

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Subtypisierung der mononukleären Zellen des peripheren
Blutes bei Medizinstudentinnen im Hammerexamen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carla Luise Grünenwald

aus München

Datum der Promotion: 04.06.2021

Für meine Eltern und meine Schwestern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
ABSTRAKT	XI
ABSTRACT	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem – Ein Zusammenspiel unterschiedlicher Zellpopulationen.....	1
1.1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem unterscheiden sich in ihren Abwehrsystemen	1
1.1.2 Die Mediation der Immunantwort findet durch Zyto- und Chemokine sowie über Zell-Zell- Kontakte und Cluster of Differentiation statt	3
1.1.3 Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes	4
(a) Die T-Lymphozyten und deren Selektion im Thymus	4
(b) Zytotoxische T-Lymphozyten lösen die Apoptose der Zielzelle aus.....	5
(c) T-Helferzellen Typ 1 und Typ 17 wirken proinflammatorisch, T Helferzellen Typ 2 antiinflammatorisch	5
(d) Regulatorische T-Lymphozyten wirkend hemmend auf die Immunantwort	7
(e) B-Lymphozyten produzieren Antikörper	9
(f) Natürliche Killerzellen lösen die Apoptose in Zielzellen aus.....	10
(g) Monozyten betreiben Phagozytose und sezernieren das proinflammatorische Zytokin TNF- α	10
(h) Dendritische Zellen präsentieren Antigene	12
1.2 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor alpha-7 regelt die Immunantwort herab	13
1.3 Stress, seine Formen und hormonellen Komponenten.....	14
1.4 Effekte von Stress auf das Immunsystem: Studienlage.....	15
2 FRAGESTELLUNG.....	17
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Geräte.....	19
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3 Antikörper, Isotypkontrollen, Beads.....	21
3.1.4 Lösungen zur Zellstimulation, Proteaseinhibitor	23
3.1.5 Nährmedien und Puffer	23

3.1.6	Mischungen	24
3.2	Methoden.....	25
3.2.1	Studiendesign	25
3.2.2	Ein- und Ausschlusskriterien	25
3.2.3	Teilnehmercharakteristika und Ausschlussgründe der primär eingeschlossenen Studienteilnehmerinnen	26
3.2.4	Probenentnahme und PBMC Zellisolation.....	28
3.2.5	Durchflusszytometrie: Prinzip, Messung und Auswertung	30
3.2.6	Auftauprotokoll.....	33
3.2.7	Oberflächenfärbung und Kompensationsmessung.....	33
	(a) Zytokinfärbung	34
	(b) FoxP3-Färbung	36
	(c) Immunstatus	38
	(d) DC-Färbung	39
3.2.8	Statistische Auswertung mit Sensitivitätsanalyse	41
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Detektion proinflammatorischer Immunzellen und deren Zytokine unter Stress bei Medizinstudentinnen	45
4.1.1	Gesamtzahl der Monozyten, deren proinflammatorischen Untergruppen und das zugehörige Zytokin TNF- α unter Examensstress	45
4.1.2	Entwicklung der Natürlichen Killerzellen über die Zeit	50
4.1.3	T-Lymphozyten unter Examensstress und die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL- 17 und TNF- α auf T-Lymphozyten und lebenden Zellen	51
4.1.4	Entwicklung der zytotoxischen T-Lymphozyten unter Examensstress.....	55
4.1.5	Detektion der T-Helferzellen mit deren Unterformen Typ 1 und Typ 17 sowie deren zugeordnete proinflammatorische Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α	56
4.2	Nachweis antiinflammatorischer Immunzellen und deren Zytokine unter Stress bei Medizinstudentinnen	63
4.2.1	Entwicklung der nicht-klassischen Monozyten über die Zeit.....	63
4.2.2	Verlauf der T-Helferzellen Typ 2 und des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-4 auf T-Lymphozyten und lebenden Zellen	64
4.2.3	Die aktivierten und deaktivierten regulatorischen T-Lymphozyten.....	67
	(a) Naive regulatorische T-Lymphozyten	69
	(b) Regulatorische Memory T-Lymphozyten	72
4.3	Die B-Lymphozyten unter Examensstress.....	75
4.4	Ergebnisse der dendritischen Zellen	76
4.4.1	Plasmazytoide dendritische Zellen, inaktiv und aktiviert	76
4.4.2	Myeloide dendritische Zellen Typ 1, inaktiv und aktiviert	79
4.4.3	Myeloide dendritische Zellen Typ 2, inaktiv und aktiviert	82
4.5	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) auf pro- und antiinflammatorischen Zellen.....	85
4.5.1	nAChR $\alpha 7$ auf proinflammatorischen Zellen der angeborenen Immunität.....	85

