

Aus der Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie  
(Klinik für Allgemeinmedizin, Naturheilkunde und Psychosomatik)  
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Auswirkungen von kurzzeitigem psychischem Laborstress auf die  
Verteilung unkonventioneller T-Zellsubpopulationen  
im peripheren Blut**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Nowottné

aus Dresden

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. H.-Chr. Deter  
                          2. Prof. Dr. M. Schedlowski  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Atanackovic

Datum der Promotion: 24.02.2012

1	EINLEITUNG .....	5
2	GRUNDLAGEN .....	7
2.1	Psychoneuroimmunologie.....	7
2.2	Psychophysiologische Stresskonzepte .....	8
2.3	Wege der Kommunikation zwischen zentralem Nervensystem, Immunsystem und neuroendokrinem System.....	10
2.3.1	Die HPA-Achse .....	10
2.3.2	Das Sympathische Nervensystem (SNS) .....	11
2.4	Funktionen des Immunsystems .....	12
2.5	Stress und sein Einfluss auf unser Immunsystem .....	13
2.6	Spezielle Grundlagen zur erworbenen, zellulären Immunität.....	15
2.6.1	T-Zell-vermittelte Immunität .....	15
2.6.2	unkonventionelle T-Zellsubpopulationen und ihre Marker.....	16
2.6.3	Das Th1/ Th2-Modell .....	19
2.6.4	Differenzierung von Th1-/ Th2-Zellen anhand von Oberflächenmarkern .....	21
3	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....	22
4	PROBANDEN UND METHODEN.....	24
4.1	Probandenkollektiv .....	24
4.2	Versuchsordnung.....	25
4.2.1	Ablauf der Untersuchung .....	25
4.2.2	Psychophysiologischer Belastungstest .....	28
4.2.3	Physiologische Parameter.....	30
4.2.3.1	Bestimmung des Blutdruckes .....	30
4.2.3.2	Messung der Herzfrequenz.....	30
4.2.4	Psychodiagnostik.....	30
4.2.5	Immunologische Parameter .....	31
4.2.5.1	Blutprobengewinnung .....	31
4.2.5.2	Isolierung von mononukleären Zellen aus heparinisiertem Vollblut und anschließende Kryokonservierung .....	32
4.2.5.3	Auftauen der Zellen und Antikörpermarkierung.....	33
4.2.5.4	Durchflusszytometrie/ FACS-Analyse.....	34
4.3	Statistik.....	36
5	ERGEBNISSE.....	37
5.1	Probanden.....	37

5.2	Psychologische Reagibilität .....	38
5.3	Physiologische Reagibilität .....	39
5.4	Immunologische Parameter .....	40
5.4.1	NK-Zellen und CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	40
5.4.2	NKT-Zellen und iNKT-Zellen .....	42
5.4.3	γδ-T-Zellen .....	44
5.4.4	Th-1 versus Th2-Zellen .....	45
5.4.4.1	CD 226 <sup>+</sup> T-Zellen als Vertreter der Th1-Zellen .....	45
6	DISKUSSION .....	50
6.1	Diskussion der Versuchsdurchführung .....	51
6.2	Ergebnisdiskussion .....	55
6.2.1	Psychophysiologische Aktivierung .....	55
6.2.2	Immunologische Variablen .....	57
6.2.2.1	Auswirkungen des Stressexperiments auf NK-Zellen und CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	57
6.2.2.2	Auswirkungen des Stressexperiments auf CD56 <sup>+</sup> NKT-Zellen und 6B11 <sup>+</sup> / CD1d-Tetramer <sup>+</sup> iNKT-Zellen : zu Hypothese 1 .....	59
6.2.2.3	Auswirkungen des Stressexperiments auf γδ-T-Zellen: zu Hypothese 2 .....	61
6.2.2.4	Auswirkungen des Stressexperiments auf die Verteilung von Th1/ Th2-Zellen, differenziert anhand von CD226 und CRTH2 .....	64
7	ZUSAMMENFASSUNG .....	67
8	ABKÜRZUNGEN .....	69
9	LITERATURVERZEICHNIS .....	70
Anhang		
	LEBENS LAUF .....	82
	DANKSAGUNG .....	83
	ERKLÄRUNG .....	84

### 1 Einleitung

Wechselwirkungen des Nervensystems, des Hormonsystems und des Immunsystems werden im interdisziplinären Feld der Psychoneuroimmunologie erforscht. Ein Hauptaugenmerk richtet sich hierbei auf Untersuchungen zu den Auswirkungen von psychischen Belastungen auf unsere Immunfunktionen (Glaser et al. 2005, Ader 2007).

Eine Vielzahl von kontrollierten Untersuchungen belegt, dass Stress das menschliche Immunsystem und dessen Funktion entscheidend beeinflusst (Ader 2007). So geht psychischer Stress mit einer erhöhten Infektanfälligkeit und einer Begünstigung der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren einher (Schedlowski et al. 2006), während er gleichzeitig eine Rolle in der Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu spielen scheint (Herrmann et al. 2000, Srivastava et al. 2010). Des Weiteren ist eine geschwächte Abwehrreaktion nach Impfung sowie eine verzögerte Wundheilung unter mentalen Stressoren beschrieben (Glaser et al. 2005, Ader 2007). Ein tieferes Verständnis dieser Zusammenhänge verspricht eine Erweiterung beziehungsweise Ergänzung bisheriger Therapieoptionen.

Es gibt bereits umfassende Erkenntnisse über stressinduzierte Veränderungen des angeborenen Immunsystems. Das am besten belegte Beispiel ist die durch akuten psychischen Stress ausgelöste Mobilisierung von natürlichen Killerzellen in das periphere Blut (Segerstrom et al. 2004). Sie wird als adaptiver Prozess zur kurzfristigen Optimierung der angeborenen Immunität angesehen.

Bisher wurden Auswirkungen psychischer Belastungen auf das erworbene, adaptive Immunsystem hingegen nur unzureichend untersucht und vorhandene Daten liefern teils widersprüchliche Ergebnisse (Segerstrom et al. 2004). Die Verteilung und die Funktion von T-Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut sind dabei von besonderem Interesse, da die T-Zellen als heterogene Gruppe von Immunzellen mit verschiedenen Funktionen, eine Schlüsselrolle in der erworbenen Immunität spielen. Eine Vielzahl von Autoimmunkrankheiten ist mit Defekten in der T-Zell-Funktion assoziiert (Yamanouchi et al. 2007, Anderson et al. 2008, Costantino et al. 2008) und man konnte einen Einfluss psychischer Stressoren auf Autoimmunerkrankungen, wie Asthma bronchiale (Wright 2005, Schreier et al. 2011), Rheumatoide Arthritis (Straub et al. 2005) und Multiple Sklerose (Mohr et al. 2004) zeigen. Dennoch sind die zu Grunde liegenden Mechanismen nicht aufgeklärt. Es handelt sich um ein

Thema mit hoher klinischer Relevanz, das die Rationale für eine therapeutische Beeinflussung von immunologischen Funktionen und Krankheitsverläufen durch soziale oder psychologische Interventionen sowie neu entwickelte Immuntherapien bilden könnte.

In früheren Studien zu diesem Thema konnte eine stressinduzierte, selektive Umverteilung konventioneller T-Zell-Subpopulationen beobachtet werden. Dabei wurden antigenerfahrene Effektor-T-Zellen ins periphere Blut mobilisiert, wohingegen naive und zentrale Gedächtniszellen scheinbar im lymphatischen Gewebe zurückgehalten wurden (Atanackovic et al. 2006). Diese Beobachtung stärkt die These, dass es unter akutem Stress vor allem zu einer Mobilisation von Effektor-T-Zellen ins periphere Blut kommt, welche in Folge um so rascher in peripheres Gewebe migrieren können, um dort eine effektive Immunantwort zu gewährleisten. Diese Vorbefunde werfen allerdings auch die Frage auf, ob auch Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) und gammadelta-T-Zellen ( $\gamma\delta$ -T-Zellen), die in Teilen ebenfalls als hochpotente Effektorzellen gelten (Kabelitz et al. 2007) und zu den unkonventionellen T-Zellen zählen, unter akutem psychischem Laborstress ins periphere Blut mobilisiert werden.

Neben konventionellen T-Zellpopulationen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen) existieren unkonventionelle T-Lymphozyten, die zwar eine kleinere Population ausmachen, aber ebenso zur Abwehr beitragen. Eine vorangegangene Analyse konnte bereits den Einfluss von psychologischem Stress auf eine Untergruppe unkonventioneller T-Zellen darlegen, der in den letzten Jahren das besondere Interesse der immunologischen Forschung gilt, den regulatorischen T-Zellen (Treg). Von Tregs spricht man bei einer Subpopulation von T-Zellen, deren Funktion in der Unterdrückung der Aktivierung einer Immunantwort und damit in der Regulation von Selbsttoleranz besteht. Unsere Arbeitsgruppe konnte einen Abfall  $CD4^+/FOXP3^+$  regulatorischer T-Zellen unter kurzzeitigem Laborstress und somit eine Aktivierung der Immunantwort durch verminderte immunregulatorische Aktivität darlegen (Freier et al. 2010). Neben den  $CD4/FOXP3$ -exprimierenden Tregs zählen jedoch auch eine Reihe weiterer Lymphozyten-subpopulationen zu den unkonventionellen T-Zellen, wie NKT- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die ebenfalls wichtige immunologische Funktionen ausüben. Bisher liegen zu den genannten T-Zell-Subpopulationen keine Daten bezüglich ihrer Reagibilität gegenüber psychischem Stress vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher nähere Kenntnisse zu stressinduzierten Veränderungen in der T-Zell-vermittelten, adaptiven Immunität zu gewinnen.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Psychoneuroimmunologie

Die Psychoneuroimmunologie (PNI) beschreibt ein vergleichsweise junges, interdisziplinäres Forschungsfeld, das Immunologie, Psychologie, Endokrinologie, Physiologie, Psychiatrie und Neurowissenschaften gleichermaßen integriert. Hier werden in unterschiedlichen Ansätzen die Interaktionen zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS), dem endokrinen System und dem Immunsystem, sowie deren Einfluss auf Gesundheit und Krankheit untersucht (Glaser et al. 2005, Ader 2007).

Der Begriff wurde maßgeblich von Robert Ader und Nicholas Cohen geprägt, den Pionieren des Fachs, die bereits 1975 am Tierversuch mit Ratten einen direkten Einfluss psychischer Konditionierung auf die Immunantwort zeigen konnten und damit einen entscheidenden Schritt taten, um eine Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem nachzuweisen (Ader et al. 1975). Eine Arbeitsgruppe aus Essen konnte fast drei Jahrzehnte später zeigen, dass dieses Modell auf den Menschen übertragbar ist. Ihnen gelang der Nachweis, dass sich die Immunantwort durch einen Placeboeffekt auch beim Menschen unterdrücken lässt (Goebel et al. 2002).

Neben Untersuchungen zu Verhaltenseinflüssen auf das Immunsystem sind die Auswirkungen von Stress auf unsere Abwehr zu einem zentralen Forschungsgegenstand im Bereich der Psychoneuroimmunologie geworden. So lagen allein zur Untersuchung der komplexen Zusammenhänge von Stress und Immunsystem beim Menschen bereits 2004 über 300 Studien zur Untersuchung für eine Metaanalyse vor. Sie liefern gute Evidenz, dass psychischer Stress in der Tat verschiedenste Immunfunktionen modifizieren kann (Seegerstrom et al. 2004, Ader 2007).

Die vormals streng dualistische Betrachtungsweise von Körper und Psyche ist durch die gewonnenen Erkenntnisse überholt. Man weiß, dass ZNS und Immunsystem eng miteinander verknüpft sind und keineswegs als unabhängige Systeme funktionieren (Wrona 2006, Ader 2007). So erhält das ZNS Informationen vom Immunsystem und vice versa modulieren Informationen aus dem Gehirn immunologische Funktionen. Hauptziel dieser Interaktionen ist der Erhalt der Homöostase und damit unserer Gesundheit (Elenkov et al. 2000).

### 2.2 Psychophysiologische Stresskonzepte

Wie definiert man Stress? Stress ist ein wesentlicher Teil unseres modernen Lebens und während er für Einzelne anregend ist, bedeutet Stress doch für die große Mehrheit der Menschen eine Last (Nitsch 1981, Dhabhar 2003). So hat dieser Terminus individuell unterschiedliche Bedeutung, ist aber in unserer Gesellschaft eindeutig negativ behaftet und wird umgangssprachlich recht einheitlich zur Bezeichnung alltäglicher Belastungssituationen verwendet.

Die Allgegenwart des Stressphänomens spiegelt sich auch in der Vielfalt wissenschaftlicher Stresskonzepte wieder. Hier gibt es drei wesentlich unterschiedliche Ansätze - die biologische, psychologische und soziologische Stressforschung. Die nachfolgende Auswahl befasst sich mit dem Begriff Stress aus biologischer Sicht.

Eine erste Stresstheorie lieferte der amerikanische Physiologe Walter B. Cannon 1914 (Cannon 1914). Noch vor der begrifflichen Einführung von Stress beschrieb er die sogenannte Notfallreaktion bei der Konfrontation mit physischen oder psychischen Belastungen. Er beobachtete eine Erregung des sympathischen Nervensystems bei gleichzeitiger Hemmung des parasympathischen Nervensystems zur Bereitstellung von Ressourcen, die es dem Individuum ermöglichen zu kämpfen oder zu fliehen. Die „Fight or Flight“ - Reaktion versetzt den Körper in Alarmbereitschaft, vermittelt über eine Aktivierung des Sympathikus mit nachfolgender Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark und postsynaptischer Nervenenden (Schedlowski 1994). Die Notfallreaktion dient der Mobilisierung von Energie zum Erhalt beziehungsweise der Wiederherstellung der Homöostase.

1936 entlehnte Hans Selye den Begriff Stress aus der Physik um die „unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung“ zu benennen (Selye 1936). Er begründete die Lehre vom Adaptationssyndrom für stressbedingte Reaktionen des Körpers. Als charakteristische Veränderungen beschrieb Selye die Symptomtrias aus Vergrößerung der Nebennierenrinde, Atrophie lymphatischer Organe und Magen-Darm-Ulzera. Er beobachtete im Tierversuch, dass verschiedenste Belastungen (Hitze, Kälte, Elektroschocks, körperliche Immobilisierung) zur gleichen, unspezifischen Reaktion führten und sah die Stresstrias als allgegenwärtiges Zeichen körperlicher Schädigung bei Belastung und damit als objektiven Stressindikator.

Das allgemeine Adaptationssyndrom nach Selye entwickelt sich in drei Phasen: einer ersten Alarmreaktion, gefolgt von einer Phase der Gegenwehr (Widerstandsphase) und schließlich der



Erschöpfung, mit irreversiblen Schädigungen bis hin zum Tod (Selye 1950). Hans Selye definierte Stress demnach als unspezifische Reaktion des Organismus auf jegliche Form von Anforderung.

Das Konzept der Unspezifität der Stressreaktion wurde vielfach angezweifelt und durch John Mason 1971 revidiert. Denn er stellte eine Stressreaktion nur dann fest, wenn Stressoren den Organismus gleichzeitig auch in einen Zustand erhöhter emotionaler Erregung versetzten. Die begleitende Erregung galt für ihn als Hauptmediator der Stressreaktion. Mason definierte Stress demnach als eine sehr spezifische Anpassungsleitung des Organismus unter Einbezug der emotionalen Reaktion (Mason 1971).

Ein integrativer Definitionsansatz von Seymour Levine und Holger Ursin 1991 definiert Stress als integralen Teil eines adaptiven biologischen Systems, wobei diese Adaptation notwendig ist, um sich an ständig ändernde Umweltbedingungen anzupassen. Dabei werden drei Hauptkomponenten unterschieden: Stressstimulus, stressverarbeitendes System und Stressantwort (Levine et al. 1991). Eine ähnliche Definition legen Dhabhar und McEwen 1997 ihren Ausführungen zu Grunde.

Trotz jahrzehntelanger Forschungen zu verschiedensten Aspekten von Stress konnte die Wissenschaft bislang keinen zufriedenstellenden Konsens bezüglich der Definition von Stress finden. Es handelt sich nicht um einen einheitlichen, präzisen, wissenschaftlichen sondern vielmehr einen unspezifischen Begriff. In allgemeiner Form hat Stress etwas mit der Anpassung von Lebewesen an ihre jeweilige Umwelt zu tun - zumindest hierin besteht weitgehende Übereinstimmung (Nitsch 1981).

Die meisten neueren psychoneuroimmunologischen Studien zu diesem Thema definieren Stress simpel als Lebensumstände, die von der Mehrzahl der Individuen als stressig empfunden werden und somit als Stressoren zu bezeichnen sind (Seegerstrom et al. 2004). Als Stressoren werden hierbei in der Regel Stimuli bezeichnet, welche die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA) -Achse und/ oder das sympathische Nervensystem (SNS) aktivieren, um den Organismus physiologisch auf die Abwehr einer möglichen Bedrohung vorzubereiten (Black 2003).

## **2.3 Wege der Kommunikation zwischen zentralem Nervensystem, Immunsystem und neuroendokrinem System**

Es handelt sich um ein komplexes Netzwerk bidirektionaler Signale zwischen dem ZNS und dem Immunsystem. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und das Autonome Nervensystem stellen zwei Hauptwege der Kommunikation dar (Wrona 2006).

Stressoren können beide Systeme aktivieren und somit eine Ausschüttung von Hormonen aus der Hypophyse und den Nebennieren bewirken. Fast alle Immunzellen besitzen Rezeptoren für eines oder mehrere dieser Stresshormone. Der Einfluss auf das Immunsystem kann also direkt über die Rezeptorbindung an der Zelloberfläche oder indirekt über Botenstoffe, wie Neurotransmitter, Neuropeptide oder Zytokine erfolgen (Glaser et al. 2005, Schedlowski et al. 2006, Ader 2007).

Auf der anderen Seite können auch Immunzellen selbst Hormone wie ACTH, Prolaktin und Wachstumshormon produzieren (Weigent et al. 1997). Das Immunsystem und das neuroendokrine System nutzen demnach gemeinsame Mediatoren sowie gemeinsame Rezeptoren. Zusätzlich konnte tierexperimentell die nervale Versorgung von primären und sekundären lymphatischen Organen mit noradrenergen Nervenfasern dokumentiert werden (Felten et al. 1987, Stevens-Felten et al. 1997). Die funktionellen Zusammenhänge dieser morphologischen Beobachtung wurden beispielsweise durch operative Denervierung im Tierversuch belegt (Madden et al. 1995).

Nicht zu vergessen ist das Verhalten, welches ebenfalls Einfluss auf unser Immunsystem hat. Menschen unter Stress schlafen schlechter, ernähren sich ungesünder, trainieren weniger und neigen zu Alkohol- und Nikotinabusus. Auf diesem Wege kann eine psychische Belastungssituation ebenfalls das Immunsystem negativ beeinflussen und die Anfälligkeit für Krankheiten steigern (Glaser et al. 2005, Ader 2007).

### **2.3.1 Die HPA-Achse**

Eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem neuroendokrinen System und dem Immunsystem über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse wurde erstmals 1975 beschrieben (Besedovsky et al. 1975). Hierbei handelt es sich um eine physiologische Feedbackschleife zwischen ZNS (Hypothalamus) und endokrinen Organen (Hypophyse, Nebennierenrinde) zur Regulation der Ausschüttung von Glukokortikoiden.

Es ist belegt, dass die HPA-Achse durch die Gabe von Zytokinen, wie IL-1, IL-6 oder IFN- $\alpha$  aktiviert und zur Hormonsekretion angeregt werden kann. Zellen des paraventriculären Nucleus

des Hypothalamus schütten daraufhin vermehrt Corticotropin-releasing Hormon (CRH) aus (Armario 2006). CRH seinerseits stimuliert die Freisetzung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen und schließlich die Synthese und Sekretion von endogenen Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde. Die Freisetzung von Glukokortikoiden durch die Aktivierung der HPA-Achse findet jedoch, im Vergleich zur sympathischen Aktivierung, zeitlich verzögert statt.

Allgemein werden glukokortikoide Stresshormone als immunsuppressiv betrachtet und klinisch als antiinflammatorische Agenzien verwendet. Körpereigene Glukokortikoide, wie Cortisol, können aber sowohl immunsuppressive, als auch immunstimulierende Effekte vermitteln (Sapolsky et al. 2000). Neuere Studien zeigen, dass Glukokortikoide in physiologischer Konzentration zudem eine immunmodulierende Wirkung über einen Shift von Th1- zu Th2-Zytokinen entfalten, eine Allergie vom Spättyp (Typ IV-Allergie nach Coombs und Gell) verstärken können und die angeborene Immunität gegen Bakterien und Viren regulieren (Sternberg 2001, 2006). Aber auch die Hypophysenhormone, das Wachstumshormon und Prolaktin, können eine Vielzahl immunologischer Funktionen beeinflussen (Hooghe et al. 1993).

Eine überschüssige Bildung von Stresshormonen kann zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führen, während eine inadäquate Produktion ihrerseits entzündliche Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten und Allergien begünstigt. Auch iatrogene Störungen der HPA-Achse, beispielsweise durch chirurgische oder pharmakologische Interventionen, steigern im Tierversuch die Infektanfälligkeit und Mortalität von Mäusen, wobei andererseits eine Behandlung mit exogenen Glukokortikoiden oder eine Hypothalamustransplantation diese Effekte umkehrt und die Mortalität senkt (Sternberg 2006).

### **2.3.2 Das Sympathische Nervensystem (SNS)**

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems erfolgt über Neurone im Hirnstamm im Bereich des Locus coeruleus und führt zur Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus terminalen sympathischen Nervenendigungen und dem Nebennierenmark. Es gibt nachweislich eine direkte sympathische Innervation der primären und sekundären lymphatischen Organe (Shimizu et al. 1994, Elenkov et al. 2000). Katecholaminerge Effekte werden durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren vermittelt und zeigen sich unmittelbar unter Einfluss eines Stressors, das heißt innerhalb weniger Minuten (Herbert et al. 1994).

