993). Besonders bemerkenswert sind Studien an

Mäusen, in denen durch akuten Stress eine Verstärkung der zellvermittelten Immunität erzielt werden konnte, die mit einer Umverteilung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in die Haut einherging (Dhabhar, 2002). Das Migrationsverhalten von Leukozyten, das essentiell für eine effektive Immunantwort ist (Moser & Loetscher, 2001; Sprent & Tough, 1994), konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie durch akuten psychischen Stress, der einem chirurgischen Eingriff voran ging, verändert werden: Die Infiltrationsstärke von Neutrophilen, Makrophagen, NK-Zellen und T-Lymphozyten im chirurgischen Operationsgebiet wurde stressinduziert verstärkt (Viswanathan & Dhabhar, 2005). In einer anderen Studie konnten sie beobachten, dass eine kurzzeitige Stresssituation unmittelbar vor der primären Immunisierung mit einem Antigen zu einer langfristigen Verstärkung der immunologischen Gedächtnisfunktion mit einer stärkeren Immunreaktion bei Sekundärkontakt mit dem Antigen führte (Dhabhar & Viswanathan, 2005).

Zusammen mit den in der vorliegenden Studie vorgestellten Untersuchungsergebnissen wird dadurch das Konzept von einer Verstärkung angeborener *und* adaptiver Immunfunktionen unter akutem Stress unterstützt.

6.4 Implikationen für Gesundheit und Krankheit

Eine Verstärkung der adaptiven Immunität durch eine selektive Umverteilung der T-Lymphozyten in diejenigen Kompartimente, in denen sie sich am effektivsten an einer Immunreaktion beteiligen, kann verschiedene Auswirkungen auf die Gesundheit oder Krankheit des Organismus haben. Im Falle einer Verletzung oder einer Infektion dürften positive Effekte die Folge sein, genauso wie bei einer Impfung. Andererseits kann eine verstärkte Immunantwort auch zu einer stressinduzierten Krankheitsexazerbation bei entzündlichen oder Autoimmunerkrankungen führen.

6.4.1 Akuter Stress als endogenes Adjuvans bei der primären Immunisierung

Die Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf naive und Gedächtnis-T-Zell-Subpopulationen könnten für eine sekundäre Immunreaktion von Bedeutung sein und dadurch auch von klinischer Relevanz. Dhabhar und Vishwanathan (2005) zeigten in kürzlich

veröffentlichten Studien an Mäusen, dass bereits ein einmaliges akutes Stressereignis unmittelbar vor der primären Immunisierung mit einem Antigen bestimmte Immunreaktionen bei der wiederholten Konfrontation des Organismus mit demselben Antigen verstärken kann. Dabei führte der Stressor zu einer Verstärkung der zellvermittelten Immunantwort bei Reexposition, die mit einer erhöhten Zahl von Makrophagen und T-Lymphozyten sowie einer erhöhten Konzentration von T_H1 - bzw. proinflammatorischen Zytokinen wie $IFN-\gamma$, $IL-2$ und $TNF-\alpha$ im Bereich des Sekundärkontaktes einherging. Bemerkenswert scheint, dass Dhabhar und Vishwanathan bereits während der Frühphase der primären Immunisierung eine deutliche stressinduzierte Vermehrung von $CD4^+$ T_{CM} -ähnlichen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in den Sentinel-Lymphknoten der untersuchten Mäuse beobachten konnten. Obwohl die genauen Mechanismen in dieser Studie nicht untersucht wurden, wäre es denkbar, dass es in der akuten Stresssituation zu einer verstärkten Rekrutierung von naiven T-Zellen in die lymphatischen Organe kommt, wie es auch unsere Studienergebnisse vermuten lassen. Die von Dhabhar und Viswanathan beobachtete Anreicherung der Gedächtnis-T-Zell-Subpopulationen in den Lymphknoten 72h nach der Primärimmunisierung könnte durch eine Transformation antigenstimulierter naiver T-Zellen in Effektor-T-Zellen und weiterhin in T_{CM} -Zellen bedingt sein (Wherry et al., 2003).

Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Viswanathan und Mitarbeiter (2005) bei Untersuchungen an Mäusen zur experimentell durch 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene induzierten Kontakt-Hypersensitivität unter akutem Stress. Neben Langerhanszellen der Haut sind insbesondere Makrophagen sowie antigenspezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen an dieser Immunreaktion beteiligt (Akiba et al., 2002). Die frühe Induktionsphase dieser Reaktion, in der aktivierte antigenpräsentierende Zellen mit naiven T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten aufeinander treffen, ist von wesentlicher Bedeutung für eine spätere Generierung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen (Gorbachev & Fairchild, 2001). Die Autoren konnten eine stressbedingt verstärkte Hautreaktion beobachten, die interessanter Weise von einer Akkumulation naiver und aktivierter $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in den Lymphknoten des dazugehörigen Lymphabflussgebietes nur kurze Zeit nach der Primärimmunisierung begleitet war. Auch Dendritische Zellen waren in diesen Lymphknoten in ihrer Anzahl im Vergleich zu nicht gestressten Tieren deutlich vermehrt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es durch den einmaligen akuten Stressor zu einer verstärkten Rekrutierung von Dendritischen Zellen und naiven T-Zellen in die Lymphknoten kommt, und infolgedessen zu einem verbesserten Priming naiver T-Zellen (Gett et al., 2003).

Edwards und Mitarbeiter konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie (2006) zeigen, dass es bei Frauen zu einem stärkeren Anstieg der spezifischen Antikörper-Titer nach der Immunisierung kam, wenn sie direkt vor einer Influenza-Impfung akutem physischem oder psychischem Stress ausgesetzt waren. Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser stressinduziert verstärkten Reaktion bleiben bisher im Detail unklar. Edwards und Mitarbeiter kommen allerdings zu dem Schluss, dass mit großer Wahrscheinlichkeit stressbedingte Veränderungen während der Frühphase nach der Immunisierung zur Verstärkung der Immunreaktion wesentlich beitragen. Sie vermuten eine verstärkte Migration von DC und CCR7⁺ naiven T-Zellen in die drainierenden Lymphknoten und eine dadurch bedingte effizientere Antigenpräsentation. Dies dürfte sowohl die Wahrscheinlichkeit als auch die Frequenz der Antigenerkennung durch naive T-Lymphozyten erhöhen und ihre nachfolgende klonale Proliferation, Differenzierung und Expansion verstärken.

6.4.2 Akuter psychischer Stress und Autoimmunerkrankungen

Obwohl eine stressinduzierte Verstärkung von Immunfunktionen auf den ersten Blick als vorteilhaft erscheinen könnte, ist zu bedenken, dass dies nicht unbedingt zu einer Verbesserung der Gesundheit führen muss: Eine verstärkte Immunreaktion kann auch zu einer Verschlechterung von Autoimmunerkrankungen führen.

Aus diesem Grund können die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse auch für Krankheiten von Bedeutung sein, an deren Entstehungsprozess oder Verlauf T-Zellen beteiligt sind und bei denen eine pathogenetisch bedeutsame oder exazerbierende Rolle für psychischen Stress vermutet wird. Dazu zählen beispielsweise die Erkrankungen der atopischen Triade, Multiple Sklerose (MS) und chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis (RA) und die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) (Mohr et al., 2006; Sandberg et al., 2000; Straub et al., 2005; Wright et al., 2005).