4.5.2	nAChR $\alpha 7$ auf Zellen der adaptiven Immunität.....	87
5	DISKUSSION.....	90
5.1	Kernergebnisse und Hintergrund der Studie	90
5.2	Die proinflammatorischen Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität unter Examensstress	95
5.2.1	Entwicklung der Monozyten und des TNF- α auf Monozyten unter Examensstress.....	95
5.2.2	Die Natürlichen Killerzellen unter Stress	96
5.2.3	Die T-Lymphozyten in der Gesamtzahl und deren zugehörige proinflammatorischen Zytokine	97
5.2.4	Die zytotoxischen T-Lymphozyten unter Examensstress	97
5.2.5	Die T-Helferzellen Typ 1 und Typ 17 sowie deren zugeordnete Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α unter Examensstress	98
5.3	Die antiinflammatorischen Zellen und Zytokine der angeborenen und erworbenen Immunität	100
5.3.1	Die nicht-klassischen Monozyten	100
5.3.2	Die T-Helferzellen Typ 2 und das antiinflammatorische Zytokin IL-4	100
5.3.3	Die naiven und Memory T-regulatorischen Lymphozyten und der intrazelluläre FoxP3- Transkriptionsfaktor	101
5.4	Aktivierte und nicht-aktivierte plasmazytoide und myeloide Dendritische Zellen Typ 1 und 2	102
5.5	Verlauf der B-Lymphozyten unter Examensstress.....	103
5.6	Der nikotinische Acetylcholinrezeptor alpha-7 auf T- und B-Lymphozyten, T-Helferzellen, NK-Zellen und Monozyten.....	104
5.7	Einschränkung der Studie	105
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick	106
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
	LITERATURVERZEICHNIS	XV
	ERGEBNISSE IN TABELLENFORM.....	XXIII
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XXIX
	LEBENS LAUF	XXX
	DANKSAGUNG.....	XXXI

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Für die Zellisolation verwendete Geräte.....	19
Tabelle 2: Für die Durchflusszytometrie verwendete Geräte	20
Tabelle 3: Für die Zellisolation, Auftauprozesse und Färbungen verwendete Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 4: Antikörper, Isotypkontrollen und Beads zur Ausführung der Oberflächenfärbungen	22
Tabelle 5: Zellstimulantien und Proteaseinhibitoren, die für die Durchführung der intrazellulären Zytokinfärbung benötigt wurden	23
Tabelle 6: Nährmedien und Puffer für die Durchflusszytometrie.....	24
Tabelle 7: Für die Oberflächenfärbungen hergestellten Mischungen	25
Tabelle 8: Ausschlussgründe primär eingeschlossener Studienteilnehmerinnen	28
Tabelle 9: Anzahl der Teilnehmerinnen n nach Ausschluss	28
Tabelle 10: Das für die Durchflusszytometrie verwendete Panel.....	32
Tabelle 11: Die in der Zytokinfärbung durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen	35
Tabelle 12: Die in der FoxP3-Färbung durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen	37
Tabelle 13: Die im Immunstatus durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen.....	38
Tabelle 14 Die in der DC-Färbung durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen	40
Tabelle 15: Übersicht der Entwicklung der einzelnen Zellpopulationen im Verlauf	93
Tabelle 16: Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) sowie Median der jeweiligen Zellpopulation bzw Rezeptoren auf Zellen in % zum jeweiligen Messzeitpunkt.	XXVII
Tabelle 17: P-Werte der jeweiligen Zellpopulation. Es wurde die unterschiedliche Entwicklung der Stress- im Vergleich zur Kontrollgruppe über den Gesamtzeitraum der Studie in Hinblick auf ihre Signifikanz untersucht.....	XXVIII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Das angeborene und das adaptive Immunsystem..... 3

Abbildung 2: Beispiel eines Dotplots..... 31

Abbildung 3: Gesamtzahl der Monozyten (CD14+CD16+) in % zu den jeweiligen Terminen 45

Abbildung 4: klassische Monozyten (CD14++CD16-) in % zu den jeweiligen Terminen..... 46

Abbildung 5: Intermediäre Monozyten (CD14++CD16+) in % zu den jeweiligen Terminen 47

Abbildung 6: TNF- α positive Monozyten (CD14+TNF α +) in % zu den jeweiligen Terminen. 48

Abbildung 7: TNF- α positive lebende Zellen (TNF- α +) in % zu den jeweiligen Terminen 49

Abbildung 8: Natürliche Killerzellen (CD16+CD56+) in % zu den jeweiligen Terminen 50

Abbildung 9: Gesamtzahl der T-Lymphozyten (CD3+) in % zu den jeweiligen Terminen 51

Abbildung 10: IFN- γ positive T-Lymphozyten (CD3+IFN- γ +) in % zu den jeweiligen Terminen..... 52

Abbildung 11: Interleukin-17 positive T-Lymphozyten (CD3+IL-17+) in % zu den jeweiligen Terminen ... 53