Adrenalin und Noradrenalin bewirken eine Bandbreite physiologischer Veränderungen, wie eine Erhöhung der Herzfrequenz, eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Körpers, eine Steigerung der Durchblutung von Muskeln und Gehirn sowie die Bereitstellung von Zucker durch die Leber (Schedlowski 1994). All diese Reaktionen bereiten den Körper in Notsituationen auf eine „Fight or Flight“ - Reaktion vor. Aber auch Lymphozyten und andere Immunzellen exprimieren Adrenorezeptoren und werden so von zirkulierenden Katecholaminen beeinflusst. Adrenorezeptoren finden sich nachweislich auf NK-Zellen, B-Zellen und  $CD4^+$  und  $CD8^+$ -T-Lymphozyten (Landmann 1992, Schedlowski 1994). Auf das Immunsystem entfalten Katecholamine immunstimulierende aber auch immunsuppressive Wirkung. Auch ihnen wird somit eine immunomodulatorische Wirkung zugesprochen. So scheinen Katecholamine ebenso wie Glukokortikoide die Th1-Immunantwort und damit die zelluläre Immunität zu supprimieren und zu einem Th2-Shift hin zur humoralen Immunität zu führen (Elenkov et al. 2000).

### 2.4 Funktionen des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem schützt den Organismus vor Schaden durch eindringende Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Auch eine immunologische Kontrolle der Entstehung und Fortentwicklung von Krebserkrankungen wird angenommen. Für diese immunologischen Grundfunktionen ist es essentiell, dass unser Körper zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden vermag und eine effiziente, jedoch nicht überschießende Immunreaktion erfolgt. Gibt es hier Defizite, so entstehen Autoimmunkrankheiten und Allergien. Speziell für das Verständnis der Zusammenhänge zwischen psychosozialen Stressoren und dem Immunsystem ist es notwendig zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität zu unterscheiden.

Das *angeborene Immunsystem* bildet eine erste Verteidigungslinie und entfaltet seine Wirkung sehr schnell (innerhalb von Minuten bis Stunden), wirkt aber unspezifisch auf verschiedenste Pathogene. Zu den protektiven Mechanismen zählen der Säureschutzmantel der Haut, Lysozym, das Komplementsystem und zelluläre Bestandteile wie Phagozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Zytokine. NK-Zellen, als Teil der angeborenen Immunität, haben große Bedeutung in der frühen Phase der Virusinfektion, noch bevor die spezifische Abwehr Wirkung zeigt. Sie erkennen zusätzlich körpereigene, entartete Zellen und greifen diese direkt an. Nach Exposition

gegenüber Stress konnte verlässlich ein Anstieg der NK-Zellzahl sowie eine verstärkte Zytotoxizität im Blut nachgewiesen werden (Segerstrom et al. 2004)

Die wesentlichen Merkmale der *erworbenen, adaptiven Immunität* sind deren Spezifität sowie die Ausbildung eines Gedächtnisses bei gleichzeitig verzögertem Wirkungseintritt im Vergleich zu den oben beschriebenen Mechanismen. Bestehend aus einem zellulären und einem humoralen Anteil, reagiert das erworbene Immunsystem immer antigenvermittelt und damit hochspezifisch. T-Lymphozyten besitzen Rezeptoren auf Ihrer Zelloberfläche, während B-Lymphozyten als sogenannte Plasmazellen frei zirkulierende Rezeptoren (Immunglobuline) bilden und den humoralen Teil ausmachen. In der zellulären, adaptiven Immunität spielen T-Zellen die Schlüsselrolle.

### 2.5 Stress und sein Einfluss auf unser Immunsystem

Verschiedene Stressoren können das Zusammenspiel von ZNS, endokrinem System und Immunsystem stören und zu einer Dysregulation der Immunantwort und damit zu Krankheit führen.

Zunächst verbreitete sich der Glaube, dass Stress das Immunsystem generell supprimiert. Heute weiß man, dass Stress zu Immunsuppression mit erhöhter Anfälligkeit für Infektionen führt, sich gleichzeitig aber auch entzündliche Erkrankungen, wie Psoriasis, Arthritis und Asthma bronchiale unter Stress verschlechtern können (welche sich unter Immunsuppression verbessern sollten). Aus diesem Paradoxon entstand die Hypothese, dass Stress einen bidirektionalen Einfluss auf unser Immunsystem haben muss, der unsere Abwehr sowohl schwächen als auch stärken kann (Dhabhar 2009). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass akuter Stress heilende, adaptive Effekte vermittelt (Sapolsky et al. 2000), während Langzeitstress gesundheitsschädlich sein kann (Dhabhar et al. 1997b, Sapolsky et al. 2000, Dhabhar 2003, Glaser et al. 2005).

Eine Differenzierung von Stress nach dessen Dauer und Intensität ist daher essentiell. Stressoren werden beispielsweise in akute, zeitlich limitierte und chronische Stressoren unterschieden (Segerstrom et al. 2004). Während akuter Stress von kurzer Dauer (Minuten bis wenige Stunden) ist, hält chronischer Stress meist über Tage bis hin zu Monaten und Jahren an.

Unter chronischem Stress zeigten sich in Studien mit Influenzaviren mit älteren Probanden klare Defizite sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Abwehr (Kiecolt-Glaser et al. 1996).

Auch bei jungen, gesunden Probanden wurde unter dem Einfluss chronischer Stressoren eine abgeschwächte Immunantwort nach Impfung mit Influenzaviren (Miller et al. 2004), Hepatitis B-Viren, Rötelnviren und Pneumokokken dokumentiert (Glaser et al. 1992, Morag et al. 1999, Burns et al. 2002). Zusätzlich wurden häufiger Rückfälle oder Reaktivierungen von Herpes simplex- (Cohen et al. 1999, Glaser et al. 2005), Epstein-Barr- und Cytomegalievirusinfektionen beobachtet (Glaser et al. 2005). Gut belegt ist zudem eine beachtliche Verzögerung der Wundheilung unter Stress durch eine gestörte Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 und TNF- $\alpha$  (Kiecolt-Glaser et al. 1995, Marucha et al. 1998).

Chronischer Stress hat demnach vielfältige, gesundheitsrelevante Folgen. Er führt nachweislich zu erhöhter Infektanfälligkeit, abgeschwächter Impfreaktion, Reaktivierung latenter Virusinfektionen und verzögerter Wundheilung (Glaser et al. 2005).

Betrachtet man die Studienlage zu Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf die zellulären Funktionen des Immunsystems, so konnte bisher ein Anstieg von NK-Zellen und großen, granulierten Lymphozyten im peripheren Blut am besten belegt werden (Segerstrom et al. 2004). Diese Beobachtung unterstützt die These, dass akute Stressoren zu einer Umverteilung der Immunzellen in die Kompartimente führen, wo sie am effektivsten der Abwehr dienen. Für B-Lymphozyten und T-Helferzellen konnte eine solche Umverteilung metaanalytisch bisher nicht überzeugend gezeigt werden, während zytotoxische T-Zellen im peripheren Blut zuverlässig anstiegen (Segerstrom et al. 2004). Zusätzlich konnten eine Reihe stressinduzierter funktioneller Effekte nachgewiesen werden. So steigt die Zytotoxizität von NK-Zellen signifikant an, während es zu einem Abfall der mitogen-induzierten Proliferation von B- und T-Zellen kommt. Schließlich wurde unter akutem Stress eine verstärkte Zytokinproduktion von IL-6 und IFN- $\gamma$  beobachtet. So schlussfolgern Segerstrom und Miller, dass akuter Stress zu einer Stärkung der angeborenen Immunität bei gleichzeitiger potentieller Schwächung der spezifischen Abwehr führt (Segerstrom et al. 2004).

Widersprüchlich erscheint jedoch die Beobachtung eines signifikanten Anstiegs von sekretorischem Immunglobulin A im Speichel unter akutem Stress. Auch dieser Effekt scheint auf einer Umverteilung von Immunzellen, in diesem Fall jedoch Plasmazellen, als Teil der spezifischen Abwehr, zu beruhen. Denn die Dauer akuter Stressoren ist zu kurz für eine mögliche Neusynthese (Bosch et al. 2002). Zudem konnte die Arbeitsgruppe um Dhabhar im Tiermodell eine stressinduzierte Umverteilung von T-Zellen in die Haut und anderer Orte der Immunaktivierung (beispielsweise nach Implantation eines Fremdkörpers) beobachten sowie

eine verbesserte Impfantwort unter akutem Stress und damit eine Stärkung auch adaptiver Immunfunktionen zeigen (Dhabhar et al. 1997a, Viswanathan et al. 2005). Diese stressinduzierte Leukozytenwanderung kann eine verstärkte Immunoprotektion während Operationen, Impfungen oder Infektionen vermitteln, gleichzeitig aber auch die Immunopathologie im Falle von Inflammation und Autoimmunerkrankungen verschlimmern. Auch die kürzlich beobachtete Umverteilung peripher zirkulierender T-Zellen stärkt die Bedeutung des erworbenen Immunsystems unter akuten Belastungssituationen (Atanackovic et al. 2006, Freier et al. 2010) und damit die These, dass akuter Stress im Sinne einer „Fight or Flight“-Reaktion zur optimalen Bereitstellung von Ressourcen sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität stärkt. Sie zeigt, dass quantitative Veränderungen peripherer Immunzellen als Umverteilung in verschiedene Kompartimente infolge von Migrationsvorgängen betrachtet werden müssen.

## **2.6 Spezielle Grundlagen zur erworbenen, zellulären Immunität**

### **2.6.1 T-Zell-vermittelte Immunität**

T-Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks und wandern als Thymozyten über die Blutbahn im Bereich der Rinden-Mark-Grenze in den Thymus ein. Hier findet die Differenzierung und Reifung der Zellen statt, bevor die entstandenen T-Lymphozyten (T-Zellen) aus dem Thymus emigrieren um andernorts ihre Funktion auszuüben. Die Reifung im Thymus dauert maximal 4-5 Tage und umfasst neben der positiven Selektion der Zellen, die später entweder MHC I- oder MHC II-Moleküle erkennen können (CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen) auch die Negativselektion von autoreaktiven Zellen und die Entwicklung regulatorischer Funktionen in Subpopulationen wie NKT-Zellen oder anderen regulatorischen T-Zellen (Roitt et al. 1995).

T-Zellen emigrieren wahrscheinlich sowohl über das Blut als auch über die Lymphbahnen (Weinreich et al. 2008) und gelangen so zu den sekundären lymphatischen Organen um anschließend im Blut zu rezirkulieren, bis sie schließlich auf ihr spezifisches Antigen treffen. Sie sind gekennzeichnet durch einen membranständigen T-Zellrezeptor (TZR) und können Antigene nur als Antigen-MHC-Komplex auf Zelloberflächen antigenpräsentierender Zellen (APC), wie Dendritischen Zellen (DC) oder Makrophagen sowie virusinfizierten Zellen erkennen. Antigenunerfahrene, naive T-Zellen wandeln sich durch den Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen in Effektor-T-Zellen. Diese unterscheidet man je nach erkanntem Antigen,

Oberflächenmarkern und Zytokinproduktion in drei funktionelle Klassen. Peptide intrazellulärer Pathogene aus dem Zytoplasma werden den CD8<sup>+</sup> T-Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert, die sich daraufhin in zytotoxische T-Zellen differenzieren und direkt virusinfizierte Zellen abtöten. Intrazelluläre Pathogene aus Vesikeln und extrazelluläre Pathogene hingegen werden den CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert, die wiederum je nach Zytokinprofil in Th1- und Th2-Effektorzellen ausdifferenzieren können (Janeway et al. 2001). Gleichzeitig bildet sich ein immunologisches Gedächtnis in Form von Gedächtnis-T-Zellen aus. Sie resultieren aus der klonalen Expansion nach Antigenkontakt, können lebenslang erhalten bleiben und führen zu einer beschleunigten und effektiveren Abwehrreaktion bei erneutem Antigenkontakt (Sallusto et al. 2004).

### **2.6.2 unkonventionelle T-Zellsubpopulationen und ihre Marker**

#### **NKT-Zellen, 6B11, $\alpha$ -GalCer-geladenes CD1d-Tetramer**

Als Natural Killer T-Zellen (NKT-Zellen) wird eine Lymphozytensubpopulation bezeichnet, die von gewöhnlichen T-, B- oder NK-Zellen abzugrenzen ist. Es handelt sich um eine 1995 erstmals benannte, heterogene Zellgruppe in Mäusen, gekennzeichnet durch die Koexpression von NK-Zell-Rezeptoren (NK1.1) und dem T-Zell-Rezeptor (TZR). Der Begriff ist heute akzeptiert und wird für Mäuse, Menschen und andere Spezies gleichermaßen verwendet, auch wenn die traditionelle Definition durch weiterführende Studien heute sehr problematisch ist. Denn heute ist klar, dass es verschiedene NKT-Zell-Subpopulationen und andere T-Zellen gibt, die den NKT-Zellen ähneln (Godfrey et al. 2004). So kann man Typ 1-NKT-Zellen von Typ 2-NKT-Zellen und NKT ähnlichen T-Zellen unterscheiden.

Die Mehrheit der menschlichen NKT-Zellen exprimiert eine semi-invariante V $\alpha$ 24-Kette oftmals in Kombination mit einer V $\beta$ 11-Kette (Porcelli et al. 1993). Diese NKT-Zellen werden genauer als invariant-chain-NKT-Zellen (iNKT) bzw. Typ 1-NKT-Zellen oder klassische NKT-Zellen bezeichnet und sind am besten untersucht. Sie lassen sich beim Menschen in weitere drei Subpopulationen mit möglicherweise verschiedenen physiologischen Funktionen definieren: doppeltnegative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, DN), CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iNKT-Zellen.

Über das MHC I-Molekül CD1d werden den iNKT-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen Antigene dargeboten und so die Mehrzahl der iNKT-Zellen aktiviert (Exley et al. 1997). Auch



wenn endogene Liganden bislang noch unbekannt sind, kann ein Glykosphingolipid namens  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) als Ersatzstoff für einen natürlichen CD1d-Liganden verwendet werden (Kawano et al. 1997, Spada et al. 1998). CD1d-reaktive T-Zellen werden den natürlichen Gedächtniszellen zugeschrieben, da sie anscheinend eine Lücke zwischen angeborener und erworbener Immunität überbrücken. Sie scheinen außerdem ein limitiertes Antigenrepertoire zu haben (Thomas et al. 2003). Der zuverlässigste Nachweis von iNKT-Zellen beim Menschen, wie auch bei Mäusen, ist die Verwendung von  $\alpha$ GalCer-geladenem CD1dTetramer (Godfrey et al. 2004). Es handelt sich dabei um einen Komplex aus vier CD1d-Molekülen, beladen mit  $\alpha$ -Galactosylceramide, das große Affinität zur Detektion des semi-invarianten T-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche von iNKT-Zellen besitzt. Dieses CD1d-reaktive Glykolipidantigen wird synthetisiert oder aus Meeresschwämmen gewonnen.

Zusätzlich können zur quantitativen Bestimmung der iNKT-Zellen im peripheren Blut entweder Antikörper gegen V $\alpha$ 24 und V $\beta$ 11 verwendet werden oder der neuere, monoklonale Antikörper 6B11. Dieser ist spezifisch für die CDR3-Schleife der V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 TZR  $\alpha$ -Kette beim Menschen und wurde speziell für die spezifische Charakterisierung von iNKT-Zellen entwickelt (Montoya et al. 2007).

NKT-Zellen sind im gesamten Körper anzufinden, scheinen sich aber in bestimmten Geweben bevorzugt anzuhäufen. Untersuchungen an Mäusen zeigten besonders in Leber, Knochenmark und Thymus Anreicherungen von NKT-Zellen. Mittlere Konzentrationen wurden in Milz, Blut und Lunge und die niedrigsten Konzentrationen im Lymphknoten gefunden (Wilson et al. 2002). Thymus und Leber NKT-Zellen sind meist CD4<sup>+</sup> oder DN, während sich in Milz und Knochenmark DN und CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen anreichern (Eberl et al. 1999). Hierbei muss zusätzlich zwischen CD1d-abhängigen und CD1d-unabhängigen NKT-Zellen unterschieden werden, wobei letztere besser als NKT-ähnliche Zellen bezeichnet werden sollten (Godfrey et al. 2004). Beim Menschen ist im peripheren Blut eine sehr viel niedrigere Zellzahl im Vergleich zu Mäusen vorhanden. Es ist daher zu vermuten, dass CD1d-reaktive T-Zellen ihre Funktion überwiegend im Gewebe und nicht in sekundären lymphatischen Organen ausüben (Thomas et al. 2003).

iNKT-Zellen scheinen eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunantworten zu spielen. So wird ihnen Bedeutung in der Abwehr von bakteriellen und parasitären Infektionen sowie im Schutz vor der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Allergien zugesagt (Godfrey et

al. 2000). Für eine Vielzahl systemischer Autoimmunerkrankungen wie Sklerodermie, Lupus erythematoses, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerosis und Typ-I Diabetes mellitus wurde ein selektiver Abfall der iNKT-Zellzahl und Funktion beschrieben. Eine Untersuchung an Patienten mit Wegener Granulomatose und rezidivierender Polychondritis zeigte ebenfalls eine verminderte iNKT-Zellzahl. Hingegen zeigten andere Studien bei Patienten mit Morbus Basedow und Zöliakie eine normale Anzahl an iNKT-Zellen im peripheren Blut und bei Patienten mit Myasthenia gravis sogar eine vermehrte Zellzahl (van der Vliet et al. 2001), so dass die Datenlage zur Rolle von iNKT-Zellen bei Autoimmunerkrankungen insgesamt etwas widersprüchlich ist.

Auf der anderen Seite wird iNKT-Zellen eine wichtige Rolle in der Induktion von Transplantattoleranz zugeschrieben. Bei Patienten, die nach Transplantation eine akute Graft-versus-Host-Disease (GvHD) entwickelten, wurden signifikant niedrigere  $V\alpha 24^+$ NKT-Zellzahlen beobachtet (Haraguchi et al. 2004). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte an Mäusen zeigen, dass es sich bei NKT-Zellen um Effektorzellen handelt, die den Schweregrad einer GvHD reduzieren (Haraguchi et al. 2005). Andererseits können iNKT-Zellen auch das Anwachsen eines Transplantates verzögern und unter bestimmten Umständen auch zur Transplantatabstoßung führen. So scheint der quantitative und/ oder funktionelle Defekt von iNKT-Zellen eine direkte oder indirekte Rolle nicht nur bei der Entwicklung einer Vielzahl von Autoimmunkrankheiten zu spielen sondern ebenso bei der Regulation von Transplantatabstoßung.

### **$\gamma\delta$ -T-Zellen**

Hierbei handelt es sich um eine kleine Subpopulation von T-Zellen mit potenter zytotoxischer Aktivität gegen verschiedene Tumorzellen, Bakterien und Viren (Kabelitz et al. 2007) an der Grenze zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr. Ihr Kennzeichen ist ein zweiter T-Zell-Rezeptor (TZR), der erstmals 1986 von Brenner bei der Sequenzierung des konventionellen  $\alpha\beta$ -TZR entdeckt wurde und in Analogie  $\gamma\delta$ -TZR genannt wurde (Brenner et al. 1986). Der Anteil an  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut erwachsener Menschen ist mit 1-5%, maximal 10% aller T-Zellen gering, ein größerer Anteil findet sich beispielsweise in der Haut oder dem Gastrointestinaltrakt, wo ihr Anteil bis zu 50% betragen kann (Carding et al. 2002). Kennzeichen humaner  $\gamma\delta$ -Zellen ist ihre molekulare, phänotypische und funktionelle Heterogenität (Hayday 2000). Im peripheren Blut gesunder Menschen überwiegt die Expression des  $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR (Bonneville et al. 2006, Kabelitz et al. 2007).

Die große Mehrheit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist doppeltnegativ für die Oberflächenmarker CD4 und CD8 und erkennt keine MHC-Moleküle. Sie erkennen jedoch Liganden auf Tumorzellen die von konventionellen  $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht erkannt werden und geben einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung neuer Immuntherapien gegen bestimmte Krebserkrankungen. Hier gibt es zwei Ansätze: zum einen den Transfer von in vitro expandierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen und zum anderen die therapeutische Applikation von  $\gamma\delta$ -aktivierenden Phosphoantigenen oder Aminobisphosphonaten in vivo zusammen mit niedrigdosiertem IL-2 (Kabelitz et al. 2007, Kabelitz 2010).

### 2.6.3 Das Th1/ Th2-Modell

Die Th1/ Th2-Hypothese kam 1986 auf, als damalige Forschungsarbeit an Mäusen zwei Subtypen von T-Helferzellen vermuten ließ, welche sich anhand unterschiedlicher Zytokinexpressionsmuster und Funktionen unterscheiden ließen (Mosmann et al. 1986). Dieses Konzept wurde auf den Menschen übertragen und die verschiedenen Wege der Abwehr durch Th1- und Th2-Zellen wurden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Mosmann et al. 1989, Parronchi et al. 1991). Die vorgeschlagene Unterteilung zytokinproduzierender Zellen in Th1- und Th2-Subtypen hat die Forschung und damit die Entdeckung wichtiger immunregulatorischer Mechanismen stimuliert (Kelso 1995). Da T-Helferzellen mit Abstand die effektivsten Zytokinproduzenten sind, wird meist von Typ 1- und Typ 2-Helferzellen gesprochen. Genauso lassen sich aber auch zytotoxische T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen unterscheiden.

Während die zelluläre Abwehr scheinbar direkt gegen intrazelluläre Pathogene (Viren, Tumorzellen) gerichtet ist und durch eine bestimmte Population von T-Helferzellen, die Th1-Zellen koordiniert wird, scheint die humorale Abwehr gegen extrazelluläre Pathogene (Bakterien und Parasiten) gerichtet zu sein und wird indirekt über die Induktion der Antikörperbildung durch Th2-Zellen vermittelt. Beide Zelltypen unterscheiden sich entscheidend anhand ihres Zytokinprofils, aber auch anhand ihrer Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Kidd 2003). Th1-Zellen produzieren überwiegend IL-2, IFN- $\gamma$  und proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\beta$  zur Aktivierung der angeborenen und der T-Zell-vermittelten Immunabwehr. Zu den Th2-typischen Zytokinen zählen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Sie aktivieren selektiv B-Zellen zur Antikörperproduktion sowie Mastzellen. Beide Zelltypen produzieren IL-3, TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Mosmann et al. 1989, Kelso 1995, Kidd 2003) und entwickeln sich aus naiven Vorläufer-T-

Zellen (Th0) (Mosmann et al. 1989).