6.4.2.1 Chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen

Stressinduktion und -exazerbation

Eine genauere Betrachtung der Zusammenhänge zwischen akutem psychischem Stress und chronischen Arthritiden erscheint besonders interessant, da hier in den letzten Jahren neue Erkenntnisse über Krankheitsmechanismen, T-Zell-Beteiligung und Stresseinflüsse gewonnen werden konnten (Straub und Härle, 2005; Straub et al., 2005). Obwohl es etliche Studien gibt, die einen Zusammenhang zwischen Stress und chronisch entzündlichen Arthritiden beschreiben, sind die moderierenden Mechanismen, durch die Stress als krankheitsfördernder Faktor wirkt, bislang im Detail nicht bekannt. Eine positive Korrelation zwischen stressreichen Lebenssituationen und dem Krankheitsausbruch konnte für Kinder, die an JIA erkrankt waren, dokumentiert werden. Weitere Studien liegen vor, die kurzzeitigem psychischem Stress eine krankheitsverstärkende Rolle sowohl bei der RA als auch bei der JIA zuschreiben. In einer Übersichtsarbeit, die ungefähr 3000 Patienten mit RA einschließt, kommen Hermann und Mitarbeiter (2000) zu dem Schluss, dass akuter leichter Stress im Zusammenhang mit einem Ansteigen der Krankheitsaktivität steht und wiederholter akuter Stress zu einer rascheren Krankheitsprogredienz führt.

CCR7⁻ Gedächtnis-T-Zellen

Die RA und JIA sind durch die Zerstörung von Gelenkknorpel und Knochen gekennzeichnet, und die charakteristische synoviale Entzündung wird nach heutiger Vorstellung durch anhaltende Reaktionen autoreaktiver Gedächtnis-T-Zellen unterhalten (Fournier, 2005). Die Migration und Akkumulation dieser Zellen in synovialen Geweben stellt einen bedeutenden Schritt für die Entwicklung der RA dar (Harris, 1990), und fast alle gewebeinfiltrierenden CD4⁺ T-Zellen weisen charakteristische Merkmale von Gedächtniszellen auf. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten scheinen für die Pathogenese und den Verlauf eine wichtige Rolle zu spielen. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen mit proinflammatorischem Zytokinprofil (T_H1) und CD8⁺ Effektor-T-Zellen konnten aus synovialen Gewebe von Patienten isoliert werden und scheinen an der synovialen Entzündungsreaktion und Gelenkdestruktion unmittelbar beteiligt zu sein (Skapenkol et al., 2005). Gattorno und Mitarbeiter (2005) konnten nachweisen, dass sich IFN- γ produzierende CD4⁺CCR7⁻ Gedächtniseffektor-T-Zellen (T_{EM}) im entzündlichen Synovium von JIA-Patienten anreicherten.

CCR7⁺ T-Zellen

Bemerkenswert scheint, dass Gattorno und Mitarbeiter (2005) in der entzündlich veränderten Synovialschleimhaut auch CD4⁺CCR7⁺ zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) finden konnten. Diese wurden wahrscheinlich durch CCL21, das im ektopen lymphatischen Gewebe, welches sich typischer Weise in der Synovia bei RA- und JIA-Patienten bildet, und auch in der synovialen Flüssigkeit exprimiert wurde, angelockt. Die Autoren vermuten, dass diese T_{CM} unter dem Einfluss von Zytokinen wie IL-7 und IL-15 des entzündlichen synovialen Milieus proliferieren und zu CCR7⁻ Effektor-T-Zellen differenzieren können, die dann vor Ort ihre Gewebe schädigenden Funktionen ausüben. Ähnlich stellen sich die Untersuchungsergebnisse über T-Zell-Subpopulationen von Patienten mit RA dar: Campell und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass bei RA-Patienten CD4⁺CCR7⁺ T-Lymphozyten nicht nur im peripheren Blut und in den sekundären lymphatischen Organen gefunden werden können, sondern auch im Synovium. Dies ist vermutlich ebenfalls dadurch bedingt, dass die chemotaktischen Zytokine CCL19/ 21 im ektopen lymphatischen Gewebe lokal exprimiert werden und CCR7⁺ naive und T_{CM} dadurch angelockt werden (Wagner et al., 1998).