Abbildung 12: TNF- α positive T-Lymphozyten (CD3+TNF- α +) in % zu den Terminen 54

Abbildung 13: Zytotoxische T-Lymphozyten (CD3+CD8+) in % zu den jeweiligen Terminen 55

Abbildung 14: Gesamtzahl der T-Helferzellen (CD3+CD4+) in % zu den jeweiligen Terminen 56

Abbildung 15: Aktivierte T-Helferzellen (CD3+CD4+CD25+) in % zu den jeweiligen Terminen..... 57

Abbildung 16: T-Helferzellen Typ 1 (CD3+CD4+IFN- γ +) in %..... 58

Abbildung 17: Die Mittelwerte mit Standardabweichung der IFN- γ positiven Zellen (IFN- γ +) in % 59

Abbildung 18: T-Helferzellen Typ 17 (CD3+CD4+IL-17+) in % 60

Abbildung 19: IL-17 positive Zellen (IL-17+) in % zu den jeweiligen Terminen 61

Abbildung 20: TNF- α positive T-Helferzellen (CD3+CD4+TNF- α +) in % zu den jeweiligen Terminen..... 62

Abbildung 21: Nicht-klassische Monozyten (CD14+CD16++) in % zu den Terminen 1, 2 und 3 63

Abbildung 22: T-Helferzellen Typ 2 (CD3+CD4+IL-4+) in % zu den Terminen 64

Abbildung 23: IL-4 positive Zellen (IL-4+) in % zu den Terminen 65

Abbildung 24: IL-4 positive T-Lymphozyten (CD3+IL-4+) in % zu den Terminen..... 66

Abbildung 25: Regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+CD127low) in % zu den jeweiligen Terminen..... 67

Abbildung 26: FoxP3 positive regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) in % zu den drei Zeitpunkten..... 68

Abbildung 27: CCR4 negative naive regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+CD127lowCCR4-) in % zu den jeweiligen Terminen..... 69

Abbildung 28: CD45RA positive naive regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+CD127lowCD45RA+) in % zu den jeweiligen Terminen 70

Abbildung 29: CD45RA positive CCR4 negative naive T-regulatorische Zellen (CD3+CD4+CD45RA+CCR4-) in % zu den jeweiligen Terminen 71

Abbildung 30: CCR4 positive T-regulatorische Memory-Zellen (CD3+CD4+CD25+CD127lowCCR4+) in % zu den jeweiligen Terminen..... 72

Abbildung 31: CD45RA negative T-regulatorische Memory-Zellen (CD3+CD4+CD25+CD127lowCD45RA-) in % zu den jeweiligen Terminen 73

Abbildung 32: CD45RA negative CCR4 positive T-regulatorische Memory-Zellen (CD3+CD4+CD45RA+CCR4+) in % zu den jeweiligen Terminen 74

Abbildung 33: B-Lymphozyten (CD19+) in % zu den jeweiligen Terminen..... 75

Abbildung 34: Plasmazytoide dendritische Zellen (CD304+CD11c low) in % zu den jeweiligen Terminen 76

Abbildung 35: Inaktive plasmazytoide dendritische Zellen (CD304+CD1c lowCD86-) in % zu den jeweiligen Terminen..... 77

Abbildung 36: Aktivierte plasmazytoide dendritische Zellen (CD304+CD1c lowCD86+) in % zu den jeweiligen Terminen..... 78

Abbildung 37: Myeloide dendritische Zellen Typ 1 in % zu den jeweiligen Terminen 79

Abbildung 38: Inaktive myeloide dendritische Zellen Typ 1 (CD1c+CD11c+CD86-) in % zu den jeweiligen Terminen..... 80

Abbildung 39: Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 1 (CD1c+CD11c+CD86+) in % zu den jeweiligen Terminen..... 81

Abbildung 40: Myeloide dendritischen Zellen Typ 2 (CD141+CD11c+) in % zu den jeweiligen Terminen 82

Abbildung 41: Inaktive myeloide dendritische Zellen Typ 2 (CD141+CD11c+CD86-) in % zu den jeweiligen Terminen..... 83