Für einen gesunden Menschen scheint die Th1/ Th2-Balance von entscheidender Bedeutung für den Gesundheitszustand zu sein. So führt die Dominanz von Typ 2-Helferzellen zu einer erhöhten immunologischen Toleranz gegenüber körperfremden Substanzen aber auch des Fetus in der Schwangerschaft. Eine Verschiebung in die eine oder andere Richtung kann verschiedene Krankheiten verursachen oder begünstigen. Gut belegt ist bei Infektionskrankheiten, wie Lepra, hier ist eine starke humorale Immunantwort ineffektiv, während die zelluläre Immunität die meisten Bakterien zu eliminieren vermag. Während eine überschießende Th1-Immunantwort jedoch gleichzeitig zu Gewebeschäden führen und Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, Typ 1-Diabetes und Multiple Sklerose verursachen kann (Kidd 2003), begünstigt ein Ungleichgewicht zu Gunsten der Th2-Antwort chronisch-entzündliche Erkrankungen der Atemwege, wie Asthma bronchiale und die Entstehung von Allergien (Wan 2010).

Das Th1/ Th2-Modell zeigt jedoch auch große Schwächen. Das ursprüngliche Konzept nach Mosmann et al. wird mittlerweile von vielen Forschungsgruppen als nur für bestimmte Krankheitsbilder klar zutreffend erachtet, da viele Th-Klone eine Mischung aus einem Th1-/ Th2-typischem Zytokinmuster zeigen. So scheinen die beschriebenen „klassischen“ Th1-/ Th2-Zytokinmuster eher extreme Differenzierungsstadien eigentlich fließender Übergänge darzustellen (Kelso 1995). Außerdem wurde ein Einfluss verschiedener Nahrungsmittel und Hormone auf die Th1/ Th2-Balance nachgewiesen, so dass das ursprüngliche Modell allzu sehr vereinfacht scheint (Kidd 2003).

Neuere Studien konnten zudem eine weit größere Heterogenität an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zeigen als vormals angenommen. So konnten zahlreiche zusätzliche Subpopulationen, wie Th3-, Th17- (Harrington et al. 2006, Weaver et al. 2006), Th9- (Dardalhon et al. 2008, Veldhoen et al. 2008), Th22-Zellen (Eyerich et al. 2009) sowie folliculäre T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen definiert werden (Abbey et al. 1993, Ma et al. 2010, Wan 2010). Interessanterweise lässt die aktuelle Literatur die Fähigkeit zur Transformation von einer in eine andere Subpopulation vermuten, sowohl in vitro als auch in vivo. Es wurde beispielsweise eine Konversion regulatorischer T-Zellen in Th17-Zellen unter dem Einfluss von IL-6 beschrieben.

Trotz aller Limitationen behält die Th1/ Th2-Theorie weiterhin signifikante Aussagekraft und wird im Zusammenhang mit Stress untersucht. Vorausgegangene Untersuchungen konnten unter Stress einen Shift von Th1- hin zu Th2-Zell-Aktivität zeigen (King et al. 2006, Pincus-Knackstedt et al. 2006, Montoro et al. 2009).

## 2.6.4 Differenzierung von Th1-/ Th2-Zellen anhand von Oberflächenmarkern

### CD226 = DNAM1

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül CD226 (DNAM1) ist ein 1996 neu entdeckter Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie mit den Liganden CD112 und CD155. Er wird sowohl auf NK-Zellen als auch auf T-Zellen exprimiert (Shibuya et al. 1996) und hat wichtige Funktionen in der Vermittlung von NK- und T-Zell-vermittelter Zytotoxizität sowie in der Signaltransduktion der T-Zell-Aktivierung und Differenzierung. An Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass CD226 die Tötung von unreifen dendritischen Zellen durch natürliche Killerzellen vermittelt (Seth et al. 2009). Die Arbeitsgruppe um Dardalhon konnte zeigen, dass CD226 spezifisch auf der Oberfläche von Th1-Zellen exprimiert wird und so deren Entwicklung und Effektorfunktionen reguliert (Dardalhon et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit haben wir uns dies zu Nutze gemacht und CD226 als Marker für Th1-Zellen verwendet.

### CRTH2

Dieser zweite hochaffine Rezeptor für Prostaglandin 2 wurde 2001 nach dem D-prostanoid Rezeptor entdeckt. Beide Rezeptoren unterscheiden sich in der Signaltransduktion. Seit der Entdeckung gilt CRTH2 große Aufmerksamkeit zur Entwicklung potenter, selektiver Rezeptorantagonisten zur antiinflammatorischen Therapie bei Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis (Ulven et al. 2006). Die CRTH2-Funktion in vivo ist nicht abschließend geklärt, so scheint dieser Rezeptor PGD<sub>2</sub>-abhängige Zellmigration zu vermitteln und Th2-Zellen sowie eosinophile-, basophile Granulozyten und Mastzellen zu aktivieren (Hirai 2004). Er scheint zudem der zuverlässigste Marker zur Detektion von menschlichen TH2-Zellen zu sein (Saito et al. 2002). Wir verwendeten CRTH2 daher als Oberflächenmarker zur Detektion der Th2-Zellen in unserer Studie

### 3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Es gibt zahlreiche Studien, die sich mit den Auswirkungen von Stress auf unser Immunsystem beschäftigt haben und so gibt es bereits hohe Evidenz für einzelne, spezifische Veränderungen (Segerstrom et al. 2004). Dabei standen bisher Untersuchungen zur angeborenen Abwehr im Mittelpunkt. Erkenntnisse zu den Effekten von akutem psychischem Stress auf das angeborene Immunsystem sind bisher unzureichend und teils widersprüchlich. Besonders interessant erscheint die Untersuchung des Einflusses akuter Stressoren auf die T-Lymphozyten, die bekanntlich eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunität spielen. Hier gibt es bereits Untersuchungen zur Umverteilung von definierten T-Zell-Subpopulationen anhand des CD45RA- und CCR7-Rezeptors sowie deren Einfluss auf Effektormechanismen nach kurzzeitigem psychischem Laborstress im peripheren Blut (Atanackovic et al. 2006), sowie zu quantitativen Veränderungen von CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen und deren Effektormolekülen CTLA-4, GITR und LAP (Freier et al. 2010).

Die neuere Subpopulation der NKT-Zellen, insbesondere die iNKT-Zellen, werden seit einigen Jahren intensiver erforscht. So wurden bisher Studien an Patienten mit Asthma bronchiale (Koh et al. 2010a, Koh et al. 2010b) und im Zusammenhang mit Knochenmarktransplantationen durchgeführt. iNKT-Zellen scheinen sowohl immunsupprimierende als auch immunstimulierende Effekte in Abhängigkeit von Ihrem Zytokinprofil zu vermitteln und als regulatorische T-Zellen zu fungieren.

Auch die Gruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist im Zusammenhang mit Stress weitgehend unerforscht. Es lagen zu Untersuchungsbeginn nach meinem Kenntnisstand keine Untersuchungen zu iNKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen in akuten Stresssituationen am Menschen vor.

Sehr gut belegt ist hingegen ein Anstieg der NK-Zellzahl unter akutem psychischem Stress. NKT-Zellen besitzen, wie oben näher beschrieben, sowohl einen T-Zellrezeptor als auch NK-Zell-Rezeptoren, so dass man vermuten könnte, dass sie sich unter Einfluss akuter Stressoren den NK-Zellen gleichgerichtet verhalten.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen einen Beitrag zum näheren Verständnis der Umverteilung von unkonventionellen T-Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut unter akutem psychischem Stress leisten. Insbesondere wurden erstmals stressinduzierte Veränderungen von (i)NKT- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen unter kurzzeitigem, psychischem Laborstress detektiert und analysiert.

Zu diesem Zweck wurden folgende Hypothesen geprüft:

**Hypothese 1:** Unter akuter mentaler Belastung kommt es bei gesunden, männlichen Probanden zu einem Anstieg des prozentualen Anteils an CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen und einer gleichgerichteten Veränderung von 6B11<sup>+</sup> und CD1d-Tetramer<sup>+</sup> iNKT-Zellen im peripheren Blut.

**Hypothese 2:** Unter gleichen Versuchsbedingungen kommt es zu einem Anstieg des Anteils an  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut.

## 4 Probanden und Methoden

### 4.1 Probandenkollektiv

Mögliche Probanden wurden über öffentliche Aushänge und Informationsblätter auf die Studie aufmerksam gemacht. Die Probandenselektion erfolgte mittels telefonischer Information über Ablauf und Ziel der Studie, sowie Kontrolle der Ein- und Ausschlusskriterien anhand eines standardisierten Fragebogens.

#### **Einschlusskriterium:**

- männliches Geschlecht

#### **Ausschlusskriterien:**

- Hinweise auf das Vorliegen akuter oder chronischer Erkrankungen sowie Allergien
- vorangegangene Operationen
- regelmäßige Einnahme von Medikamenten
- Hinweise auf Nikotin- und/ oder Alkoholabusus sowie Drogenkonsum
- Vorliegen einer Nadelphobie
- Leistungssport
- Akute psychische Belastungssituation am Tag der Untersuchung ( z.B. Examen)

Auf diesem Weg wurden 34 geeignete Probanden ausgewählt. Die Daten von 31 gesunden, männlichen Probanden konnten schließlich zur Auswertung genutzt werden, da es in einem Fall zum Abbruch der Untersuchung wegen Unwohlsein nach Legen der Venenverweilkanüle und in zwei Fällen zu technischen Problemen in der Versuchsanordnung kam.

Alle Versuchsteilnehmer erhielten eine schriftliche Probandeninformation und eine Einverständniserklärung zur Unterschrift sowie eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 50



Euro aus den Mitteln der Forschungsförderung des Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Der Studienablauf war durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin geprüft und akzeptiert worden.

An den Untersuchungstagen sollten die Teilnehmer wie gewohnt frühstücken, jedoch auf die Einnahme koffeinhaltiger Getränke (Kaffee, Tee, Cola, Mate) verzichten.

## **4.2 Versuchsanordnung**

### **4.2.1 Ablauf der Untersuchung**

Die Untersuchungen fanden in den Räumen des Psychophysiologischen Labors des Instituts für Psychosomatik und Psychotherapie des Klinikums Benjamin Franklin in Berlin-Steglitz von Juni bis September 2005 statt. Vor Studienbeginn erfolgten mehrmalige Testversuche zur Optimierung des Versuchsablaufs. Das Labor befand sich in schallarmer Umgebung und war frei von zusätzlichen optischen Reizen. Die Raumtemperatur lag zwischen 20 und 26°C, die Luftfeuchtigkeit im Untersuchungsraum wurde kontrolliert. Es handelte sich um ein Zweiraumlabor, bestehend aus zwei voneinander getrennten Räumen. Die Probanden befanden sich während des Experimentes allein im Versuchsraum, während die Untersucherin die Geräte zur Erfassung der kardiovaskulären Parameter im Nebenraum steuerte und überwachte. Beide Räume waren über eine Gegensprechanlage akustisch miteinander verbunden. Der Versuchsraum war zusätzlich über eine Videokamera vom Nebenraum einsehbar. Die Untersuchung eines jeden Teilnehmers setzte sich aus zwei Terminen zusammen. An einem der Tage wurde der Proband einem standardisierten mentalen Belastungstest unterzogen und so akutem psychologischem Stress ausgesetzt. Der zweite Tag diente als Kontrolltag. Durch dieses Crossover-Design konnten Vergleichsdaten der Probanden ohne Auslösung einer Stresssituation durch den Belastungstest bei sonst vollkommen identischem Versuchsablauf erhoben werden. An welchem der beiden Tage der Belastungstest durchgeführt wurde, entschied das Los. Alle Untersuchungen fanden am Vormittag zwischen 9 und 13 Uhr statt um tageszeitliche homöostatische Schwankungen zu vermeiden und wurden durch zwei Versuchsleiterinnen (Eva Freier, Ulrike Nowotne) durchgeführt. Der Untersuchungsablauf wurde schriftlich festgelegt und dokumentiert um mögliche individuelle Unterschiede in der Durchführung zu minimieren. Die Untersuchungen eines Probanden wurden von einer Versuchsleiterin abgeschlossen. An einem Vormittag konnten jeweils zwei Probanden mit Beginn um 9 Uhr und 11 Uhr untersucht

werden. Die Versuchsteilnehmer wurden an beiden Tagen jeweils zur gleichen Uhrzeit untersucht, um mögliche zirkadiane Schwankungen der untersuchten Parameter zu minimieren.

Am Versuchstag erfolgte zunächst die Begrüßung durch die Versuchsleiterin, welche den Probanden in den Untersuchungsraum begleitete. Mobiltelefone wurden ausgeschaltet, Taschen und Kleidung wurden außer Sichtweite aufbewahrt und wenn nötig, wurde nochmals die Toilette besucht, da dies während der Untersuchung nicht mehr möglich war.

Nach einer kurzen Erläuterung des Versuchsablaufes nahm der Proband auf dem Untersuchungsstuhl Platz und füllte einen Fragebogen aus, auf dem die Ausschlusskriterien nochmals überprüft wurden. Es wurden zusätzlich Besonderheiten zum aktuellen Gesundheitszustand, Schlafverhalten der letzten Nacht, Alkoholkonsum am Vorabend der Untersuchung sowie der exakte Untersuchungsbeginn protokolliert. Vor Untersuchungsbeginn wurde ein Informationsblatt zum Ablauf der Untersuchung ausgehändigt, sowie das schriftliche Einverständnis des Probanden zur Teilnahme eingeholt.

Jeder Versuchsteilnehmer erhielt einen venösen Zugang am rechten Unterarm. Es wurden 18-Gauge-Venenverweilkatheter der Firma Braun verwendet und mit einem Dreiwegehahn verschlossen. Am linken Oberarm wurde eine Standard-Blutdruckmanschette angelegt. Im Anschluss wurde der Proband über die Videoübertragung in den Nachbarraum sowie die akustische Verbindung über die Gegensprechanlage informiert.

## Untersuchungsablauf

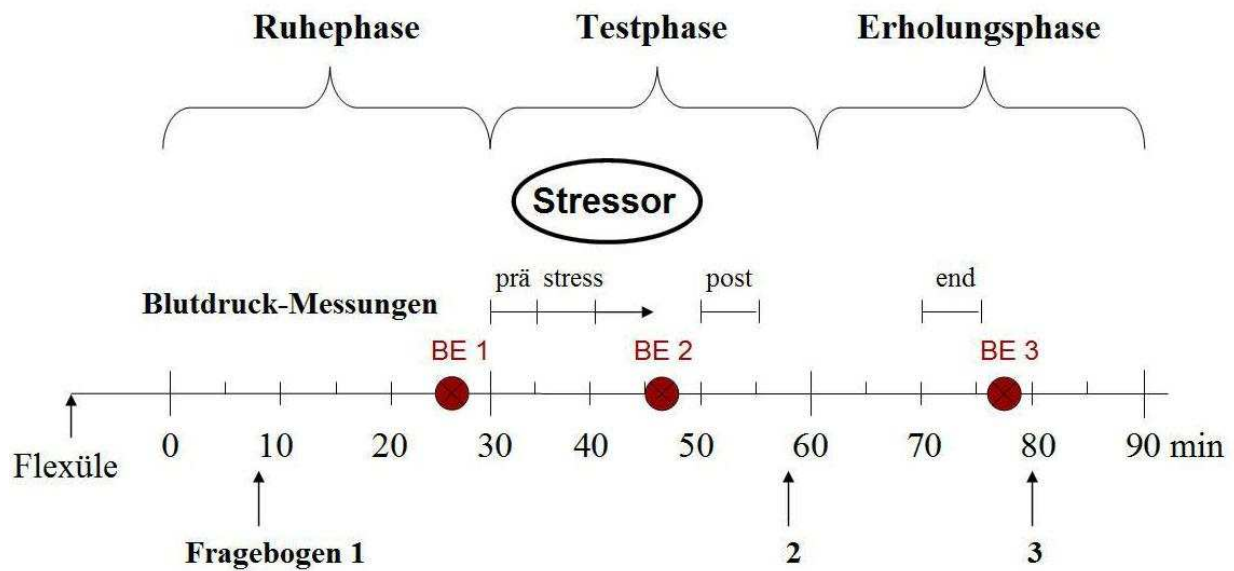


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung am Tag der mentalen Belastung. Der Untersuchungsablauf am Kontrolltag unterscheidet sich lediglich durch das Ausbleiben des Stressors. BE= Blutentnahme (BE 1 wird nachfolgend als „prä“, BE 2 als „stress“ und BE 3 als „post“ bezeichnet)

Der Versuch begann nach den Vorbereitungen mit einer 30-minütigen Ruhephase. In dieser Zeit sollten sich die Probanden an die unbekannte Umgebung gewöhnen und entspannen. Zusätzlich wurde in dieser Phase der Untersuchung der erste standardisierte psychologische Fragebogen ausgefüllt. Am Ende der Ruhephase erfolgte die erste Blutabnahme aus dem Venenverweilkatheter. Die Werte repräsentierten die Basalwerte und werden nachfolgend als „prä“ bezeichnet.

Der Ruhephase folgte die ebenfalls 30-minütige Testphase. In Augenhöhe, in etwa einem Meter Abstand vor dem Probanden, befand sich ein Computermonitor, welcher kurz vor Beginn der Testphase eingeschaltet wurde. Zur Messung der kardiovaskulären Parameter wurden zusätzlich EKG-Elektroden am Oberkörper der Versuchsperson aufgeklebt und eine Finapres-Fingerblutdruckmanschette am linken Mittelfinger angelegt. Die Studienteilnehmer waren angehalten in den folgenden 20 Minuten die Anweisungen auf dem Monitor zu befolgen, nicht zu sprechen und so ruhig wie möglich zu sitzen. Ein Trackball wurde zur bequemen Steuerung mit der rechten Hand positioniert und dessen Bedienung kurz erläutert. Im Anschluss begann das standardisierte Computer-Testprogramm (Manometertest) zur Erzeugung der mentalen Belastungssituation (siehe Kapitel 3.2.2). Unmittelbar nach Beendigung des Testprogramms erfolgte die zweite Blutentnahme. Die Werte spiegeln den Einfluss des Stressors wieder und werden daher nachfolgend als „stress“ bezeichnet. Am Ende der Testphase wurde der zweite standardisierte psychologische Fragebogen ausgefüllt. Zusätzlich erfolgte ein kardiovaskuläres

Monitoring zur kontinuierlichen Erfassung von Blutdruck und Herzfrequenz über 5-Minuten-Intervalle zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Diese Messungen wurden später zur Auswertung gemittelt. Noch vor Beginn des Manometertests erfolgte die erste Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter, diese Messung wird später als „prä“ bezeichnet. Die während des Tests aufgezeichneten Daten werden mit „stress“ bezeichnet. Am Ende der Testphase wurden erneut Herzfrequenz und Blutdruckwerte gemessen und mit „post“ bezeichnet.

An die Testphase schloss sich eine weitere 30-minütige Erholungsphase mit einer abschließenden Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter („end“), einer letzten Blutentnahme („post“) und der Entfernung des Venenverweilkatheters an. Der Versuch wurde mit dem Ausfüllen des dritten und letzten standardisierten psychologischen Fragebogens beendet.

Die Versuchsanordnung des Kontrolltages war abgesehen vom Fehlen des mentalen Belastungstests identisch.

### **4.2.2 Psychophysiologischer Belastungstest**

Zur Induktion einer akuten psychischen Stresssituation wurde in der Versuchsanordnung ein mentaler Belastungstest verwendet (MANOMETER-Test). Dieser liegt in einem zu diesem Zweck entwickelten standardisierten Computerprogramm, dem STIMULUS-Programm (Johannes et al. 1990) vor. Das verwendete Testprogramm gliedert sich in drei Abschnitte. Der erste und dritte Teil sind Ruhephasen zur Entspannung des Probanden. Dazwischen findet die eigentliche Manometer-Testphase statt, die als Stressor wirkt.

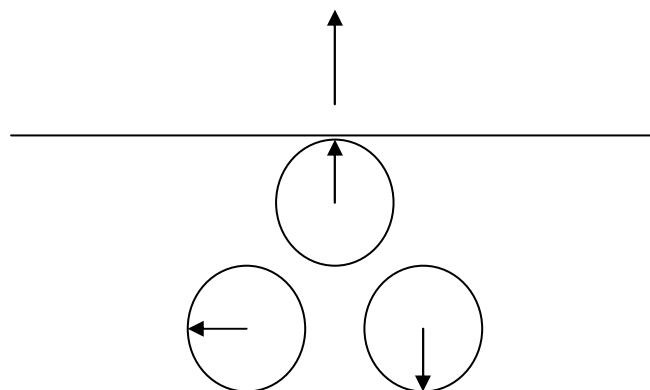
- 1. Ruhephase 1:** Dauer fünf Minuten. Schriftliche Anweisung über den Monitor:  
„ Bitte sitzen sie ruhig und entspannt.“
- 2. Manometer-Testphase:** Dauer ca. zwölf Minuten. Beginn mit einer kurzen Anleitung und vorgeschalteter Übungsphase zur Prüfung des Verständnisses. Ist diese erfolgreich absolviert, startet der eigentliche Manometertest.
- 3. Ruhephase 2:** Dauer fünf Minuten. Schriftliche Anweisung über den Monitor:  
„ Bitte sitzen sie ruhig und entspannt.“

## Manometertest

Auf dem Monitor erscheint eine unterschiedliche Anzahl von Manometeruhren mit jeweils einem Zeiger. Die Stellung dieser Zeiger soll mit einem am oberen Bildrand präsentierten Referenzzeiger verglichen werden. Weicht keiner der Zeiger um mehr als  $90^\circ$  in die eine oder andere Richtung vom Referenzzeiger ab, so ist die Aufgabe mit „richtig“ durch einmaliges Drücken der linken Taste des Trackballes zu beantworten. Weicht aber mindestens ein Zeiger um mehr als  $90^\circ$  vom Referenzzeiger ab, so ist die Aufgabe mit „falsch“ durch Drücken der rechten Taste des Trackballes zu beantworten („information processing task“ nach (Stephoe et al. 1991)).

Die Anzahl der zu beurteilenden Manometeruhren erhöht sich von anfangs drei auf maximal 11 Uhren. Die Präsentationszeit des einzelnen Bildes variiert und passt sich individuell der Bearbeitungszeit des Probanden an. Bei jeder richtig beantworteten Aufgabe verkürzt sich die Präsentationszeit um 30 Prozent. Erreicht der Proband eine festgelegte Fehlerquote verlängert sie sich wieder.

Jeder Proband wird so an seine individuelle Leistungsgrenze gebracht, ohne dass eine psychologische Sättigung oder Unterforderung mit Langeweile resultiert. Zur Erhöhung der Konzentration und Motivation der Probanden erfolgte von Zeit zu Zeit ein Kommentar über die Gegensprechanlage von Seiten der Versuchsleiterin.