RA-Patienten weisen atypische CCR7⁺ T-Zellen mit Effektorpotential auf

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass CCR7-exprimierende T-Lymphozyten mit der Fähigkeit in die Lymphknoten zu migrieren bei Gesunden normalerweise keine ausgeprägten unmittelbaren Effektorfunktionen aufweisen. Zhang et al. (2005) konnten bei RA-Patienten jedoch eine Subpopulation funktioneller CD4⁺ Effektor-T-Zellen charakterisieren, die große Mengen an IFN- γ produzieren und ohne vorherige Stimulation zytotoxische Effektorfunktionen ausüben konnten. Interessanterweise konnte neben dem Rezeptor CCR5 für das Homing in entzündete Gewebe gleichzeitig der Lymphknoten-Homing-Rezeptor CCR7 auf ihrer Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der größte Teil dieser autoreaktiven Effektor-T-Zellen, die nicht strikt dem T_{CM}/ T_{EM}-Paradigma folgen, war dementsprechend in der Lage, trotz ihrer zytotoxischen und potentiell Gewebe schädigenden Fähigkeiten in lymphatische Gewebe zu migrieren (Zhang et al., 2005).

Beachtet man, dass CCR7 einen Marker für T-Zellen darstellen könnte, die unter akutem psychischem Stress das periphere Blut verlassen, besteht folglich auch die Möglichkeit, dass außer den naiven T-Zellen und T_{CM} bei RA-Patienten auch diese atypischen „CCR7⁺ Gedächtnis-Effektorzellen“ unter psychischem Stress verstärkt in ektopes synoviales Gewebe migrieren

könnten. Dort wiederum könnten diese drei CCR7-positiven Subpopulationen entsprechend ihres Potentials entweder durch die Ausübung direkter Effektormechanismen oder durch ihre zytokininduzierte Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen zur Verstärkung des entzündlichen Geschehens beitragen.

Effektormoleküle schädigen die Gelenke

Es liegen Studienergebnisse vor, die darauf hinweisen, dass bei Patienten mit RA Granzym B-positive zytotoxische T-Lymphozyten wesentlich zur Gelenkschädigung beitragen. Smeets und Mitarbeiter (2001) konnten Granzym B⁺ Effektorzellen aus synovialen Biopsien von Patienten mit RA isolieren, während Kraan und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass die Anzahl Granzym B⁺ CTL bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und starker Gelenkdestruktion mit der Höhe des Gehalts der Serinprotease in der Synovialflüssigkeit assoziiert war. Es ist bekannt, dass Granzym B die extrazelluläre Matrix schädigen kann, wenn es aus CTL in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Auch an der Pannus-Knorpel-Grenze, die für die fortschreitende Gelenkdestruktion bedeutend ist, konnte Granzym B nachgewiesen werden (Ronday et al., 2001).

Zusammenfassend könnten die angeführten Ergebnisse Hinweise für einen möglichen Mechanismus der stressinduzierten Exazerbation von chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen liefern. Um beurteilen zu können, ob die in der vorliegenden Studie beobachteten kurzfristigen Veränderungen der Zusammensetzung des peripheren T-Zell-Pools tatsächlich einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von chronischen Arthritiden besitzen, sollten Studien folgen, die Patienten mit RA oder JIA unter akutem psychischem Stress einschließen.

6.6 Diskussion zur Versuchsdurchführung

Es ist notwendig darauf hinzuweisen, dass eine allgemeingültige Aussagekraft der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse über den Einfluss von Stress auf das adaptive Immunsystem durch verschiedene limitierende Faktoren eingeschränkt wird.

Bereits bei der Fragestellung muss berücksichtigt werden, dass es kein einheitliches wissenschaftliches Konzept von „Stress“ gibt, sondern über die Jahrzehnte der modernen