**Abbildung 2: Beispielanzeige des Manometertestes mit Referenzzeiger (oben) und drei Manometeruhren.**

### **4.2.3 Physiologische Parameter**

Zum Nachweis einer psychophysiologischen Aktivierung erfolgte die Erhebung und Auswertung der kardiovaskulären Parameter Blutdruck (systolisch/ diastolisch) und Herzfrequenz. Die Messungen wurden über 5-Minuten-Intervalle zu vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Jeweils eine Messung erfolgte während der drei Abschnitte des Testprogramms, in der ersten Ruhephase („prä“), während des Manometertests („stress“) und in der zweiten Ruhephase („post“). Das vierte Messintervall lag in der anschließenden Erholungsphase („end“).

#### **4.2.3.1 Bestimmung des Blutdruckes**

Zur Blutdruckmessung wurde ein Finapres BP-Monitor Fingerblutdruckmessgerät (Ohmeda 2300) verwendet. Die Manschette wurde nach Herstellerangaben angepasst und angelegt.

#### **4.2.3.2 Messung der Herzfrequenz**

Zusätzlich wurde kontinuierlich die Schlag-zu-Schlag Herzfrequenz mittels EKG-Ableitung nach Goldberger bestimmt und während der vier Messintervalle aufgezeichnet. Hierzu wurden vier EKG-Elektroden am Oberkörper der Probanden aufgeklebt.

Die erhobenen Daten wurden vor der statistischen Analyse mit dem Programm Alys/ FAST2-Analyse (Schächinger, Curio & Sudhop 1992/2005) aufbereitet. Das Programm berechnete die Mittelwerte der drei Parameter (Herzfrequenz, systolischer/ diastolischer Blutdruck) für die einzelnen Aufzeichnungsphasen. Extremwerte wurden durch Interpolation korrigiert.

Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Windows (Version 12.0, 2003).

### **4.2.4 Psychodiagnostik**

#### ***State-Trait-Ärgerausdrucksinventar (STAXI)***

Das State-Trait-Ärgerausdrucksinventar (STAXI) ist die deutsche Adaptation des „State-Trait-Anger-Expression-Inventory“ von C.D. Spielberger zur Erfassung von Ärger als Zustand (state-anger) und der Ärgerdisposition (trait-anger). Da eine reine Übersetzung der amerikanischen

Ausgangspunkt nicht möglich war, erfolgte die Neuentwicklung unter Einbeziehung, aber auch Ausweitung des ursprünglichen Itempools (Schwenkmezger et al. 1992).

Ärger kann als emotionaler Zustand definiert werden, verbunden mit Gefühlen von Spannung, Irritation und Wut sowie einer Aktivierung des autonomen Nervensystems. Dieser Fragebogen in deutscher Fassung diente in der vorliegenden Studie als kurzes und ökonomisches Instrument zur Erfassung eben dieses Zustandsärgers, so dass wir uns auf den Teil der State-Skala, den ersten Teil des STAXI konzentrierten. Diese Skala besteht aus 10 Items. Zur Bewertung der Items bestehen vier Möglichkeiten: „überhaupt nicht“ - „ein wenig“ - „ziemlich“ - „sehr“. Der Proband ist aufgefordert diejenige Antwort auszuwählen, die angibt, wie er sich zum Zeitpunkt der Beantwortung, also speziell in diesem Moment, fühlt.

Die Auswertung des Fragebogens erfolgte durch Addition der Punktwerte der einzelnen Items und der so entstandene Rohwert wurde anschließend für die statistische Analyse verwendet. Ein hoher Skalenwert ist dabei Ausdruck einer hohen Ärgerausprägung und umgekehrt.

Die statistische Auswertung der so gewonnenen Daten des verwendeten Fragebogens erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS für Windows (Version 12.0, 2003).

### **4.2.5 Immunologische Parameter**

#### ***4.2.5.1 Blutprobengewinnung***

Es wurde in Vorbereitung zur Untersuchung, mindestens 30 Minuten vor Beginn des mentalen Belastungstests, ein 18-Gauge-Venenverweilkatheter in eine Unterarmvene auf der Seite der nicht-dominanten Hand gelegt. Aus diesem venösen Zugang wurde zu drei definierten Zeitpunkten das Blut zur Bestimmung der immunologischen Parameter gewonnen. Die erste Blutentnahme erfolgte in der Ruhephase und lieferte die Basalwerte („prä“). Unmittelbar nach Beendigung des Manometertests wurde zum zweiten Mal Blut gewonnen. Diese Werte repräsentierten die Testphase („stress“). Zur Beurteilung des Effekts des Stressors im kurzfristigen Verlauf erfolgte in der Erholungsphase, 25 Minuten nach Beendigung des Manometertests eine abschließende Blutentnahme („post“). Zu jedem der genannten Zeitpunkte wurden 30 ml Blut in Heparin-Vacutainer entnommen. Die Blutproben wurden direkt nach Abnahme einige Male geschwenkt, um eine Vermischung mit dem Antikoagulum zu erreichen und anschließend gekühlt gelagert. An zwei bis drei Tagen pro Woche wurden die gesammelten

Proben zur Zellseparation und Kryokonservierung in einer Styroporbox in das Deutsche Rheumaforschungszentrum Berlin transportiert. Die kryokonservierten Zellproben wurden wiederum in das immunologische Labor des onkologischen Zentrums der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf transportiert, wo die anschließenden Laboranalysen unter Leitung von Herrn. Dr. med. D. Atanackovic durchgeführt wurden.

### ***4.2.5.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus heparinisierem Vollblut und anschließende Kryokonservierung***

Zur späteren Isolierung und Untersuchung der Lymphozyten wurden zunächst die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus den heparinisierten Vollblutproben separiert. Es handelt sich bei dieser Zellpopulation vor allem um Lymphozyten aber auch Monozyten. Die Trennung von den übrigen zellulären Blutbestandteilen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Zuhilfenahme von Ficoll-Hypaque-Lösung mit einer Dichte von 1.077 g/ml als Zellseparationsmedium. Es handelt sich hierbei um ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren mit größerer Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Aufgrund ihrer höheren Dichte pelletieren Erythrozyten und Granulozyten bei Zentrifugation am Gefäßboden während sich Monozyten und Lymphozyten an der Plasma-Gradientenphase sammeln, da ihr spezifisches Gewicht weniger als 1.077g/ml beträgt. Sie reichern sich so in einer Interphase, auch mononuclear cells -Schicht (MNC) genannt, zwischen Medium und Plasma an. Die Thrombozyten verbleiben trotz der geringeren Dichte aufgrund ihres geringen Zellvolumens überwiegend in der oberliegenden Plasmaschicht.

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Bank durchgeführt. Die Hälfte der gewonnenen 30 ml-Blutproben, also 15ml heparinisiertes Vollblut, wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit Phosphate buffered saline (PBS) in einem 50ml Falcon®-Röhrchen verdünnt. Dieses Blutgemisch wurde anschließend in einem weiteren Falcon®-Röhrchen unter Vermeidung von Wirbelbildung auf 15ml Ficoll-Hypaque-Lösung aufgeschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 2300 Umdrehungen pro Minute entsprechend 1100g ohne Bremse. Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Zunächst wurde die MNC-Schicht, welche als milchige Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Lösung imponiert, vorsichtig mit einer 10ml Pasteur-Pipette abpipettiert und in ein neues 50ml Teströhrchen überführt. Die isolierten MNC-Schichten der anfangs getrennt verdünnten, zusammengehörigen Blutproben wurden nun wieder vereint. Nach Verdünnung der Proben mit



PBS/ BSA im Verhältnis 1:3 folgte eine Waschung für 10min bei 4°C, 300g, entsprechend 1200 Umdrehungen pro Minute. Im Anschluss wurde die Population der PBMC in 10ml PBS aufgenommen und erneut von Thrombozyten frei gewaschen (10 min. bei 4°C, 300g). Schließlich erfolgte die Auszählung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Anschließend erfolgte die vorübergehende Kryokonservierung der nach obigem Verfahren gewonnenen mononukleären Zellen. Hierzu wurde nach der Zentrifugation der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit 1ml Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) gut aufgespült. Anschließend wurden je 500µl der Probe in ein Einfrierröhrchen (Kryotube) pipettiert. DMSO diente als Gefrierschutzmittel und verhindert die Entstehung von Eiskristallen. Außerdem wurde eine mit Isopropylalkohol befüllte Einfrierbox verwendet, die definiert mit 1°C pro Minute die Temperatur auf insgesamt -80°C senkt. Durch dieses Vorgehen konnten Zellverluste beim Einfriervorgang begrenzt werden. Nach 24h wurden die Proben in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt und hier bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Per Kurier wurden die Proben schließlich nach Hamburg überführt.

### ***4.2.5.3 Auftauen der Zellen und Antikörpermarkierung***

Nach dem Transport der Proben in das tumorimmunologische Labor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden die Proben durch Schwenken im 37°C warmen Wasserbad angetaut und anschließend durch tröpfchenweise Zugabe von RPMI (zugesetzt mit 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptokinase) komplett aufgetaut. Nach Überführung der Zellen in ein mit 10ml RPMI gefülltes Röhrchen erfolgte die zweimalige Waschung. Vor der weiteren Verwendung wurden die Zellen erneut gezählt und auf Vitalität geprüft.

Nach erneuter Zentrifugation der Zellen folgte anschließend die Oberflächenfärbung durch Zusatz von verdünnten, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern. Für die Differenzierung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen anhand von Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und anderen T-Zellmarkern wurden in unserer Studie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC-), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP-), Phycoerythrin (PE-) und Allophycocyanin (APC-) konjugierte Antikörper verwendet (s. Tabelle 1). Die Oberflächenfärbung war nach erneuter Waschung mit PBS nach 30 Minuten beendet.

Spezifität	Färbung	Bezug von
CD3	FITC, APC	Caltag, South San Francisco, CA
CD4	FITC, PerCP, APC	BD Biosciences, San Jose, CA
CD8	PerCP	BD Biosciences, San Jose, CA
CCR7	APC	R&D Systems, Minneapolis, MN
CD56	FITC, PE	BD Biosciences, San Jose, CA
$\gamma\delta$ -TZR	PE	BD Biosciences, San Jose, CA
CD226	PE	BD Biosciences, San Jose, CA
CRTH2	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
6B11	PE	BD Biosciences, San Jose, CA
CD1d Tetramer	PE	NIH/ NIAID, Bethesda, MD

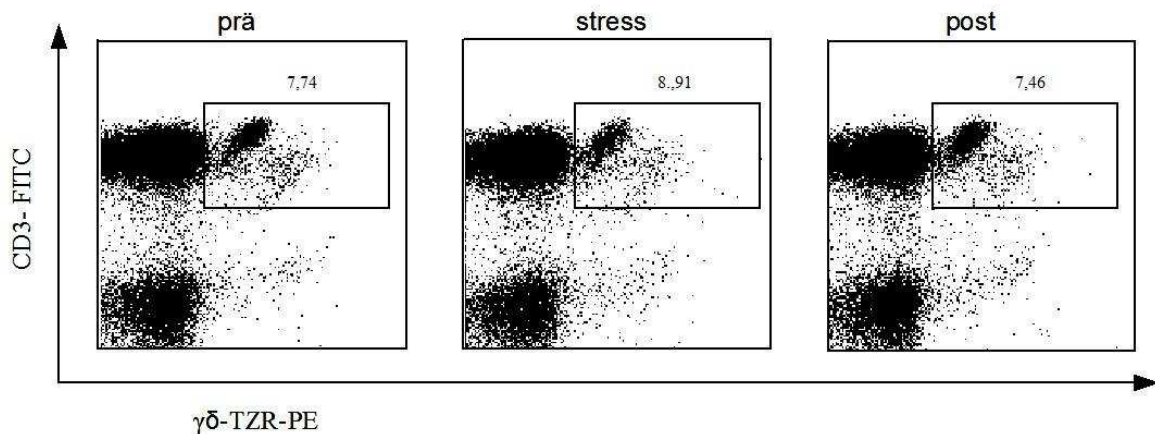
**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper und Färbungen.**

#### 4.2.5.4 Durchflusszytometrie/ FACS-Analyse

Das Durchflusszytometer erlaubt die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung von Zellen. Zugrunde liegen der hydrodynamische Transport von Zellen und deren optische Vermessung nach spezifischen Färbungen. Das Grundprinzip der FACS (fluorescence activated cell sorter)-Analyse wird im Folgenden näher dargestellt.

Die zunächst als Zellpopulation in einer Pufferlösung vorliegenden Zellen werden mit Hilfe verschiedener Farbstoff-gekoppelter, spezifischer Antikörper markiert (siehe oben). Die Zellsuspension wird durch einen Hüllstrom verdünnt und dadurch in Einzelzellen separiert. Dies geschieht durch das schnelle Einströmen des Hüllstromes im Vergleich zur langsamen Zuführung des Probenstromes. Eine Düse leitet die Zellen in feinen Tröpfchen einzeln und hochpräzise am Messpunkt vorbei. Die durchflusszytometrische Analyse basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen in dem Moment, in dem die Zellen im rechten

Winkel an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Dieser Laserstrahl sendet monochromatisches Licht aus, das beim Auftreffen auf Zellen und intrazelluläre Partikel abgelenkt wird. Als entscheidende Messgrößen werden die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und die Lichtstreuung im Winkel von  $90^\circ$  als Seitwärtslicht (side scatter, SSC) detektiert. Dabei dient das Vorwärtsstreulicht als Maß der Größe von Zellen. Das Seitwärtsstreulicht hängt überwiegend von der komplexen Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente ab und damit von der Granularität und Binnenstruktur der Zellen. Die an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden simultan zur Lichtemission angeregt und die Fluoreszenz wird ebenfalls in einem Winkel von  $90^\circ$  detektiert, da die Lichtstreuung mit zunehmendem Winkel zum Laserstrahl schwächer wird. Die Fluoreszenz-Detektoren werden, der Nomenklatur folgend, mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL1, FL2, FL3, FL4). Am Messpunkt dienen die Streuung des Anregungslichtes und die Anregung von fluoreszenten Markern somit der simultanen Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen. Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzsignale können hier gleichermaßen detektiert werden. Die Detektion aller Lichtsignale erfolgt über Photomultiplier, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Diese werden anschließend digitalisiert und alle Messwerte der einzelnen Zellen werden als Datensatz in eine Speicherdatei geschrieben. Das Hauptziel der anschließenden Datenanalyse ist, in dem aufgenommenen Datensatz Zellsubpopulationen, Zellen mit ähnlichen Eigenschaften, zu identifizieren und diese im Hinblick auf deren Anteil am Gesamtvolumen, Expressionsmuster und Heterogenität zu beschreiben. Hierzu sind verschiedene Formen der Darstellung möglich, wie z.B. die eindimensionale Darstellung durch das Histogramm oder die zweidimensionale Darstellung durch Punktwolken, sogenannte dot-plots.



**Abbildung 3: repräsentatives Beispiel einer FACS-Analyse von  $\gamma\delta$ -TZR<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut zu den drei untersuchten Zeitpunkten (prä, stress, post), die auf das Gesamtlymphozytengate analysiert wurden.**

Die FACS-Analyse ermöglichte die Differenzierung und Separation der heterogenen Lymphozyten-Subpopulationen anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenproteine. Diese wurden mit spezifischen, fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern (z.B. CD3-FITC,  $\gamma\delta$ -TZR-PE) markiert. Entsprechend markierte Zellen konnten so detektiert und nach entsprechenden Oberflächenmerkmalen sortiert und schließlich ausgezählt werden. Zur Sortierung wurden die Zellen elektrisch positiv oder negativ geladen und anschließend je nach Fluoreszenzeigenschaften über Ablenkplatten ladungsabhängig in verschiedene Auffangbehälter geleitet.

In dieser Studie wurde ein Vierfarben-FACS („FACS Calibur“) sowie die Software CELLQuest Pro ( BD Biosciences, San Jose, CA) und FlowJo Version 7.2.5 ( Treestar, Ashland, OR) eingesetzt.

### 4.3 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS für Windows Version 12.0 und 13.0 (SPSS, Chicago, IL) durchgeführt. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0.05$  festgelegt. Signifikante Ergebnisse sind in Tabellen und Abbildungen durch Sterne gekennzeichnet (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Probanden

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchte Stichprobe gesunder, männlicher Probanden mit einem Stichprobenumfang von  $n = 31$ .

Das Durchschnittsalter lag bei 26 Jahren (Range 21-41 Jahre). Die Studienteilnehmer waren durchschnittlich 1,83 m groß und 75 kg schwer. Der Body-Mass-Index (in  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) betrug im Median 22 mit einem Range von 20 bis 27. Bezüglich des Bildungsgrades und des Familienstandes bestand kein wesentlicher Unterschied. Die überwiegende Zahl der Probanden war ledig und hatte die Schule mit dem Abitur abgeschlossen. Je ein einzelner Studienteilnehmer war verheiratet oder hatte einen sonstigen Schulabschluss.

<b>Alter in Jahren</b>	Median	26
	Mittelwert	26,32
	Standardabweichung	4,60
	Range	21 - 41
<b>Grösse in cm</b>	Median	183
	Mittelwert	183,13
	Standardabweichung	0,06
	Range	172 - 204
<b>Gewicht in kg</b>	Median	75
	Mittelwert	76,23
	Standardabweichung	7,40
	Range	60 - 100
<b>Body-Mass-Index (in <math>\text{kg}/\text{m}^2</math>)</b>	Median	22
	Mittelwert	22,73
	Standardabweichung	1,77
	Range	20 - 27
<b>Schulabschluss</b>	Abitur	30
	sonstige	1
<b>Familienstand</b>	ledig	30
	verheiratet	1

**Tabelle 2: Charakterisierung des Probandenkollektivs (n=31)**

## 5.2 Psychologische Reagibilität

Zur Einschätzung von Veränderungen des subjektiv empfundenen Zustandsärgers wurde der erste Teil des State-Trait-Ärgerausdrucksinventars (STAXI) verwendet. Jeder Proband füllte diesen Fragebogen an drei im Versuchsablauf festgelegten Zeitpunkten, vor (prä), direkt nach der Stressbelastung (stress) und nach einer Erholungsphase (post) aus. Die so ermittelten Rohwerte wurden statistisch ausgewertet.

Bei der Berechnung mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben zeigte sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0.01$ ) des subjektiv empfundenen Zustandsärgers in der Gesamtheit der Stichprobe ausgehend von der Ruhephase (prä) im Vergleich mit der Testphase (stress). Vergleicht man die Testphase (stress) mit der Erholungsphase (post), so fallen die Werte wieder auf Ausgangsniveau ab.

	prä		stress			post		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
<b>Zustandsärger</b> (STAXI-Rohwerte) <b>Stresstag</b>	10,7	0,2	11,9	0,4	**	10,7	0,2	
<b>Zustandsärger</b> (STAXI-Rohwerte) <b>Kontrolltag</b>	10,8	0,2	10,4	0,1		10,4	0,1	

**Tabelle 3: Änderung des Zustandsärgers über den Testverlauf an Stress- und Kontrolltag.**

**Das Ausmaß des Zustandsärgers wurde anhand des STAXI zu den drei Zeitpunkten (prä, stress, post) bestimmt. Die gewonnen Rohwerte der Probanden wurden für jeden der Zeitpunkte gemittelt (+/-SEM) und die Werte unter mentaler Belastung (stress) und in der Erholungsphase (post) mit den Ausgangswerten (prä) verglichen.**

\*\*  $p < 0.01$  (Berechnung der p-Werte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben)

Am Kontrolltag zeigte sich kein Unterschied im Vergleich der ermittelten Rohwerte zu den drei oben genannten Zeitpunkten.

### 5.3 Physiologische Reagibilität

Zur Erfassung der kardiovaskulären Aktivierung erfolgte die Messung von Herzfrequenz, systolischem und diastolischem Blutdruck. Die Messungen erfolgten kontinuierlich über einen Zeitraum von jeweils fünf Minuten zu vier verschiedenen Zeitpunkten, in der Ruhephase (prä), während der Testphase (stress), in der anschließenden Erholungsphase (post) sowie abschließend nach weiteren zwanzig Minuten am Ende des Versuchs (end). Die Messergebnisse wurden über die Messphasen gemittelt.

In der gesamten Stichprobe zeigte die statistische Analyse mittels zweiseitigem Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben einen signifikanten Anstieg ( $p < 0.001$ ) der erhobenen kardiovaskulären Parameter während der Testphase im Vergleich zu den Ausgangswerten unter Ruhebedingungen. Der mittlere Anstieg der Herzfrequenz unter Belastung lag bei sieben Schlägen pro Minute. Die Blutdruckwerte stiegen im Mittel systolisch um 30 mmHg und diastolisch um 15 mmHg an.

Die Herzfrequenz normalisierte sich rasch wieder nach Ende der mentalen Belastung und fiel schließlich zum Ende der Untersuchung signifikant ( $p < 0.05$ ) unter den Ausgangswert. Die Blutdruckwerte hingegen blieben auch nach Ende der mentalen Belastung bis zum Ende der Untersuchung signifikant erhöht ( $p < 0.001$ ).

	prä		stress			post			end		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig	MW	SEM	Sig	MW	SEM	Sig
<b>HF</b> (1/min)	69,2	1,5	76,0	2,3	***	68,9	1,7		66,4	1,6	**
<b>RR, sys.</b> (mmHg)	146,3	3,9	176,9	4,2	***	155,7	4,0	***	155,9	3,7	***
<b>RR, diast.</b> (mmHg)	91,9	3,1	107,2	3,0	***	96,0	3,2	***	96,3	3,1	***

**Tabelle 4: Mittelwert (MW) und Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) für Herzfrequenz (HF), systolischen (RR, sys.) und diastolischen Blutdruck (RR, diast.) am Tag der mentalen Belastung.**

Änderung der kardiovaskulären Parameter unter mentaler Belastung (stress) und den folgenden Ruhephasen (post, end) im Vergleich zu den Ausgangswerten (prä).

\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  (Berechnung p-Wert mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben)

Am Kontrolltag kam es zu keinen signifikanten Veränderungen von Herzfrequenz, systolischem und diastolischem Blutdruck zwischen den ersten drei Messzeitpunkten. Gegen Ende der Untersuchung (end) zeigte sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0.05$ ) der Blutdruckwerte um durchschnittlich 2 mmHg im Vergleich zu den Ausgangswerten.

	prä		stress			post			end		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
<b>HF</b> (1/min)	68,0	1,7	68,4	1,7		68,0	1,7		66,4	1,8	
<b>RR, sys.</b> (mmHg)	144,0	3,8	143,4	5,3		145,3	4,1		146,2	5,7	*
<b>RR, diast.</b> (mmHg)	89,0	3,3	89,3	3,0		88,4	3,4		91,6	3,1	*

**Tabelle 5: Mittelwert (MW) und Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) für Herzfrequenz (HF), systolischen (RR, sys.) und diastolischen Blutdruck (RR, diast.) am Kontrolltag.**

Änderung der kardiovaskulären Parameter unter mentaler Belastung (stress) und den folgenden Ruhephasen (post, end) im Vergleich zu den Ausgangswerten (prä).

## 5.4 Immunologische Parameter

### 5.4.1 NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der NK-Zellen stieg unter mentaler Belastung signifikant an ( $p < 0.001$ ). Nur kurze Zeit nach Beendigung des Stressors kehrte ihr prozentualer Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl wieder auf Ausgangsniveau zurück.

In der gesamten Stichprobe zeigte die statistische Analyse mittels zweiseitigem Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben einen signifikanten Abfall ( $p < 0.001$ ) der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen während der Testphase im Vergleich zu den Ausgangswerten unter Ruhebedingungen. In der anschließenden Erholungsphase stieg ihr Anteil an den Gesamtlymphozyten wieder auf Ausgangsniveau an.

Die statistische Auswertung der quantitativen Veränderung der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen zeigte keine signifikante Veränderung zwischen Ruhewerten und mentaler Belastungsphase. In



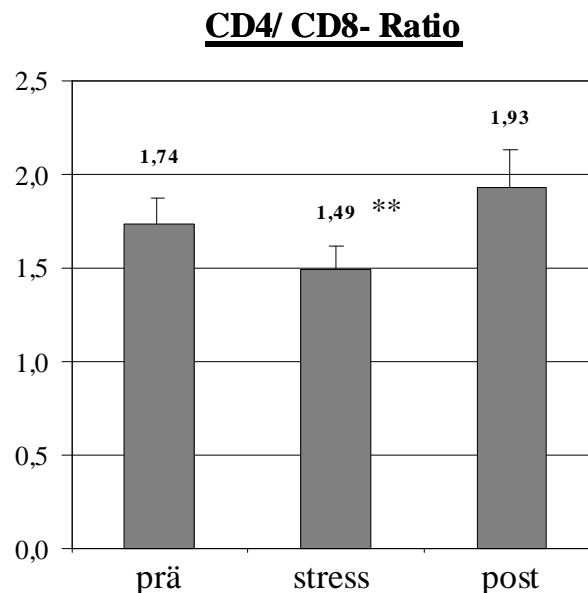
der späteren Erholungsphase jedoch fiel der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl signifikant ab (p<0.01).

	prä		stress			post		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
NK-Zellen	11,71	0,97	18,20	1,17	***	11,63	1,10	
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	34,28	1,42	27,89	1,26	***	31,19	1,40	***
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	21,94	1,10	21,36	1,26		19,44	1,26	**

**Tabelle 6: Veränderungen der NK-Zellen und der CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den Versuchsverlauf am Tag der mentalen Belastung.** Die Werte sind angegeben als Mittelwert (MW) des prozentualen Anteils der Gesamtlymphozytenzahl und Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

Berechnet man die CD4/ CD8-Ratio und vergleicht die Mittelwerte unter Stress und der nachfolgenden Erholungsphase mit den Ausgangswerten, so zeigt sich ein signifikanter Abfall unter mentaler Belastung mit anschließendem Anstieg der Werte auf Ausgangsniveau.



**Abbildung 4: Veränderung der CD4/ CD8-Ratio zu den drei untersuchten Zeitpunkten.** Die Werte sind dargestellt als Mittelwert (MW) plus Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\*\* p<0.01).

Am Kontrolltag zeigte sich keinerlei signifikante Veränderung der oben dargestellten Zellsubpopulationen sowie der CD4/ CD8-Ratio über den Versuchsverlauf.

#### 5.4.2 NKT-Zellen und iNKT-Zellen

Bei den CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Zellzahl im Versuchsverlauf. Der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen am Gesamtlymphozytenpool stieg hingegen beim Vergleich der Messwerte vor und direkt nach mentaler Belastung signifikant an ( $p < 0.05$ ). Nach der Erholungsphase fielen die Werte wieder und zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den ebenfalls unter Ruhebedingungen erhobenen Ausgangswerten.

	prä		stress			post		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
CD4 <sup>+</sup> / CD56 <sup>+</sup> NKT-Zellen	0,33	0,04	0,34	0,04		0,34	0,03	
CD8 <sup>+</sup> / CD56 <sup>+</sup> NKT-Zellen	3,54	0,45	4,14	0,64	*	3,14	0,44	

**Tabelle 7: Veränderungen der CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen über den Versuchsverlauf am Tag der mentalen Belastung.** Die Werte sind angegeben als Mittelwerte des prozentualen Anteils der Gesamtlymphozytenzahl und Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\*  $p < 0.05$ ).

Als Marker für iNKT-Zellen wurden fluoreszenzgeladene Antikörper gegen 6B11 sowie gegen  $\alpha$ GalCer-geladenes CD1d Tetramer verwendet.

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der beiden Zellpopulationen (6B11<sup>+</sup> T-Zellen, CD1d Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen) über den Versuchsverlauf. Auch bei differenzierter Untersuchung ihrer drei Subpopulationen, bestehend aus doppeltnegativen (DN), CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iNKT-Zellen konnte keine signifikante Veränderung im Versuchsverlauf festgestellt werden.

	<b>prä</b>		<b>stress</b>			<b>post</b>		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
<b>6B11<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>0,24</b>	<b>0,03</b>	<b>0,22</b>	<b>0,03</b>		<b>0,25</b>	<b>0,03</b>	
DN (CD4 <sup>-</sup> / CD8 <sup>-</sup> )	0,06	0,01	0,06	0,01		0,07	0,01	
CD4 <sup>+</sup>	0,09	0,01	0,09	0,01		0,11	0,01	
CD8 <sup>+</sup>	0,08	0,01	0,08	0,01		0,08	0,01	
<b>CD1d-Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>0,24</b>	<b>0,03</b>	<b>0,23</b>	<b>0,02</b>		<b>0,25</b>	<b>0,03</b>	
DN (CD4 <sup>-</sup> / CD8 <sup>-</sup> )	0,04	0,01	0,05	0,01		0,05	0,01	
CD4 <sup>+</sup>	0,10	0,01	0,09	0,01		0,11	0,01	
CD8 <sup>+</sup>	0,09	0,01	0,09	0,01		0,09	0,01	

**Tabelle 8: MW und SEM des prozentualen Anteil der 6B11<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD1d Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen und deren Subpopulationen an der Gesamtlmphozytenzahl über den Versuchsverlauf am Tag der mentalen Belastung.**

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten fanden sich nicht.

Am Kontrolltag zeigten sich ebenfalls keinerlei signifikante Unterschiede der beschriebenen Zellpopulationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

### 5.4.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Der prozentuale Anteil an  $\gamma\delta$ -T-Zellen am Gesamtlymphozytenpool stieg unter Stress im Vergleich mit den Basalwerten unter Ruhebedingungen signifikant an ( $p < 0.01$ ). Beim Vergleich der Ausgangswerte mit den Werten der Erholungsphase war kein signifikanter Unterschied mehr erkennbar.

Bei separater Betrachtung der drei Subpopulationen (DN,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$   $\gamma\delta$ -T-Zellen) zeigte sich auch bei der Hauptpopulation, den doppeltnegativen  $\gamma\delta$ -T-Zellen ein signifikanter Anstieg unter Stress im Vergleich mit den Basalwerten unter Ruhebedingungen mit anschließendem Abfall auf Ausgangsniveau. Für die  $CD4^+$  und  $CD8^+$   $\gamma\delta$ -T-Zellen hingegen fanden sich keine signifikanten Veränderungen unter Stress im Vergleich der drei Versuchszeitpunkte.

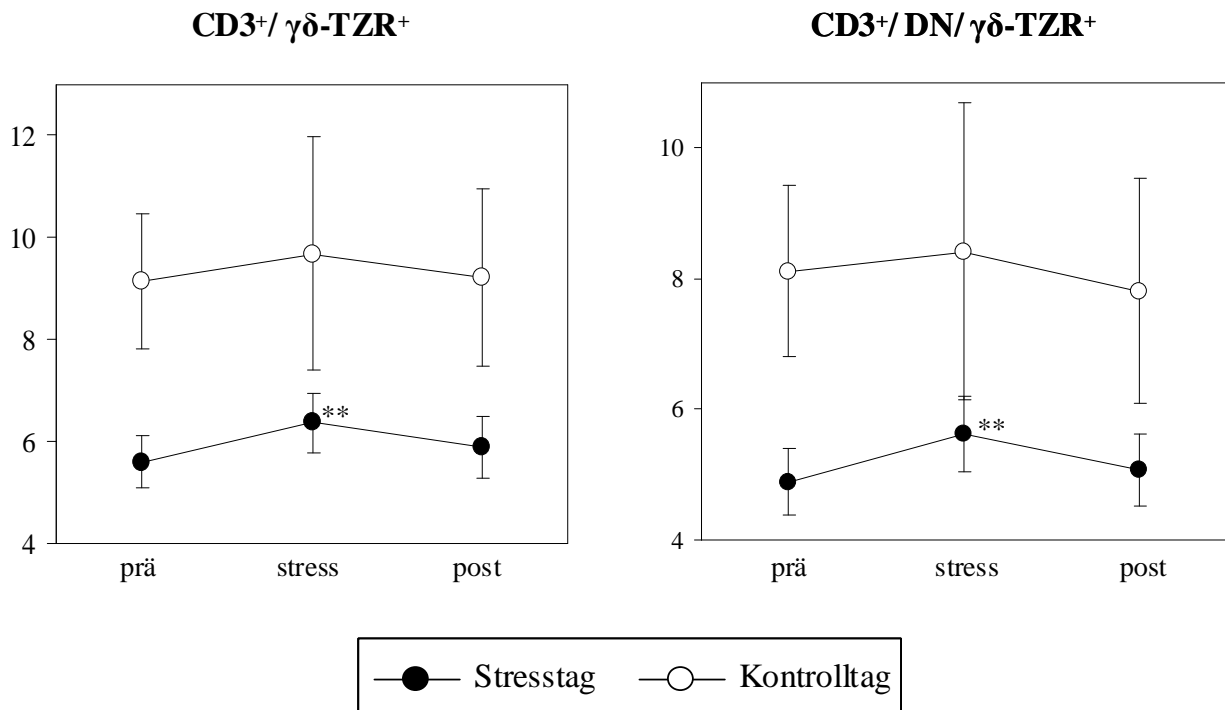
	prä		stress			post		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
<b><math>\gamma\delta</math>-T-Zellen</b>	<b>5,59</b>	<b>0,51</b>	<b>6,37</b>	<b>0,59</b>	<b>**</b>	<b>5,89</b>	<b>0,59</b>	
DN ( $CD4^- / CD8^-$ )	4,89	0,51	5,63	0,58	**	5,07	0,56	
$CD8^+$	0,41	0,04	0,51	0,06		0,46	0,06	
$CD4^+$	0,28	0,03	0,28	0,04		0,37	0,04	*

**Tabelle 9: MW und SEM des prozentuales Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie der drei Subpopulationen (DN,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) an der Gesamtlymphozytenzahl über den Versuchsverlauf am Tag der mentalen Belastung.**

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

Am Kontrolltag zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Veränderungen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl am Tag der mentalen Belastung (Stresstag) als auch am Kontrolltag.



**Abbildung 5: Veränderung des prozentualen Anteils der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und DN  $\gamma\delta$ -T-Zellen über den Versuchsverlauf - Vergleich Stresstag und Kontrolltag. Dargestellt sind MW und SEM.**

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\*\* p<0.01).

#### 5.4.4 Th-1 versus Th2-Zellen

##### 5.4.4.1 CD 226<sup>+</sup> T-Zellen als Vertreter der Th1-Zellen

Während sich bei den CD4<sup>+</sup>/CD226<sup>+</sup> T-Zellen ein signifikanter Abfall der Zellzahl während der mentalen Belastungsphase im Vergleich zu den Ausgangswerten unter Ruhebedingungen zeigte, kam es bei den CD8<sup>+</sup>/CD226<sup>+</sup> T-Zellen zu einem signifikanten Anstieg. Nach Belastung kehrten die Werte beider Subpopulationen wieder auf Ausgangsniveau zurück.

Anhand des CCR7-Antikörpers erfolgte eine weitere Unterteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>/CD226<sup>+</sup> T-Zellen in CCR7<sup>+</sup> Zellen (naive und central memory T-Zellen) und CCR7<sup>-</sup> Zellen (erfahrene Effektor-T-Zellen).

Hier zeigte sich bei den CD4<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup>/ CCR7<sup>+</sup> T-Zellen kein signifikanter Unterschied beim statistischen Vergleich der drei Messzeitpunkte.

Die CD4<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup>/ CCR7<sup>-</sup> T-Zellen hingegen zeigten einen signifikanten Abfall des prozentualen Anteils an den Gesamtymphozyten unter akutem Laborstress. Nach Ende des Stresses kehrten die Werte auf Ausgangsniveau zurück.

Bei Betrachtung der CD8<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup>/ CCR7<sup>+</sup> T-Zellen wurde ein signifikanter Abfall unter mentaler Belastung beobachtet, der auch nach Ende der mentalen Belastung signifikant blieb.

Die CD8<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup>/ CCR7<sup>-</sup> T-Zellen zeigten hingegen einen signifikanten Anstieg unter akutem Laborstress. Hier kehrten die Werte zum Zeitpunkt post auf Ausgangsniveau unter Ruhebedingungen zurück.

Zusammenfassend kann man sagen: während sich bei den naiven und central memory (CCR7<sup>+</sup>) T-Zellen beider Subpopulationen zum Teil keine, beziehungsweise signifikante, prolongierte Veränderungen unter Stress zeigen, ist bei den Effektor-T-Zell-Subpopulationen (CCR7<sup>-</sup>) eindeutig ein stressinduzierter signifikanter Abfall der CD4<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup> Zellen bei gleichzeitig signifikantem Anstieg der CD8<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup> Zellen zu erkennen.

	prä		stress			post		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
<b>CD4<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>14,45</b>	<b>0,59</b>	<b>13,22</b>	<b>0,69</b>	<b>**</b>	<b>14,81</b>	<b>0,60</b>	
<b>CCR7+</b>	5,24	0,39	4,92	0,42		5,05	0,36	
<b>CCR7-</b>	9,91	0,53	9,37	0,63	*	10,63	0,53	
<b>CD8<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>18,76</b>	<b>1,30</b>	<b>20,50</b>	<b>1,57</b>	<b>**</b>	<b>18,99</b>	<b>1,29</b>	
<b>CCR7+</b>	5,87	0,82	4,75	0,64	**	4,95	0,67	*
<b>CCR7-</b>	16,12	1,44	18,94	2,02	***	16,81	1,55	

**Tabelle 10: Darstellung der Veränderung der CD4<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>/ CD226<sup>+</sup> T-Zellen von 31 Probanden über den Versuchsverlauf am Tag der mentalen Belastung. Dargestellt sind MW und SEM. Zusätzlich Unterscheidung in naive/ central memory T-Zellen und erfahrene Effektorzellen anhand des CCR7-Antikörpers in einer Subgruppe von 22 Probanden.**

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

Eine Analyse dieser sechs Subpopulationen am Kontrolltag zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen über den beobachteten Untersuchungszeitraum.

### **CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen als Vertreter der Th2-Zellen**

Unter mentaler Belastung steigt sowohl der Anteil der CD4<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen ( $p < 0,01$ ) als auch der CD8<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup>-T-Zellen ( $p < 0,05$ ) statistisch signifikant an, wenn auch zeitlich verzögert. Während direkt nach Einfluss des Stressors keine Veränderungen nachweisbar waren, zeigten sich diese beim Vergleich der Ausgangswerte mit den Werten der nachfolgenden Erholungsphase.

Mit Hilfe des CCR7-Antikörpers konnten auch diese beiden Subpopulationen weiter in CCR7<sup>+</sup> Zellen (naive und central memory T-Zellen) und CCR7<sup>-</sup> Zellen (erfahrene Effektorzellen) differenziert werden.

Hier zeigte sich bei den CD4<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T-Zellen ein signifikanter Abfall der prozentualen Zellzahl unter mentaler Belastung. Die Werte der anschließenden Erholungsphase waren nicht signifikant verschieden von den Ausgangswerten.

Die CD4<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> T-Zellen hingegen zeigten ebenfalls einen zeitlich verzögerten Anstieg der prozentualen Zellzahl unter akutem Laborstress (signifikante Veränderung beim Vergleich der Daten zum Zeitpunkt „prä“ und „post“).

Der Anteil der CD8<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T-Zellen blieb unverändert, während die CD8<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> T-Zellen ähnlich den CD4<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> T-Zellen einen zeitlich verzögerten Anstieg der prozentualen Zellzahl unter akutem Laborstress zeigten.

Zusammenfassend kann man sagen: während sich bei den naiven und central memory (CCR7<sup>+</sup>) T-Zellen beider Subpopulationen zum Teil keine beziehungsweise signifikante Veränderungen direkt unter Stress zeigten, ist bei den Effektor-T-Zellen (CCR7<sup>-</sup>) beider Subpopulationen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) ein verspäteter, signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils am Gesamtlymphozytenpool zu erkennen.

	<b>prä</b>		<b>stress</b>			<b>post</b>		
	MW	SEM	MW	SEM	Sig.	MW	SEM	Sig.
<b>CD4<sup>+</sup>/ CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>1,07</b>	<b>0,09</b>	<b>1,02</b>	<b>0,08</b>		<b>1,21</b>	<b>0,09</b>	<b>**</b>
<b>CCR7+</b>	0,53	0,06	0,46	0,06	*	0,56	0,07	
<b>CCR7-</b>	0,62	0,07	0,64	0,08		0,70	0,07	*
<b>CD8<sup>+</sup>/ CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>0,72</b>	<b>0,08</b>	<b>0,78</b>	<b>0,08</b>		<b>0,83</b>	<b>0,08</b>	<b>*</b>
<b>CCR7+</b>	0,25	0,06	0,23	0,06		0,22	0,05	
<b>CCR7-</b>	0,55	0,07	0,62	0,06		0,67	0,07	*

**Tabelle 11: Darstellung der Veränderung der CD4<sup>+</sup>/ CRTH2<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>/ CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen von 31 Probanden über den Versuchsverlauf am Tag der mentalen Belastung (MW und SEM).**

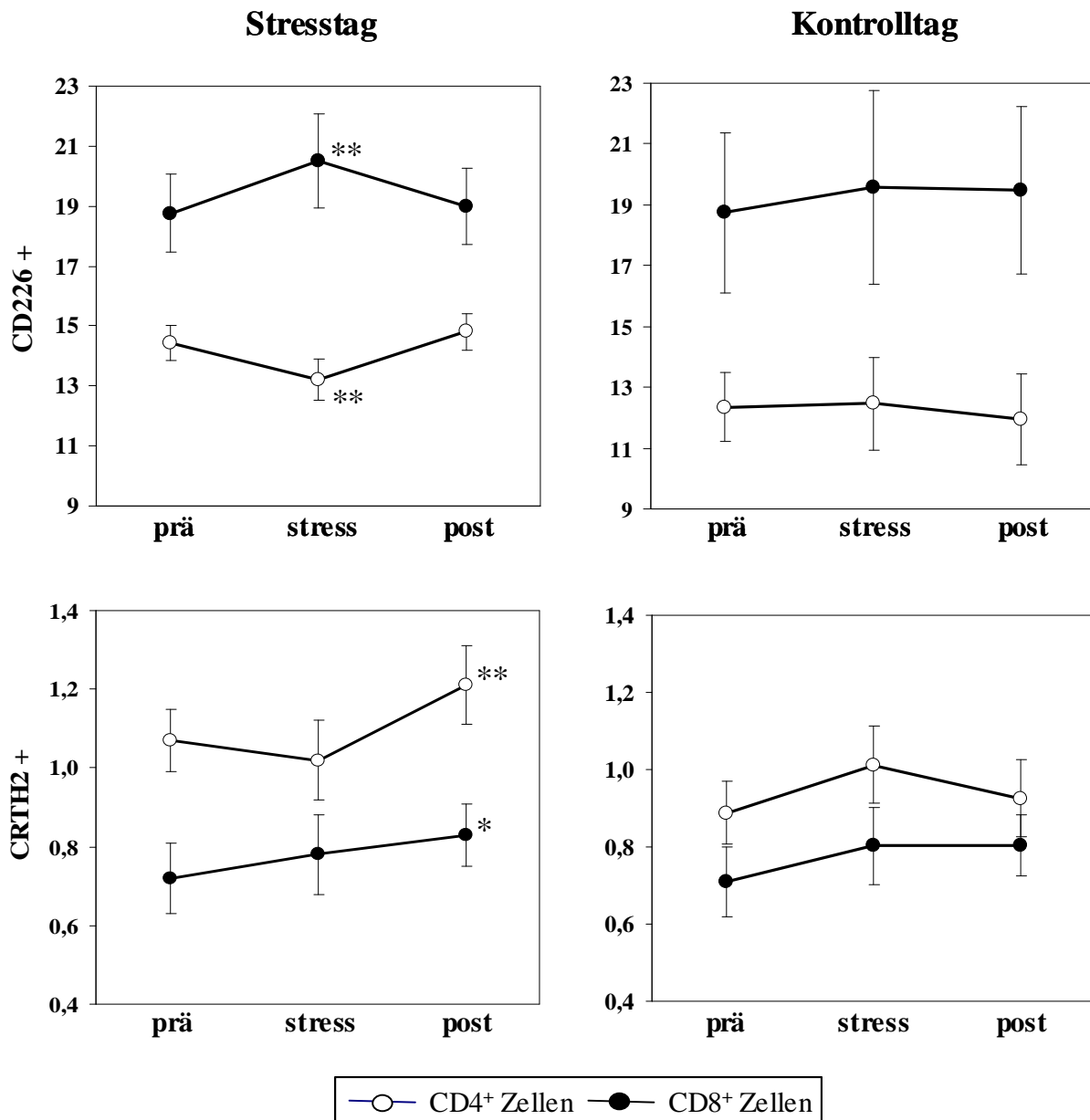
**Zusätzlich Unterscheidung in naive/ central memory T-Zellen und erfahrene Effektorzellen anhand des CCR7-Antikörpers in einer Gruppe von 22 Probanden.**

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

Die statistische Analyse am Kontrolltag zeigte keine signifikanten Veränderungen dieser sechs Subpopulationen.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Veränderungen der Mittelwerte (+/- SEM) zu den drei Messzeitpunkten sowohl am Tag der mentalen Belastung (Stresstag) als auch am Kontrolltag.