Stressforschung verschiedene Definitionen in den Fachbereichen der Psychologie und Medizin entstanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde, wie in vielen psychoneuroimmunologischen Untersuchungen, Stress relativ allgemein als ein Zustand definiert, in dem ein auslösender Reiz (Stressor) nach dessen Wahrnehmung und Bewertung durch das Individuum eine psychophysiologische Reaktion (Stressreaktion) hervorruft, die anhand geeigneter Indikatoren bestimmt werden kann. Diesem Vorgang wird eine Kaskade bestimmter Prozesse zugrunde gelegt, die einander gegenseitig beeinflussen können. Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie keine hormonellen Parameter wie die Konzentration der Plasmakatecholamine bestimmt wurden, die vermutlich als Vermittler der Stressantwort vom ZNS zum Immunsystem dienen, da hierfür eine größere Menge an zusätzlichem Probandenblut zur Untersuchung notwendig gewesen wäre. Jedoch liegen Ergebnisse aus früheren Studien vor (Atanackovic et al., 2003), die den gleichen mentalen Belastungstest als kognitiven Stressor eingesetzt haben. Dabei konnte ein Anstieg der Plasmakatecholamine unter Stress nachgewiesen werden.

Des Weiteren wäre eine Kontrollgruppe wünschenswert gewesen, um den Einfluss der mentalen Belastung auf die Immunparameter zu verifizieren. Allerdings liegen auch hier bereits Untersuchungsergebnisse aus kontrollierten Studien vor, die verschiedene immunologische Veränderungen, darunter auch eine veränderte Zusammensetzung des peripheren Lymphozytenpools, unter demselben Belastungstest beschreiben, die ohne den Stresstest nicht auftraten (Atanackovic et al., 2002). Daher ist davon auszugehen, dass die hier beobachteten immunologischen Veränderungen tatsächlich stressinduziert sind.

Weiterhin ist nicht eindeutig geklärt, inwiefern die mithilfe von Laborstressoren gewonnenen Untersuchungsergebnisse sich von stressbedingten Veränderungen durch alltägliche Belastungssituationen unterscheiden. Von großem Vorteil ist allerdings bei dem hier eingesetzten Studiendesign, dass durch die experimentelle Stressinduktion wichtige Kriterien wie eine verlässliche Wiederholbarkeit der Belastungssituation, Kontrolle der Stimuli und Standardisierung des Versuchsablaufs gewährleistet werden können.

Eine Limitierung der Vergleichbarkeit psychoneuroimmunologischer Studien am Menschen ergibt sich aus der Tatsache, dass in verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Stressoren eingesetzt werden, um eine akute Stressreaktion auszulösen. Diese variieren auch in ihrer Dauer und Stärke, und es gibt keine wissenschaftlich allgemein anerkannten, eindeutigen Definitionen,

durch welche Kriterien akuter psychischer Stress gekennzeichnet ist. Wäre dies gegeben, würden die Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen besser miteinander vergleichbar.

Von immunologischer Seite her ist zu bedenken, dass in Tierstudien, die T-Zell-Subpopulationen untersuchen, teilweise andere Oberflächenmoleküle eingesetzt werden als beim Menschen. Statt CCR7 wird beispielsweise bei der Maus häufig CD62L verwendet, und auch in einigen Humanstudien wurde dieses Adhäsionsmolekül anstelle von CCR7 eingesetzt (Unsoeld & Pircher, 2005). Andere Arbeitsgruppen wiederum benutzen stattdessen Oberflächenmarker wie beispielsweise CD27 und CD28, und die unterschiedlich definierten Subpopulationen können sich teilweise überlappen oder in bestimmten Funktionen voneinander unterscheiden. Insgesamt sollte das Paradigma der Subpopulationen von T_{CM} , T_{EM} und T_{EMRA} anhand von CD45RA und CCR7 nicht als absolut und für jede erdenkliche Situation streng zutreffend angesehen werden, da auch diese T-Zell-Subpopulationen bei weitem noch nicht abschließend untersucht wurden (Carrasco et al., 2006; Meng et al., 2006; Sallusto et al. 2004, Takata & Takiguchi, 2006). Jedoch bildet es eine solide Basis, um T-Zell-Subpopulationen im steady state nach unterschiedlicher Antigenerfahrung, Migrationskapazität und Effektorpotential einzuteilen (Champagne et al., 2001; Geginat et al., 2003; Schwendemann et al, 2005).