**Abbildung 6: Umverteilung von CRTH2<sup>+</sup> und CD226<sup>+</sup> T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) unter akutem psychischen Stress und am Tag der Kontrolle.**

Die oberen beiden Diagramme bilden die Veränderungen der CD226<sup>+</sup> T-Zellen, die unteren beiden Diagramme die Veränderungen der CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen ab. Dargestellt sind MW und SEM.

Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) beim Vergleich mit den Basalwerten werden durch \* angezeigt (\* p<0,05, \*\* p<0,01)

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden stressinduzierte Auswirkungen auf die T-Zell-Immunität gesunder, männlicher Probanden untersucht. Der Schwerpunkt unserer Untersuchung lag auf der Analyse unkonventioneller T-Zellen, wie (i)NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, da sich bisherige Studien der psychoneuroimmunologischen Stressforschung meist auf die Untersuchung konventioneller T-Zellen konzentrierten (Segerstrom et al. 2004).

In Vorstudien wurde ein Abfall natürlicher  $CD4^+ FOXP3^+$  regulatorischer T-Zellen unter Einfluss eines Stressors in vivo, beziehungsweise von Stresshormonen in vitro beobachtet (Freier et al. 2010, Xiang et al. 2011). Eine andere Studie konnte zeigen, dass es bei konventionellen T-Zellen zu einer stressinduzierten selektiven Mobilisierung zytotoxischer T-Zellen ins periphere Blut kommt, während weniger antigenerfahrene T-Zellen in lymphatisches Gewebe zu migrieren scheinen (Atanackovic et al. 2006).

NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen gehören zu den unkonventionellen T-Zellen und wurden bisher kaum im Zusammenhang mit Stress untersucht. Beide Zellpopulationen gelten als potente Effektorzellen. Zudem scheinen NKT-Zellen, ähnlich den  $CD4^+ FOXP3^+$  T-Zellen, regulatorische Funktionen auszuüben. Ihnen wird eine relevante Beteiligung am Schutz vor Autoimmunität sowie in der Tumorabstoßung zugeschrieben (Godfrey et al. 2000). Die  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation besitzt ebenfalls großes zytotoxisches Potential für bestimmte Tumorzelllinien (Groh et al. 1999), scheint die Wundheilung zu fördern (Girardi 2006) und an der Induktion der adaptiven Immunantwort entscheidend mitzuwirken (Brandes et al. 2005).

Die These einer Mobilisierung konventioneller, antigenerfahrener Effektor-T-Zellen wirft die Frage auf, wie sich unkonventionelle Effektor-T-Zellen, wie NKT- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen unter Einwirkung eines akuten, psychischen Stressors verhalten.

Zusätzlich untersuchten wir, ob es unter akutem Laborstress zu einer Verschiebung der Th1/Th2-Balance kommt. In früheren Arbeiten wurde in vitro eine Verschiebung hin zur Th2-Immunantwort unter dem Einfluss von Stresshormonen beobachtet (Xiang et al. 2011). Wir fragten uns, ob sich diese Beobachtung auch in vivo bestätigen lässt.

### 6.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, wie sich kurzzeitiger, psychischer Laborstress auf den Anteil von (i)NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, aber auch Th1/ Th2-Zellen am Gesamtlymphozytenpool im peripheren Blut gesunder, männlicher Probanden auswirkt. Als psychischer Stressor diente ein standardisiertes, mentales Belastungsprogramm. Bei dessen Durchführung hatten die Probanden Aufgaben an einem Computer unter Zeitdruck zu bewältigen. Zum Nachweis der psychophysiologischen Aktivierung im Sinne einer Stressantwort wurde neben physiologischen Parametern wie Herzfrequenz und Blutdruck, die Zustandsänderung der Emotion Ärger mit Hilfe eines psychologischen Fragebogens erhoben. Das eigentliche Interesse galt jedoch stressinduzierten, immunologischen Veränderungen im peripheren Blut. Hierzu erfolgten Blutentnahmen zu drei festgelegten Zeitpunkten: vor, 10 Minuten nach und abschließend 30 Minuten nach Einsatz des Stressors. Diese Blutproben ermöglichten die anschließende Differenzierung und quantitative Untersuchung von T-Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe einer FACS-Analyse.

#### Auswahl des Stressors

Sucht man nach einem geeigneten Konzept um eine akute Stresssituation im Labor zu erzeugen, so stößt man direkt auf das Problem der Unschärfe des Begriffs Stress an sich. In der Stressforschung werden unterschiedlichste Stressoren in Qualität und Quantität eingesetzt, so dass ein direkter Vergleich verschiedener Studienergebnisse oft schwierig bis unmöglich ist. Man kann zwei grundlegend verschiedene Herangehensweisen unterscheiden. Zum einen kann Stress künstlich unter Verwendung verschiedener Stimuli im Labor erzeugt werden (Laborstressoren). Hier kommen im Tierversuch oft körperliche Belastungen wie Hitze, Kälte oder Elektroschocks zum Einsatz, während beim Menschen eher psychische Belastungen, wie fordernde kognitive Aufgaben (z.B. Kopfrechnen, Manometertest) oder die freie Rede vor Publikum Anwendung finden. Zum anderen kann die Untersuchung einer Stressreaktion nach Konfrontation mit einem stressvollen Ereignis im Alltag (naturalistische Stressoren) erfolgen, beispielsweise in Prüfungssituationen (Khaksari et al. 2005, Weekes et al. 2006, Lewis et al. 2008) oder im Trauerfall (Bartrop et al. 1977, Gerra et al. 2003). Eine Vielzahl älterer Studien verwendet auch Stressoren, die neben der psychischen Belastungssituation zusätzlich physische Belastungen mit sich führen, wie beispielsweise ein Fallschirmsprung (Schedlowski et al. 1992).

Häufig handelt es sich bei Stressoren um Mischformen aus körperlichen und psychischen Belastungen, akutem und chronischem Stress. Durch unterschiedliche Copingstrategien wird Stress zudem individuell bewältigt. Da die Literatur aber Beweise für differenzierte Auswirkungen von akutem und chronischem Stress auf die Immunfunktion liefert, ist eine möglichst spezifische Analyse gefordert.

Wir wählten für unsere Untersuchungen eine akute, mentale Belastungssituation (ohne jegliche körperliche Belastung) unter Laborbedingungen. Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Stimulusprogramm von Johannes, handelt es sich um ein standardisiertes Computerprogramm, dessen Kernstück der Manometertest ist (Johannes et al. 1990). Er stellt ein bewährtes, validiertes Verfahren dar, um Probanden im Rahmen psychophysiologischer Untersuchungen akutem, psychischem Stress zu exponieren. Dieses Setting hat entscheidende Vorteile gegenüber beispielsweise naturalistischen Stressoren. So handelt es sich um einen standardisierten Versuchsablauf mit reproduzierbarer Belastungssituation, definiertem Stimulus von festgelegter Dauer und einer möglichen Kontrolle von Störvariablen.

Anzumerken ist, dass Menschen bereits Situationen, die mit einer Vielzahl an diagnostischen und experimentellen Versuchen verknüpft sind, als Stress empfinden, so dass unbeabsichtigter Stress die Untersuchungsergebnisse beeinflussen kann.

Fraglich ist auch, inwiefern die im Labor gewonnenen Beobachtungen stressinduzierter Veränderungen Rückschlüsse auf die Auswirkungen von Stress im alltäglichen Leben zulassen. Es ist daher wichtig zu bemerken, dass aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen keine allgemeingültige Aussage über den Einfluss von Stress auf das adaptive Immunsystem möglich.

### **Probandenauswahl**

Es gibt Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Stressantwort (Stoney et al. 1987, Matthews et al. 1991) in mentalen Belastungssituationen, wobei Männer eine ausgeprägtere kardiovaskuläre Reaktion zeigten (Stoney et al. 1987, Khaksari et al. 2005), so dass wir ausschließlich Männer in unsere Studie einschlossen. Auch bezüglich der Parameter Bildungsgrad, Familienstand und Body-Mass-Index handelte es sich um ein homogenes Probandenkollektiv.

Als Ausschlusskriterien galten chronische Erkrankungen, Alkohol- und Nikotinabusus sowie die Einnahme von Medikamenten, da das sympathische Nervensystem und die HPA-Achse extrem

sensitive physiologische Systeme sind, deren Aktivierung durch eine Bandbreite von psychologischen Erfahrungen und Stressoren, aber auch durch eine Vielzahl pharmakologischer Agenzien getriggert wird (Armario 2006). Auch Schlafstörungen in der Nacht vor der Untersuchung wurden in unserem Fragebogen erhoben, da Schlafmangel zu einer inadäquaten NK-Zell-Mobilisation (Wright et al. 2007) und damit zu einer verminderten immunologischen Aktivierung insgesamt führen kann.

### **Studiendesign**

Es handelt sich bei unserer Studie um eine kontrollierte Studie im Crossover-Design, wobei die Probanden gleichzeitig als ihre eigene Kontrolle dienten. Jeder Proband stellte sich an zwei unterschiedlichen Tagen zur Untersuchung bereit. Welcher Tag als Stress- oder Kontrolltag diente, entschied das Los. Die Randomisierung und die gewonnenen Kontrolldaten sollten den Einfluss der mentalen Belastung im direkten Vergleich verifizieren und einen möglichen Einfluss von Nervosität und einer gewissen Erwartungshaltung am ersten Untersuchungstag auf die Ergebnisse erfassen. Dabei dienten zur statistischen Auswertung der Kontrollgruppe die Daten der zehn Probanden mit der besten kardiovaskulären Reaktion unter Stress.

Alle Untersuchungen fanden am Vormittag statt, so konnten Fehler durch tageszeitliche Schwankungen in immunologischen Parametern minimiert werden.

Zur Untersuchung der immunologischen Parameter wurde Blut aus einer Venenverweilkanüle entnommen, da das periphere Blut einen Vorrat an Immunzellen für psychoneuroimmunologische Untersuchungen bietet. Es ist zudem das einzige, leicht zugängliche Immunkompartiment, das zelluläre und nicht zelluläre Bestandteile zur Diagnostik bereithält. Nach Anlage des Venenkatheters folgte eine, in der Literatur empfohlene, 30-minütige Ruhephase (Manuck et al. 1989). Angesichts der Blutabnahmen über eine Stunde nach Anlage der Venenverweilkanüle, ist eine durch die Kanüle induzierte lokale Entzündungsreaktion mit folgender Beeinflussung immunologischer Parameter nicht auszuschließen (Seiler et al. 1994). Eine wiederholte, direkte Venenpunktion könnte diesen unerwünschten Nebeneffekt ausschließen. Andererseits wurde so zusätzlicher Stress durch wiederholte Venenpunktion vermieden.

Die Ergebnisse wurden in unserem Fall in Form von Prozentangaben dargestellt. In der Literatur werden quantitative Veränderungen in den Lymphozytensubpopulationen sowohl als prozentualer Anteil als auch durch absolute Zellzahlen beschrieben, dabei bringen beide Darstellungen ähnliche Ergebnisse (Segerstrom et al. 2004). Dennoch sind prozentuale Angaben schwerer zu interpretieren, da für jeden angegebenen Parameter lineare Abhängigkeiten bestehen.

### **Limitationen der Studie**

Es handelt sich um eine Pilotuntersuchung mit einer kleinen Probandenzahl (n=31), wobei für die vorliegende Studie ausschließlich junge, gesunde Männer rekrutiert wurden. Zudem wurde ausschließlich stressinduzierte Veränderungen unter Einsatz eines speziellen, kurzzeitigen Stressors (Manometertest) untersucht. Die Beobachtungszeit lag insgesamt bei 90 Minuten, es liegen damit keine Daten über mögliche langfristige immunologische Veränderungen vor.

## **6.2 Ergebnisdiskussion**

### **6.2.1 Psychophysiologische Aktivierung**

#### **Psychologische Reagibilität**

Zur Prüfung der Frage, ob der eingesetzte Laborstressor tatsächlich eine psychische Belastung für die Probanden darstellte, wurde ein standardisierter Fragebogen zur Erfassung des subjektiv empfundenen Zustandsärgers, Teil I des STAXI, eingesetzt. Die Probanden beantworteten diesen Fragebogen zu drei Zeitpunkten im Versuchsverlauf: vor, direkt nach und im Anschluss an eine Erholungsphase nach Einfluss des Stressors.

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Zustandsärgers unter mentaler Belastung, welcher in der folgenden Erholungsphase wieder auf Ausgangsniveau zurückkehrte. Am Kontrolltag zeigten sich keinerlei signifikante Veränderungen des empfundenen Zustandsärgers.

Schon frühere Studien konnten zeigen, dass das STAXI akuten, stressinduzierten Ärger objektiv und sensitiv messen kann (Atanackovic et al. 2002, Atanackovic et al. 2003, Atanackovic et al. 2006), da die physiologische Stressreaktion oft negative Gedanken und Emotionen beinhaltet. Ärger ist eine wohl bekannte Emotion im Zusammenhang mit akutem Stress, weshalb Fragebögen zur objektiven Messung negativer Gefühle oft in psychoneuroimmunologischen Studien zur Anwendung kommen.

Mit Hilfe des psychologischen Fragebogens konnte in der vorliegenden Studie das subjektive Empfinden von kurzzeitigem, psychologischem Stress objektiviert und dessen statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

#### **Physiologische Reagibilität**

Zur Objektivierung der Stresssituation anhand einer physiologischen Aktivierung erfolgte die Messung von Herzfrequenz und Blutdruck (systolisch/ diastolisch).

Unter Einfluss des Stressors konnte ein signifikanter Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck, sowohl systolisch als auch diastolisch gezeigt werden. In den anschließend gemessenen Ruhephasen blieben systolischer und diastolischer Blutdruck signifikant erhöht, während die Herzfrequenz in der ersten Ruhephase wieder auf Ausgangsniveau und schließlich signifikant unter die Basalwerte abfiel.

In der Literatur dienen Anstiege von Herzfrequenz und Blutdruck als geeignete Parameter zur Validierung einer akuten Belastungssituation (Kiecolt-Glaser et al. 1992) und korrelieren mit Belastungssituationen im Alltag (Fredrikson et al. 1990). Besonders der Herzfrequenzanstieg stellt ein bevorzugtes Instrument zur Quantifizierung akuten psychischen Stresses dar (Herbert et al. 1994, Larson et al. 2001, Ader 2007).

Die direkt unter Belastung nachweisbaren kardiovaskulären Veränderungen sind als Zeichen einer sympathischen Aktivierung des Nervensystems zu werten. Dieser Effekt wird über die Ausschüttung von Katecholaminen und die unmittelbare sympathische Innervation von lymphatischen Organen vermittelt.

Am Kontrolltag zeigten sich im direkten Vergleich zwischen Ruhephase und anschließender Belastungsphase keine signifikanten Anstiege der kardiovaskulären Parameter dar. Der signifikante Anstieg der Blutdruckwerte gegen Ende des Versuchs könnte Ausdruck einer vegetativen Reaktion aufgrund der langen Immobilität sein.

Es ist uns gelungen eine, mit im Alltag auftretenden mentalen Belastungssituationen vergleichbare, akute Stresssituation im Labor herzustellen. Die Daten belegen sowohl eine psychische als auch eine kardiovaskuläre Reaktion im Rahmen einer Aktivierung des SNS unter Einfluss des Stressors. Diese kurzfristig auftretenden und nach Ende des Stimulus reversiblen Veränderungen wurden statistisch signifikant bestätigt.

Zusammenfassend konnte die objektive Erfassung der psychischen Aktivierung und die daraus folgende Stimulation des SNS, die sich wiederum in einer Steigerung der kardiovaskulären Parameter Herzfrequenz und Blutdruck abbildet, die Wirksamkeit des verwendeten Stimulus-Programms als mentalen Stressor zeigen und bildet damit die Basis für nachweisbare immunologische Effekte.



## 6.2.2 Immunologische Variablen

Nachfolgende Untersuchungen sollten zeigen, ob die anhand der kardiovaskulären und psychologischen Parameter beobachtete Aktivierung unter Stress auch Veränderungen in der Verteilung verschiedener T-Zell-Subpopulationen, messbar im peripheren Blut unserer Probanden, zeigen würden. Dabei stand die Untersuchung von (i)NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, als bisher in diesem Zusammenhang wenig untersuchte Effektorzellen, im Vordergrund. Zu diesem Zweck erfolgte je eine Blutentnahme zu den folgenden drei Zeitpunkten: vor, direkt nach und im Anschluss an eine Erholungsphase nach Einfluss des Stressors.

Im Hinblick auf die zeitliche Manifestation einer Immunantwort gibt es Daten, die bereits acht Minuten nach Beginn des Stressstimulus quantitative Veränderungen im peripheren Blut belegen. Bei so schnellen Reaktionen ist es unwahrscheinlich, dass diese auf eine Aktivierung der HPA-Achse zurückzuführen sind, da die Plasmakortisollevel ihren Höhepunkt erst 30 Minuten nach Beginn des Stressors erreichen (Herbert et al. 1994). In unserer Untersuchung sind immunologische Veränderungen in der Messphase „stress“ folglich primär auf eine Aktivierung des SNS zurückzuführen, während sich in der Messphase „post“ zusätzlich die Aktivierung der HPA-Achse widerspiegelt.

### 6.2.2.1 *Auswirkungen des Stressexperiments auf NK-Zellen und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten*

Vor der Prüfung der aufgestellten Hypothesen fand eine Basisanalyse zu Veränderungen der NK-Zellen sowie der Gesamtheit der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut statt. NK-Zellen werden gewöhnlich definiert durch ihren CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> Phänotyp (Borrego et al. 2002).

In unserer Arbeit konnte unter akutem Stress eine kurzfristige, signifikante Erhöhung der NK-Zellzahl prozentual am Gesamtlymphozytenpool des peripheren Blutes beobachtet werden. Dieses Phänomen ist aus der Literatur wohl bekannt und scheint der zuverlässigste Effekt kurzzeitiger, akuter Stressoren auf unser Immunsystem zu sein (Schedlowski et al. 1993b, Ackerman et al. 1996, Segerstrom et al. 2004). Unsere Daten konnten dies erneut bestätigen.

Daneben zeigte sich ein signifikanter Abfall der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, der bis zum Untersuchungsende anhielt. Die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen zeigten keine signifikante

Veränderung direkt im Anschluss an die mentale Belastung, fielen aber im weiteren Verlauf signifikant ab.

Bezüglich dieser beiden Parameter ist auch die Studienlage nicht eindeutig. Frühere Studien zeigten unter Gabe von Katecholaminen (als Mediatoren einer akuten Stressantwort) neben einem Anstieg der NK-Zellzahl auch einen Anstieg der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (Herbert et al. 1994). Andere beobachteten einen Abfall der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Crary et al. 1983) und wieder andere beobachteten einen gleichzeitigen Abfall der T- und B-Zellen (Schedlowski et al. 1993a, Benschop et al. 1996). Immunologische Veränderungen unter akuten Stressoren sind den beschriebenen Veränderungen unter Adrenalininjektionen sehr ähnlich. Dennoch ist die Aktivierung des SNS nur ein möglicher Weg über den das ZNS die Lymphozytenmigration beeinflussen kann.

Ein differenzierter Abfall der CD4<sup>+</sup>T-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der NK-Zellzahl wurde schon früher unter kurzfristigem Laborstress beobachtet (Bachen et al. 1992). Die Metaanalyse von Segerstrom und Miller 2004 lässt jedoch in einem Vergleich bisheriger Studien keine eindeutige Umverteilung von T-Helferzellen und lediglich eine Tendenz zu einem Anstieg der zytotoxischen T-Zellen unter Stress erkennen.

Die CD4/ CD8-Ratio scheint hingegen glaubhaft zu sinken (Bachen et al. 1992, Segerstrom et al. 2004). Ein signifikanter Abfall der CD4/ CD8-Ratio unter Stress konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und zeigt, dass es zu einer Verschiebung der Balance zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, hin zu zytotoxischen T-Zellen kommt.

Vorstudien lassen vermuten, dass es unter akutem psychischem Stress zu einer kurzfristigen Umverteilung von vier anhand der Expression von CD45RA und des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7 definierten Subpopulationen kommt. Hierbei scheinen antigenerfahrene Effektor-T-Zellen (CCR7<sup>-</sup>) verstärkt ins periphere Blut mobilisiert zu werden, während der prozentuale Anteil naiver T-Zellen sowie zentraler Gedächtniszellen (CCR7<sup>+</sup>) im peripheren Blut abnimmt. Es scheint sich um eine spezifische Umverteilung der Zellsubpopulationen in die Kompartimente zu handeln, in denen sie sich am effektivsten an einer Immunreaktion beteiligen können (Atanackovic et al. 2006, Freier et al. 2010). Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, warum es zu keiner eindeutig zielgerichteten Veränderung der Gesamtheit an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter Stress kommt.

### **6.2.2.2 Auswirkungen des Stressexperiments auf CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen und 6B11<sup>+</sup>/CD1d-Tetramer<sup>+</sup> iNKT-Zellen : zu Hypothese 1**

Neben klassischen NK-Zellen und T-Zellen ist die Subpopulation der NKT-Zellen gekennzeichnet durch die Koexpression von TZR und NK-Marker CD56 (Metelitsa 2004). Zur Prüfung der aufgestellten Hypothese erfolgte die weitere Differenzierung von NKT-Zellen, einer phänotypisch und funktionell heterogenen Gruppe von T-Zellen. Es wurden folgende Antikörper verwendet: CD3, CD56, 6B11 und  $\alpha$ -GalCer-geladenes CD1d-Tetramer. Die letzten beiden Antikörper markieren dabei iNKT-Zellen, hochpotente Effektorzellen, die durch eine massive Ausschüttung von Zytokinen direkt nach ihrer Aktivierung gekennzeichnet sind (Wu et al. 2009). Diese Zytokine können wiederum eine Vielzahl von Zellen sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Abwehr aktivieren und die Qualität der adaptiven Immunität beeinflussen. (i)NKT-Zellen wirken demnach an der Schnittstelle der angeborenen und erworbenen Immunität und scheinen zusätzlich eine bedeutende immunregulatorische Rolle sowohl in der Abwehr mikrobieller Infektionen, der Entwicklung von Autoimmunität, aber auch in der Tumorummunität zu spielen (Smyth et al. 2000, Salio et al. 2009, Van Kaer et al. 2010). Sie bieten daher einen vielversprechenden Ansatz für den therapeutischen Einsatz bei Autoimmun- und Tumorerkrankungen (Berzins et al. 2005).

Da all diese Erkrankungen scheinbar entscheidend durch Stress beeinflusst werden, wurden in der vorliegenden Arbeit quantitative Veränderungen der (i)NKT-Zellen im peripheren Blut untersucht.

In einer Vorstudie konnte bereits einmalig ein Anstieg der CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen unter akutem psychischem Stress gezeigt werden (Atanackovic et al. 2006). Es liegen meines Wissens keine Studien zu quantitativen Veränderungen von iNKT-Zellen unter akutem Laborstress vor.

**Hypothese 1: Unter akuter mentaler Belastung kommt es bei gesunden, männlichen Probanden zu einem Anstieg des Anteils an CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen und einer gleichgerichteten Veränderung von 6B11<sup>+</sup> und CD1d-Tetramer<sup>+</sup> iNKT-Zellen im peripheren Blut, gemessen am Gesamtlymphozytenpool.**

Die Hypothese konnte anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse nur in Teilen bestätigt werden.

In unserer Studie zeigte sich ein kurzfristiger, signifikanter Anstieg der CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen unter Stress während die CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen in ihrem Anteil am Gesamtlymphozytenpool unverändert blieben.

Aus einer einzelnen Vorstudie liegen vergleichbare Daten unter akutem Laborstress vor. Hier konnte in einer Stichprobe von 22 Probanden ein Anstieg sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen beobachtet werden (Atanackovic et al. 2006). Bei der Mehrheit der NKT-Zellen handelt es sich jedoch um zytotoxische CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen. CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen hingegen scheinen die durch zytotoxische T-Zellen vermittelte anti-Tumor Immunität zu supprimieren (Terabe et al. 2000). Die von uns untersuchte Subpopulation von CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> T-Zellen ist mit einem Anteil von 0,33 % am Gesamtlymphozytenpool im peripheren Blut jedoch sehr klein, so dass kaum eine klinische Relevanz für immunologische Stressreaktionen zu erwarten ist.

Bei der Untersuchung der iNKT-Zellen am Beispiel der 6B11<sup>+</sup> und CD1d-Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen sowie ihrer drei Subpopulationen (DN, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen über den Versuchsverlauf. Bisher liegen zu diesen Subpopulationen keine Daten zu quantitativen Veränderungen unter akutem, psychischem Stress vor. Auch hier zeigte sich ein ausgesprochen geringer prozentualer Anteil dieser Zellpopulationen von 0,24% am Gesamtlymphozytenpool des peripheren Blutes. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich iNKT-Zellen bevorzugt in anderen Kompartimenten aufhalten und die Untersuchung im peripheren Blut daher nicht optimal ist.

Unserer Hypothese lag die Vermutung zugrunde, dass NKT-Zellen aufgrund ihrer

morphologischen und funktionellen Ähnlichkeit zu NK-Zellen, unter akutem Stress ebenso ins periphere Blut mobilisiert werden. Für die Hauptpopulation, die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen, konnte diese Hypothese signifikant bestätigt werden.

Gleichzeitig regulieren NKT-Zellen aber offensichtlich grundlegende Aspekte der Immunität, denn ein Defizit bzw. eine Dysfunktion von NKT-Zellen führte im Tierversuch zu einer Reihe von Autoimmunerkrankungen und Krebs (Berzins et al. 2005). Wir wissen aus vorangegangenen Untersuchungen, dass andere regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) unter psychischem Stress abfallen, also scheinbar herabreguliert werden, um eine effektive Immunantwort im Sinne einer „fight-or-flight“-Reaktion zu ermöglichen (Freier et al. 2010).

Es handelt sich bei den NKT-Zellen damit um Zellen, mit sowohl immunstärkenden als auch immunregulierenden Funktionen (Smyth et al. 2000). Unter akutem Stress werden zytotoxische NKT-Zellen, die entscheidend zur Tumorablewehr beitragen, offenbar heraufreguliert, während supprimierende CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen unverändert bleiben. Diese Daten stärken die These, dass es unter akutem Stress zu einer selektiven Mobilisierung von Effektor-T-Zellen ins periphere Blut kommt (Atanackovic et al. 2006), und erweitern diese um die Subpopulation der NKT-Zellen. Es sind weiterführende Untersuchungen nötig um die Rolle der 6B11<sup>+</sup> und CD1d Tetramer<sup>+</sup> iNKT-Zellen in der stressinduzierten Immunreaktion zu klären.

### **6.2.2.3 Auswirkungen des Stressexperiments auf $\gamma\delta$ -T-Zellen: zu Hypothese 2**

Es gibt bereits verlässliche Daten, die beim Menschen eine Mobilisation von zytotoxischen Lymphozyten (NK-Zellen, CTL) ins periphere Blut unter akutem Stress belegen (Bosch et al. 2005, Atanackovic et al. 2006, Isowa et al. 2006). Eine weitere zytotoxische Lymphozytensubpopulation, die  $\gamma\delta$ -T-Zellen, wurde bis zu Beginn der vorliegenden Studie nicht in diesem Zusammenhang untersucht. Diese molekular, phänotypisch und funktionell heterogene Zellpopulation (Hayday 2000), scheint jedoch eine Schlüsselrolle in immunologischen Prozessen, wie Wundheilung, mikrobieller Abwehr und Tumorkontrolle, zu spielen und damit hohe klinische Relevanz zu haben.

**Hypothese 2:        Unter gleichen Versuchsbedingungen kommt es zu einem Anstieg des Anteils an  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut.**

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese.

Unsere Daten konnten unter akuter mentaler Belastung einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils der  $\gamma\delta$ -T-Zellen am Gesamtymphozytenpool zeigen. Die Werte fielen nach Ende der Belastung rasch wieder auf Ausgangsniveau ab.

Bei isolierter Betrachtung der DN-, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -Subpopulationen zeigte auch die Hauptgruppe der doppeltnegativen  $\gamma\delta$ -T-Zellen einen kurzdauernden, direkten Anstieg unter Stress, während CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen keinen signifikanten Veränderungen unterlagen.

Lymphozyten zirkulieren ständig zwischen verschiedenen Organen sowie dem peripheren Blut, um eine effektive Immunreaktion zu gewährleisten. Die Anzahl und Proportionen der Leukozyten im peripheren Blut geben damit einen repräsentativen Einblick in die Verteilung verschiedener Zellpopulationen und den Grad der Aktivierung unseres Immunsystems. Unter akutem Stress scheint es zu einer Umverteilung von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen zu kommen, wobei jede Population in das Kompartiment mobilisiert wird, wo sie am effektivsten ihre Funktion ausüben kann. Die Haut und Lymphknoten wurden als mögliche Zielorgane beschrieben (Dhabhar et al. 1996). Die Umverteilung von Lymphozyten wird dabei als erster Schritt einer effizienten, stressinduzierten Abwehrreaktion angesehen. So beschreibt Dhabhar dieses Phänomen als Aktivierung unserer körpereigenen Soldaten (Leukozyten), die daraufhin ihre Baracken in Form der lymphatischen Organe (Milz, Knochenmark) verlassen und über die Straßen (Blut- und Lymphbahnen) zu ihrem Einsatzort gelangen, wo sie Stellung beziehen für die immunologische Schlacht (Dhabhar 2003).

Unsere Daten unterstützen die Hypothese einer stressinduzierten Mobilisation von zytotoxischen, effektororientierten, zellulären Komponenten in das periphere Blut am Beispiel der  $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Eine 2009 publizierte Studie zeigte ebenfalls eine Mobilisation von  $\gamma\delta$ -T-Zellen unter akutem, psychischem Stress in Form von öffentlicher Rede aber auch physischem Training sowie unter Infusion eines  $\beta$ -Agonisten (Anane et al. 2009). Dieser Effekt scheint plausibel durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren vermittelt, ebenso wie die Mobilisation von NK-Zellen und  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen (Sanders et al. 2002). Während die Daten dieser Arbeitsgruppe eine Korrelation zwischen dem Anstieg der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Herzfrequenz zeigen konnten, gelang dies bei unseren eigenen Daten nicht. Dennoch beobachteten wir die  $\gamma\delta$ -T-Zell-Mobilisation parallel zu einer autonomen Aktivierung, sichtbar in der Steigerung der kardiovaskulären Parameter.

In einer weiterführenden Studie konnte die gleiche Arbeitsgruppe um Anane zeigen, dass bei weiterer Differenzierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen anhand von CD45RA und CD27 in vier Gedächtnis-Phänotypen: naive-, zentrale Gedächtnis-, antigenerfahrene Effektor- und  $CD45RA^+$  Effektor-Zellen (EMRA), speziell Letztere unter Stress in weit größerem Maß ins periphere Blut mobilisiert werden (Anane et al. 2010). Diese Beobachtung ist mit der Hypothese einer stressinduzierten, selektiven Mobilisierung von Effektorzellen konsistent, die auch Vorstudien der Arbeitsgruppe um Atanackovic an konventionellen T-Zellen zeigen konnten (Atanackovic et al. 2006, Freier et al. 2010). Eine weitere Arbeit untersuchte Effekte einer Adrenalininjektion sowohl in vivo als auch in vitro und konnte ebenfalls einen schnellen, kurzdauernden Anstieg der DN  $\gamma\delta$ -T-Zellen in menschlichem Blut zeigen (Dimitrov et al. 2010).

Auch wenn es sich mit 2-10% aller zirkulierenden T-Zellen beim erwachsenen Menschen um eine quantitative Minderheit handelt (Groh et al. 1989, Carding et al. 2002, Brandes et al. 2005, Kabelitz et al. 2007), so stellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen doch die größte, zirkulierende Gedächtniszellpopulation im peripheren Blut dar (Tikhonov et al. 2006). Es scheint sich um eine Zellpopulation zu handeln, die in der Lage ist, andere Immunzellen schnell anzulocken und zu stimulieren (Tikhonov et al. 2006), denn  $\gamma\delta$ -T-Zellen können als antigenpräsentierende Zellen agieren. Aktivierte Zellen präsentieren prozessierte Antigene und scheinen so an der Induktion der adaptiven Immunantwort mitzuwirken (Brandes et al. 2005).

Es gibt zunehmend Beweise, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine unverzichtbare Rolle in der mikrobiellen Abwehr durch die selektive Erkennung bakterieller Metaboliten und einiger viraler Antigene spielen (Hayday 2000, Kabelitz et al. 2007). Die breite antimikrobielle und Antitumorreaktivität

von  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie ihre Fähigkeit der Produktion inflammatorischer Zytokine, die an der protektiven Abwehr von intrazellulären Pathogenen und Tumoren beteiligt sind, sowie ihre starke lytische Aktivität, lassen eine direkte Beteiligung an der Immunkontrolle von Krebserkrankungen und Infektionen vermuten (Bonneville et al. 2006).

Diese Beobachtungen haben zur Entwicklung neuer immunotherapeutischer Ansätze geführt und liefern bereits ermutigende Resultate von Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Zudem wird ihnen eine Funktion in der Förderung von Wundheilung zugeschrieben (Girardi 2006).

So lässt eine stressinduzierte  $\gamma\delta$ -T-Zell-Mobilisation vermuten, dass der rasche Aufmarsch von  $\gamma\delta$ -T-Zellen unter akutem, psychischen Stress hilft in möglicherweise bedrohlichen Situationen Immunzellen anzulocken und somit die Möglichkeiten für Antigenkontakt bietet und gleichzeitig in Erwartung von Gewebeschäden die Wundheilung verbessern könnte.

Zusammenfassend lieferte unsere Studie erstmals Daten zum Nachweis einer stressinduzierten Mobilisation von  $\gamma\delta$ -T-Zellen unter Einfluss eines mentalen Laborstressors. So scheinen diese hochpotenten Effektorzellen einen möglichen Schutz in Stresssituationen und möglicherweise vor anderen bedrohlichen Situationen, wie Tumorerkrankungen, zu bieten.

#### ***6.2.2.4 Auswirkungen des Stressexperiments auf die Verteilung von Th1/ Th2-Zellen, differenziert anhand von CD226 und CRTH2***

Zusätzlich untersuchten wir deskriptiv, ob es unter akutem Laborstress zu einer Verschiebung der Th1/ Th2-Balance kommt. Erwartet wurde ein Shift von Th1 zu Th2-Zellen unter akuter mentaler Belastung, wie er in früheren Arbeiten *in vitro* unter dem Einfluss von Stresshormonen beobachtet wurde (Xiang et al. 2011).

Zur Differenzierung verwendeten wir den Oberflächenmarker CD226, der zuvor als spezifischer Oberflächenmarker für Th1-Zellen beschrieben wurde (Dardalhon et al. 2005). Th2-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CRTH2 identifiziert, dem scheinbar zuverlässigsten Marker für dies Lymphozytensubpopulation (Saito et al. 2002).



Tatsächlich kam es bei den T-Helferzellen zu einem kurzzeitigen, signifikanten Abfall der CD226<sup>+</sup> T-Zellen direkt nach Belastung. Gleichzeitig stieg der prozentuale Anteil der CRTH2<sup>+</sup> T-Helferzellen signifikant an, jedoch erst verzögert nach Einsetzen des Stressors.

Bei Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen zeigte sich überraschend ein Anstieg sowohl der CD226<sup>+</sup> als auch der CRTH2<sup>+</sup> Zellen. Auch hier zeigte sich der Effekt bei den CD8<sup>+</sup>/CRTH2<sup>+</sup> T-Zellen erst verzögert.

Aufgrund der aus Vorstudien aufgestellten These, dass eine Umverteilung der Lymphozyten nicht alle Subpopulationen gleichermaßen betrifft, erfolgte die weitere Unterteilung in naive/zentrale Gedächtnis-T-Zellen und ausdifferenzierte, antigenerfahrene Effektor-T-Zellen anhand des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7. Sallusto konnte erstmals zeigen, dass menschliche Gedächtnis-T-Zellen sich anhand dieses Chemokinrezeptors in zwei funktionell verschiedene Subpopulationen teilen lassen (Sallusto et al. 2000). Während CCR7<sup>+</sup> Gedächtniszellen Rezeptoren zur Migration in entzündliches Gewebe besitzen und direkt Effektorfunktionen vermitteln, exprimieren CCR7<sup>+</sup> Gedächtniszellen den Lymphknoten-Homing-Rezeptor ohne Effektorfunktionen ausüben zu können (Sallusto et al. 1999).

Bei Betrachtung der differenzierten Subpopulationen ergibt sich nun interessanterweise mit Ausnahme der CD4<sup>+</sup>/CD226<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> T-Zellen ein Anstieg aller sonstigen Effektorzellen, wenn auch im Falle der CRTH2<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen das Signifikanzniveau erneut erst verzögert erreicht wird. In Anlehnung an vorangegangene Untersuchungen stärken die Ergebnisse die postulierte stressinduzierte, selektive Mobilisierung speziell von Effektorzellen in das periphere Blut. So scheint Stress die Retention weniger reifer T-Zellen im lymphatischen Gewebe oder der Haut bei gleichzeitiger Mobilisation von T-Zellen vom Effektortyp ins periphere Blut zu bewirken (Atanackovic et al. 2006).

Kritisch bleibt die nicht eindeutige Studienlage zu CD226 als möglichem Marker für Th1-Zellen anzumerken. Es gibt lediglich eine Untersuchung an Mäusen, die eine Spezifität dieses Oberflächenmoleküls für Th1-Zellen beschreibt (Dardalhon et al. 2005). Diese Daten ließen vermuten, dass CD226 ein kostimulatorisches Molekül ist und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Vermittlung der Effektorfunktion von Th1-Zellen spielt.

Eine japanische Arbeitsgruppe hingegen konnte die Expression von CD226 in der Mehrheit in vitro polarisierter Th1- und Th2-Zellen nachweisen und zweifelt daher die Spezifität dieses Markers an (Shibuya et al. 2006). Dieses Phänomen scheint abhängig vom Zeitpunkt und Differenzierungsgrad zu sein. Während CD226 zunächst auf der Mehrzahl aktivierter T-Zellen zu finden ist, scheint es durch mehrfache Polarisierung auf Th2-Zellen herunterreguliert und gleichzeitig verstärkt auf Th1-Zellen exprimiert zu werden. So dass schließlich der Nachweis nach Reifung nur noch auf Th1-Zellen gelingt (Dardalhon et al. 2005).

Während man sich einig ist, dass Th1 und Th2-Zellen verschiedene Rollen in der Immunabwehr spielen, gibt es unterschiedliche Meinungen zur Identifizierung spezifischer Oberflächenmarker. Bisher wurden beide Subpopulationen primär anhand ihres Zytokinmusters unterschieden. Es wurden jedoch weitere Subpopulationen, beispielsweise Th19 und Th22 definiert und neuere Studien ließen den Verdacht aufkommen, dass eine Umwandlung von einer Subpopulation in eine andere möglich ist. All diese Fakten stellen das Th1/ Th2-Konzept in sich in Frage und werfen die Frage auf, ob es überhaupt Th1/ Th2-spezifische Oberflächenmarker gibt. Diese Limitierungen und Zweifel machen es schwierig, die von uns gewonnenen Daten zu deuten. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um die Aktualität des Konzepts zu überprüfen und gegebenenfalls eindeutige, spezifische Marker zu identifizieren.

### 7 Zusammenfassung

Die Auswirkungen psychologischen Stresses auf das menschliche, erworbene Immunsystem wurden bisher nur unzureichend untersucht. Während Daten zu konventionellen T-Zellen in diesem Zusammenhang vorliegen, gibt es zu iNKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen bisher keine Untersuchungen. Unsere Studie analysierte daher stressinduzierte Effekte auf unkonventionelle T-Zell-Subpopulationen in einem Kollektiv von 31 gesunden, männlichen Probanden. Zur Unterscheidung distinkter T-Zell-Populationen diente deren Expression von Oberflächenmarkern. Akuter psychischer Stress verursachte neben bekannten Effekten, wie einem Anstieg des Anteils der NK- und  $CD8^+$  NKT-Zellen, keine signifikanten Veränderungen des Anteils an  $CD4^+$  NKT-Zellen,  $6B11^+$  und  $CD1d$ -Tetramer<sup>+</sup> iNKT-Zellen am Gesamtlymphozytenpool. Es konnte jedoch erstmals eine signifikante, stressinduzierte Mobilisation von  $\gamma\delta$ -T-Zellen ins periphere Blut gezeigt werden.

#### Probanden und Methoden

Es wurde eine kontrollierte, klinische Studie mit 31 gesunden, männlichen Probanden durchgeführt. Jeder Proband stellte sich an zwei Tagen zur Untersuchung zur Verfügung. Das Stressexperiment erfolgte an einem der beiden Tage in Form eines standardisierten, mentalen Belastungstests am Computer, der zweite Tag diente als Kontrolltag. Zur Erfassung und Auswertung stressinduzierter Veränderungen wurden kardiovaskuläre, psychologische und immunologische Parameter erfasst. Hierzu erfolgten jeweils vor, direkt nach Stress und nach einer anschließenden Ruhephase Aufzeichnungen von HF und RR, die Auswertung eines psychologischen Fragebogens (STAXI) zur Beurteilung des Zustandsärgers sowie die Differenzierung und quantitative Auswertung von T-Zell-Subpopulationen (iNKT,  $\gamma\delta$ -T-Zellen) im peripheren Blut mittels FACS-Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit SPSS für Windows. Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests wurden die Werte der Baseline mit den späteren Untersuchungszeitpunkten verglichen und das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### Ergebnisse

Unter akuter mentaler Belastung zeigte sich keine signifikante Veränderung des prozentualen Anteils von 6B11<sup>+</sup> und CD1dTetramer<sup>+</sup> iNKT-Zellen, wohl aber ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,01$ ) der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut gesunder, männlicher Probanden. Kurz nach Ende des Stressors fielen die Werte wieder auf Ausgangsniveau ab.

Bekannte Beobachtungen, wie die Mobilisierung von NK-Zellen und zytotoxischen NKT-Zellen unter akutem Stress, konnten zudem bestätigt werden.

### Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie liefert einen Beitrag zum näheren Verständnis stressinduzierter, quantitativer Veränderungen der T-Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut gesunder, männlicher Probanden. Die vorliegenden Daten konnten erstmals unter akutem, psychischem Stress eine Mobilisierung von unkonventionellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen ins periphere Blut zeigen. Diese Beobachtung geht mit der These einher, dass es unter Stress zu einer Umverteilung der Lymphozyten kommt, wobei speziell Effektorzellen, wie auch NK-, zytotoxische T- und NKT-Zellen, ins periphere Blut mobilisiert werden. Ein gleichgerichteter Anstieg des Anteils an iNKT-Zellen (6B11<sup>+</sup>/CD1dTetramer<sup>+</sup>) am Gesamtlymphozytenpool konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Es sind daher weitere intensive Untersuchungen nötig um psychoneuroimmunologische Zusammenhänge und die Auswirkungen von akutem, psychischem Stress auf unsere Immunfunktionen noch besser verstehen zu können.

## 8 Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APC	Allophycocyanin, Antigenpräsentierende Zellen
BP	Blood pressure
BSA	Bovine Serum Albumin
$\alpha$ GalCer	alpha-Galactosylceramide
CCR7	Chemokine receptor
CD	Cluster of Differentiation
CRH	Corticotropin releasing hormon
CRTH2	Chemoattractant receptor homologous-molecule expressed on T-helper-type-2-cells
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negative (CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup> )
DNAM1	DNAX accessory molecule-1, CD226
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
FOXP3	Transcription factor forkhead box P3
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony – stimulating factor
GvHD	Graft-versus-Host-disease
HF	Herzfrequenz
HPA	Hypothalamo-Pituitary-Adrenal
IFN $\gamma$ , - $\alpha$	Interferon-gamma, -alpha
IL	Interleukin
iNKT-Zellen	invariant chain Natural Killer T-Zellen
LAP	Latency associated peptide
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononukleäre Zellen
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
NKT-Zellen	Natural Killer T-Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PGD2	Prostaglandin D2
PNI	Psychoneuroimmunologie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
Sig.	Signifikanz
SNS	Symphatisches Nervensystem
SSC	side scatter
STAXI	State-Trait-Ärgerausdrucks-Inventar
TNF $\alpha$ , - $\beta$	Tumor Nekrose Faktor-alpha, -beta
Treg/ Tregs	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Literaturverzeichnis

**Abbey DE, Colome SD, Mills PK, Burchette R, Beeson WL, Tian Y (1993)**

Chronic disease associated with long-term concentrations of nitrogen dioxide  
*J Expo Anal Environ Epidemiol*, 3, 181-202.

**Ackerman KD, Martino M, Heyman R, Moyna NM, Rabin BS (1996)**

Immunologic response to acute psychological stress in MS patients and controls  
*J Neuroimmunol*, 68, 85-94.

**Ader R, Cohen N (1975)**

Behaviorally conditioned immunosuppression *Psychosom Med*, 37, 333-340.

**Ader R (2007)**

*Psychoneuroimmunology* 4. ed., San Diego: Elsevier Academic Press.

**Anane LH, Edwards KM, Burns VE et al. (2009)**

Mobilization of gammadelta T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and beta-agonist infusion *Brain Behav Immun*, 23, 823-829.

**Anane LH, Edwards KM, Burns VE, Zanten JJ, Drayson MT, Bosch JA (2010)**

Phenotypic characterization of gammadelta T cells mobilized in response to acute psychological stress *Brain Behav Immun*, 24, 608-614.

**Anderson AE, Isaacs JD (2008)**

Tregs and rheumatoid arthritis *Acta Reumatol Port*, 33, 17-33.

**Armario A (2006)**

The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors?  
*CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5, 485-501.

**Atanackovic D, Brunner-Weinzierl MC, Kroger H, Serke S, Deter HC (2002)**

Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species *Immunol Invest*, 31, 73-91.

**Atanackovic D, Schulze J, Kroger H, Brunner-Weinzierl MC, Deter HC (2003)**

Acute psychological stress induces a prolonged suppression of the production of reactive oxygen species by phagocytes *J Neuroimmunol*, 142, 159-165.

**Atanackovic D, Schnee B, Schuch G et al. (2006)**

Acute psychological stress alerts the adaptive immune response: stress-induced mobilization of effector T cells *J Neuroimmunol*, 176, 141-152.

**Bachen EA, Manuck SB, Marsland AL et al. (1992)**

Lymphocyte subset and cellular immune responses to a brief experimental stressor  
*Psychosom Med*, 54, 673-679.

**Bartrop RW, Luckhurst E, Lazarus L, Kiloh LG, Penny R (1977)**

Depressed lymphocyte function after bereavement *Lancet*, 1, 834-836.

**Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M (1996)**

Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions  
*Brain Behav Immun*, 10, 77-91.

**Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI (2005)**

Working with NKT cells--pitfalls and practicalities *Curr Opin Immunol*, 17, 448-454.

**Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Muller J (1975)**

Changes in blood hormone levels during the immune response  
*Proc Soc Exp Biol Med*, 150, 466-470.

**Black PH (2003)**

The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X  
*Brain Behav Immun*, 17, 350-364.

**Bonneville M, Scotet E (2006)**

Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors *Curr Opin Immunol*, 18, 539-546.

**Borrego F, Kabat J, Kim DK et al. (2002)**

Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells *Mol Immunol*, 38, 637-660.

**Bosch JA, Ring C, de Geus EJ, Veerman EC, Amerongen AV (2002)**

Stress and secretory immunity *Int Rev Neurobiol*, 52, 213-253.

**Bosch JA, Berntson GG, Cacioppo JT, Marucha PT (2005)**

Differential mobilization of functionally distinct natural killer subsets during acute psychologic stress *Psychosom Med*, 67, 366-375.

**Brandes M, Willmann K, Moser B (2005)**

Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells  
*Science*, 309, 264-268.

**Brenner MB, McLean J, Dialynas DP et al. (1986)**

Identification of a putative second T-cell receptor *Nature*, 322, 145-149.

**Burns VE, Drayson M, Ring C, Carroll D (2002)**

Perceived stress and psychological well-being are associated with antibody status after meningitis C conjugate vaccination *Psychosom Med*, 64, 963-970.

**Cannon WB (1914)**

The emergency function of the adrenal medulla in pain and major emotions.  
*American Journal of Physiology*, 33, 356-372.

**Carding SR, Egan PJ (2002)**

Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity *Nat Rev Immunol*, 2, 336-345.

**Cohen F, Kemeny ME, Kearney KA, Zegans LS, Neuhaus JM, Conant MA (1999)**  
Persistent stress as a predictor of genital herpes recurrence *Arch Intern Med*, 159, 2430-2436.

**Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA (2008)**  
Human regulatory T cells and autoimmunity *Eur J Immunol*, 38, 921-924.

**Crary B, Hauser SL, Borysenko M et al. (1983)**  
Epinephrine-induced changes in the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood of humans *J Immunol*, 131, 1178-1181.

**Dardalhon V, Schubart AS, Reddy J et al. (2005)**  
CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions *J Immunol*, 175, 1558-1565.

**Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H et al. (2008)**  
IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells *Nat Immunol*, 9, 1347-1355.

**van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N et al. (2001)**  
Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage *Clin Immunol*, 100, 144-148.

**Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL (1996)**  
Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones *J Immunol*, 157, 1638-1644.

**Dhabhar FS, McEwen BS (1997a)**  
Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking *Brain Behav Immun*, 11, 286-306.

**Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1997b)**  
Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress *Neuroendocrinology*, 65, 360-368.

**Dhabhar FS (2003)**  
Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function *Ann N Y Acad Sci*, 992, 205-217.

**Dimitrov S, Lange T, Born J (2010)**  
Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine *J Immunol*, 184, 503-511.

**Eberl G, Lees R, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR (1999)**  
Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells *J Immunol*, 162, 6410-6419.

**Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000)**  
The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system *Pharmacol Rev*, 52, 595-638.



**Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S (1997)**

Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells  
*J Exp Med*, 186, 109-120.

**Eyerich S, Eyerich K, Pennino D et al. (2009)**

Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling  
*J Clin Invest*, 119, 3573-3585.

**Felten SY, Olschowka J (1987)**

Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synaptolike contacts on lymphocytes in the splenic white pulp  
*J Neurosci Res*, 18, 37-48.

**Fredrikson M, Tuomisto M, Lundberg U, Melin B (1990)**

Blood pressure in healthy men and women under laboratory and naturalistic conditions  
*Journal of Psychosomatic Research*, 34, 675-686.

**Freier E, Weber CS, Nowotny U et al. (2010)**

Decrease of CD4(+)FOXP3(+) T regulatory cells in the peripheral blood of human subjects undergoing a mental stressor  
*Psychoneuroendocrinology*, 35, 663-673.

**Gerra G, Monti D, Panerai AE et al. (2003)**

Long-term immune-endocrine effects of bereavement: relationships with anxiety levels and mood  
*Psychiatry Res*, 121, 145-158.

**Girardi M (2006)**

Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells  
*J Invest Dermatol*, 126, 25-31.

**Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Bonneau RH, Malarkey W, Kennedy S, Hughes J (1992)**

Stress-induced modulation of the immune response to recombinant hepatitis B vaccine  
*Psychosom Med*, 54, 22-29.

**Glaser R, Kiecolt-Glaser JK (2005)**

Stress-induced immune dysfunction: implications for health  
*Nat Rev Immunol*, 5, 243-251.

**Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG (2000)**

NKT cells: facts, functions and fallacies  
*Immunol Today*, 21, 573-583.

**Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L (2004)**

NKT cells: what's in a name?  
*Nat Rev Immunol*, 4, 231-237.

**Goebel MU, Trebst AE, Steiner J et al. (2002)**

Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in humans  
*FASEB J*, 16, 1869-1873.

**Groh V, Porcelli S, Fabbi M et al. (1989)**

Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system  
*J Exp Med*, 169, 1277-1294.

**Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T (1999)**

Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6879-6884.

**Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K et al. (2004)**

Recovery of Valpha24+ NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation  
*Bone Marrow Transplant*, 34, 595-602.

**Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A et al. (2005)**

Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity  
*J Immunol*, 175, 1320-1328.

**Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT (2006)**

Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage  
*Curr Opin Immunol*, 18, 349-356.

**Hayday AC (2000)**

[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection  
*Annu Rev Immunol*, 18, 975-1026.

**Herbert TB, Cohen S, Marsland AL et al. (1994)**

Cardiovascular reactivity and the course of immune response to an acute psychological stressor  
*Psychosom Med*, 56, 337-344.

**Herrmann M, Scholmerich J, Straub RH (2000)**

Stress and rheumatic diseases *Rheum Dis Clin North Am*, 26, 737-763.

**Hirai H (2004)**

Prostaglandin D2 in allergy: PGD2 has dual receptor systems  
*Nippon Yakurigaku Zasshi*, 123, 15-22.

**Hooghe R, Delhase M, Vergani P, Malur A, Hooghe-Peters EL (1993)**

Growth hormone and prolactin are paracrine growth and differentiation factors in the haemopoietic system *Immunol Today*, 14, 212-214.

**Isowa T, Ohira H, Murashima S (2006)**

Immune, endocrine and cardiovascular responses to controllable and uncontrollable acute stress  
*Biol Psychol*, 71, 202-213.

**Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M (2001)**

*Immunobiology* 5. ed., New York, NY: Garland Publ.

**Johannes B, Fischer F (1990)**

"Computer-Modelle der Belastung zur Untersuchung der Abhängigkeit der individuellen Stress-Reaktivität vom Belastungstyp.,"  
*XXIII. Tagung der STAg KMB INTERKOS-MOS*, Koshike, CSFR.

**Kabelitz D, Wesch D, He W (2007)**

Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology *Cancer Res*, 67, 5-8.

**Kabelitz D (2010)**

Human gammadelta T lymphocytes for immunotherapeutic strategies against cancer  
*F1000 Med Rep*, 2.

**Kawano T, Cui J, Koezuka Y et al. (1997)**

CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides  
*Science*, 278, 1626-1629.

**Kelso A (1995)**

Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today*, 16, 374-379.

**Khaksari M, Mahmoodi M, Rezvani ME, Sajjadi MA, Karam GA, Hajizadeh S (2005)**

Differences between male and female students in cardiovascular and endocrine responses to examination stress *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 17, 15-19.

**Kidd P (2003)**

Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease  
*Altern Med Rev*, 8, 223-246.

**Kiecolt-Glaser JK, Cacioppo JT, Malarkey WB, Glaser R (1992)**

Acute psychological stressors and short-term immune changes: what, why, for whom, and to what extent? *Psychosom Med*, 54, 680-685.

**Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R (1995)**

Slowing of wound healing by psychological stress *Lancet*, 346, 1194-1196.

**Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J (1996)**

Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3043-3047.

**King MR, Ismail AS, Davis LS, Karp DR (2006)**

Oxidative stress promotes polarization of human T cell differentiation toward a T helper 2 phenotype *J Immunol*, 176, 2765-2772.

**Koh YI, Shim JU (2010a)**

Association between Sputum Natural Killer T Cells and Eosinophilic Airway Inflammation in Human Asthma *Int Arch Allergy Immunol*, 153, 239-248.

**Koh YI, Shim JU, Wi JO et al. (2010b)**

Inverse association of peripheral blood CD4(+) invariant natural killer T cells with atopy in human asthma *Hum Immunol*, 71, 186-191.

**Landmann R (1992)**

Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations  
*Eur J Clin Invest*, 22 Suppl 1, 30-36.

**Larson MR, Ader R, Moynihan JA (2001)**

Heart rate, neuroendocrine, and immunological reactivity in response to an acute laboratory stressor *Psychosom Med*, 63, 493-501.

**Levine S, Ursin H (1991)**

"What is stress?" in *Stress, Neurobiology and Neuroendocrinology*  
eds. M. R. Brown, C. Rivier and G. Koob, Chicago: Rand McNally, pp. 1297-1343.

**Lewis RS, Nikolova A, Chang DJ, Weekes NY (2008)**

Examination stress and components of working memory *Stress*, 11, 108-114.

**Ma CS, Tangye SG, Deenick EK (2010)**

Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21 *Immunol Cell Biol*, 88, 621-623.

**Madden KS, Felten DL (1995)**

Experimental basis for neural-immune interactions *Physiol Rev*, 75, 77-106.

**Manuck SB, Kasprowicz AL, Monroe SM, al. e (1989)**

"Psychophysiologic reactivity as a dimension of individual differences" in *Handbook of research methods in cardiovascular behavioral medicine*  
ed. N. Schneiderman, New York [u.a.]: Plenum Press, pp. 366-382.

**Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M (1998)**

Mucosal wound healing is impaired by examination stress *Psychosom Med*, 60, 362-365.

**Mason JW (1971)**

A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory *J Psychiatr Res*, 8, 323-333.

**Matthews KA, Davis MC, Stoney CM, Owens JF, Caggiula AR (1991)**

Does the gender relevance of the stressor influence sex differences in psychophysiological responses? *Health Psychol*, 10, 112-120.

**Metelitsa LS (2004)**

Flow cytometry for natural killer T cells: multi-parameter methods for multifunctional cells *Clin Immunol*, 110, 267-276.

**Miller GE, Cohen S, Pressman S, Barkin A, Rabin BS, Treanor JJ (2004)**

Psychological stress and antibody response to influenza vaccination: when is the critical period for stress, and how does it get inside the body? *Psychosom Med*, 66, 215-223.

**Mohr DC, Hart SL, Julian L, Cox D, Pelletier D (2004)**

Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis *BMJ*, 328, 731.

**Montoro J, Mullol J, Jauregui I et al. (2009)**

Stress and allergy *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19 Suppl 1, 40-47.

**Montoya CJ, Pollard D, Martinson J et al. (2007)**

Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11 *Immunology*, 122, 1-14.

**Morag M, Morag A, Reichenberg A, Lerer B, Yirmiya R (1999)**

Psychological variables as predictors of rubella antibody titers and fatigue--a prospective, double blind study *J Psychiatr Res*, 33, 389-395.

**Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986)**

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins *J Immunol*, 136, 2348-2357.

**Mosmann TR, Coffman RL (1989)**

TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173.

**Nitsch JR (1981)**

*Stress : Theorien, Untersuchungen, Massnahmen*, eds. H. Allmer and J. R. Nitsch, Bern: Huber.

**Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP et al. (1991)**

Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4538-4542.

**Pincus-Knackstedt MK, Joachim RA, Blois SM et al. (2006)**

Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation *J Immunol*, 177, 8484-8492.

**Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP (1993)**

Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8-alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain *J Exp Med*, 178, 1-16.

**Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1995)**

*Kurzes Lehrbuch der Immunologie* 3. ed., Stuttgart ; New York: Thieme.

**Saito S, Tsuda H, Michimata T (2002)**

Prostaglandin D2 and reproduction *Am J Reprod Immunol*, 47, 295-302.

**Salio M, Cerundolo V (2009)**

Linking inflammation to natural killer T cell activation *PLoS Biol*, 7, e1000226.

**Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999)**

Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions *Nature*, 401, 708-712.

**Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A (2000)**

Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression *Curr Top Microbiol Immunol*, 251, 167-171.

**Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004)**

Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance *Annu Rev Immunol*, 22, 745-763.

**Sanders VM, Straub RH (2002)**

Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity *Brain Behav Immun*, 16, 290-332.

**Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000)**

How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions *Endocr Rev*, 21, 55-89.

**Schedlowski M, Wiechert D, Wagner TO, Tewes U (1992)**

Acute psychological stress increases plasma levels of cortisol, prolactin and TSH *Life Sci*, 50, 1201-1205.

**Schedlowski M, Falk A, Rohne A et al. (1993a)**

Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells *J Clin Immunol*, 13, 344-351.

**Schedlowski M, Jacobs R, Stratmann G et al. (1993b)**

Changes of natural killer cells during acute psychological stress *J Clin Immunol*, 13, 119-126.

**Schedlowski M (1994)**

*Stress, Hormone und zelluläre Immunfunktionen*, Heidelberg ; Berlin ; Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.

**Schedlowski M, Goebel MU, Tewes U, Schmoll HJ (2006)**

"Psychoneuroimmunologie" in *Kompendium Internistische Onkologie*  
eds. H.-J. Schmoll, K. Höffken and K. Possinger, Berlin ; Heidelberg: Springer Verlag, pp. 759-765.

**Schreier HM, Miller GE, Chen E (2011)**

Clinical potentials for measuring stress in youth with asthma  
*Immunol Allergy Clin North Am*, 31, 41-54.

**Schwenkmezger P, Hodapp V, Spielberger CD (1992)**

*Das State-Trait-Ärgerausdrucks-Inventar STAXI: Handbuch* 1. ed., Bern: Huber.

**Seegerstrom SC, Miller GE (2004)**

Psychological stress and the human immune system: A meta-analytic study of 30 years of inquiry *Psychological Bulletin*, 130, 601-630.

**Seiler W, Muller H, Hiemke C (1994)**

Interleukin-6 in plasma collected with an indwelling cannula reflects local, not systemic, concentrations *Clin Chem*, 40, 1778-1779.

**Selye H (1936)**

A syndrome produced by diverse noxious agents *Nature*, 138, 32.

**Selye H (1950)**

Stress and the general adaptation syndrome *Br Med J*, 1, 1383-1392.

**Seth S, Georgoudaki AM, Chambers BJ et al. (2009)**

Heterogeneous expression of the adhesion receptor CD226 on murine NK and T cells and its function in NK-mediated killing of immature dendritic cells *J Leukoc Biol*, 86, 91-101.

**Shibuya A, Campbell D, Hannum C et al. (1996)**

DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes *Immunity*, 4, 573-581.

**Shibuya K, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A (2006)**

Comment on "CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions" *J Immunol*, 176, 3855; author reply 3856.

**Shimizu N, Hori T, Nakane H (1994)**

An interleukin-1 beta-induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: an in vivo microdialysis study in conscious rats *Brain Behav Immun*, 8, 14-23.

**Smyth MJ, Godfrey DI (2000)**

NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword *Nat Immunol*, 1, 459-460.

**Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA (1998)**

CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells *J Exp Med*, 188, 1529-1534.

**Srivastava S, Boyer JL (2010)**

Psychological stress is associated with relapse in type 1 autoimmune hepatitis *Liver Int*, 30, 1439-1447.

**Steptoe A, Vogele C (1991)**

Methodology of mental stress testing in cardiovascular research *Circulation*, 83, II14-24.

**Sternberg EM (2001)**

Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease *J Endocrinol*, 169, 429-435.

**Sternberg EM (2006)**

Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens *Nat Rev Immunol*, 6, 318-328.

**Stevens-Felten SY, Bellinger DL (1997)**

Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs *Chem Immunol*, 69, 99-131.

**Stoney CM, Davis MC, Matthews KA (1987)**

Sex differences in physiological responses to stress and in coronary heart disease: a causal link? *Psychophysiology*, 24, 127-131.

**Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M (2005)**

How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum*, 52, 16-26.

**Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N et al. (2000)**

NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway *Nat Immunol*, 1, 515-520.

**Thomas SY, Hou R, Boyson JE et al. (2003)**

CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells *J Immunol*, 171, 2571-2580.

**Tikhonov I, Deetz CO, Paca R et al. (2006)**

Human Vgamma2Vdelta2 T cells contain cytoplasmic RANTES *Int Immunol*, 18, 1243-1251.

**Ulven T, Kostenis E (2006)**

Targeting the prostaglandin D2 receptors DP and CRTH2 for treatment of inflammation *Curr Top Med Chem*, 6, 1427-1444.

**Van Kaer L, Parekh VV, Wu L (2010)**

Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity *Cell Tissue Res*.

**Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J et al. (2008)**

Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset *Nat Immunol*, 9, 1341-1346.

**Viswanathan K, Dhabhar FS (2005)**

Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5808-5813.

**Wan YY (2010)**

Multi-tasking of helper T cells *Immunology*, 130, 166-171.

**Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM (2006)**

Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties *Immunity*, 24, 677-688.

**Weekes N, Lewis R, Patel F, Garrison-Jakel J, Berger DE, Lupien SJ (2006)**

Examination stress as an ecological inducer of cortisol and psychological responses to stress in undergraduate students *Stress*, 9, 199-206.

**Weigent DA, Blalock JE (1997)**

Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system *Chem Immunol*, 69, 1-30.

**Weinreich MA, Hogquist KA (2008)**

Thymic emigration: when and how T cells leave home *J Immunol*, 181, 2265-2270.

**Wilson MT, Singh AK, Van Kaer L (2002)**

Immunotherapy with ligands of natural killer T cells *Trends Mol Med*, 8, 225-231.

**Wright CE, Erbllich J, Valdimarsdottir HB, Bovbjerg DH (2007)**

Poor sleep the night before an experimental stressor predicts reduced NK cell mobilization and slowed recovery in healthy women *Brain Behav Immun*, 21, 358-363.



**Wright RJ (2005)**

Stress and atopic disorders *J Allergy Clin Immunol*, 116, 1301-1306.

**Wrona D (2006)**

Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems *J Neuroimmunol*, 172, 38-58.

**Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L (2009)**

Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities *Tissue Antigens*, 73, 535-545.

**Xiang L, Marshall GD, Jr. (2011)**

Immunomodulatory effects of in vitro stress hormones on FoxP3, Th1/Th2 cytokine and costimulatory molecule mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells *Neuroimmunomodulation*, 18, 1-10.

**Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P et al. (2007)**

Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity *Nat Genet*, 39, 329-337.

## **Lebenslauf**

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

## **Danksagung**

Mein primärer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H.-C. Deter für die vertrauensvolle Überlassung des Themas und der Räumlichkeiten sowie die Unterstützung durch sein gesamtes Team, insbesondere Frau Girresch und Dr. psych. M. Rudat während der praktischen Versuchszeit.

Zudem möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. med. D. Atanackovic und seinem Team aus Hamburg bedanken. Er hat mir allzeit optimistisch, unkompliziert und mit all seinem Wissen bei der Fertigstellung des Skripts beratend zur Seite gestanden.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeitern des DRFZ bedanken, die mich in die Labortechnik eingeführt und jederzeit hilfsbereit unterstützt haben und danke meiner Kollegin Dr. med. E. Freier für die gute Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung der Studie.

Last but not least danke ich von Herzen meinem Lebenspartner J. Weder sowie meinen Eltern für ihre Geduld und liebevolle Unterstützung.

**Erklärung**

„Ich, Ulrike Nowotne, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:  
„Auswirkungen von kurzzeitigem psychischem Laborstress auf die Verteilung unkonventioneller  
T-Zellsubpopulationen im peripheren Blut“ selbst, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst  
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Sie stellt auch in  
Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. „

Datum

Unterschrift