Abbildung 42: Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 2 (CD141+CD11c+CD86+) in % zu den jeweiligen Terminen.....	84
Abbildung 43: nAChR α 7 auf Monozyten in % zu den jeweiligen Terminen	85
Abbildung 44: nAChR α 7 auf NK-Zellen (CD16+CD56+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen	86
Abbildung 45: nAChR α 7 auf T-Lymphozyten (CD3+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen	87
Abbildung 46: nAChR α 7 auf T-Helferzellen (CD4+CD3+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen ...	88
Abbildung 47: nAChR α 7 auf B-Lymphozyten (CD19+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen.....	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ach	Acetylcholin
ANOVA	engl. <i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
APC	engl. <i>Antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
BCR	engl. <i>B cell receptor</i> , B-Zell Rezeptor
CAP	engl. <i>cholinergic anti-inflammatory pathway</i> , cholinerges, antiinflammatorisches Weg
CCR4	Chemokinrezeptor Typ 4
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CTL	engl. <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> , Zytotoxische T-Lymphozyten oder: Zytotoxische T-Zellen
CU(M)S	engl. <i>Chronic unpredictable (mild) stress</i> , chronischer, unberechenbarer (milder) Stress
DC	engl. <i>Dendritic cell</i> , Dendritische Zelle(n)
GLM	engl. <i>General Linear Model</i> , allgemeines lineares Modell der Statistik
IL	Interleukin
IS	Immunstatus
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
IPEX	engl. <i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrome</i> , IPEX-Syndrom
FACS	engl. <i>Fluorescence-activated Cell Sorter</i> , Durchflusszytometer
FSC	engl. <i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
LMM	engl. <i>Linear Mixed Model</i> , gemischtes Modell der Statistik
mDC	myeloide dendritische Zelle

mDC1/mDC2	myeloide dendritische Zelle Typ 1/Typ 2
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
nAChR α 7	nikotinischer Acetylcholinrezeptor alpha-7
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	engl. <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PMA	Phorbol-myristat-Acetat
PNS	Parasympathisches Nervensystem
REML	engl. <i>restricted maximum likelihood</i>
R-SDS	engl. <i>Repeated social defeat stress</i> , chronischer sozialer Stress im Mausmodell
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SNS	Sympathisches Nervensystem
SSC	engl. <i>Side Scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TCR	engl. <i>T cell receptor</i> , T-Zell Rezeptor
TGF- β	engl. <i>Transforming growth factor beta</i> , Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	T-regulatorische Zelle(n) bzw. regulatorische T-Helferzelle(n) bzw. Regulatorische(r) T-Lymphozyt(en)
TSST	Engl. <i>Trier social stress test</i> , Trier Sozial Stress Test
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells

ABSTRAKT

Einleitung: Seit den 80er Jahren werden die Veränderungen von Zellgruppen unter Stress erforscht. Chronischer Stress ruft eine Immunsuppression hervor, wohingegen akuter Stress eine immunologische Dysregulation verursacht. Bis zum heutigen Tag wurde eine Vielzahl von Zellen entdeckt, die in das Konzert der Immunreaktion mit einstimmen und dieses maßgeblich beeinflussen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob der erwähnte Grundsatz der Stressreaktion auch auf die kombinierte akute und chronische Stressreaktion unter der Belastung eines sogenannten medizinischen „Hammerexamens“ übertragbar ist. Es wurde untersucht, ob es unter Stress zu einer Suppression der proinflammatorischen und Proliferation der antiinflammatorischen Zellen und deren Subtypen, Zytokinen und des zugehörigen Acetylcholinrezeptors kommt.

Methodik: Für die vorliegende retrospektive Fall-Kontroll-Studie wurden 37 Medizinstudentinnen der Universitätsklinik Charité Berlin unter dem Stress einer Examensprüfung über insgesamt 24 Wochen untersucht. Die Messzeitpunkte fanden 12 Wochen vor der Prüfung, also in einer Phase chronischen Stresses, unmittelbar nach der Prüfung, folglich unter akutem Stress, und 12 Wochen nach der Prüfung, demnach während der Erholungsphase, statt. Die Zellzahlen wurden mithilfe der Durchflusszytometrie nach Oberflächenfärbung bestimmt.

Ergebnisse: Eine Unterdrückung der proinflammatorischen, zellulären Immunantwort zeigte sich an dem signifikanten Abfall der CD3-positiven T-Lymphozyten, zytotoxischen T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen. Auch die Gesamtzahl der T-Helferzellen wurde supprimiert, ohne dass es zu einer signifikanten Verschiebung der Th1- und Th2-Zellen kam. Die proinflammatorischen Th17-Zellen hingegen vollzogen einen signifikanten Anstieg unter der kombinierten Stressbelastung, parallel zu den klassischen, ebenfalls proinflammatorischen Monozyten, die unter anderem für die Aktivierung dieser Zellgruppe zuständig sind.

Die antiinflammatorischen T-regulatorischen Zellen zeigten eine vermehrte Aktivität unter Stress, ohne dass sie proliferierten. Der antiinflammatorische Acetylcholinrezeptor alpha-7 wurde auf B-Lymphozyten in der Erholungsphase vermindert nachgewiesen.

Schlussfolgerung: Die proinflammatorischen T-Helferzellen Typ 17 scheinen eine maßgebliche Rolle in der Immunantwort unter kombinierten akutem und chronischem Stress zu spielen, da diese im Gegensatz zu den wichtigsten proinflammatorischen Vertretern der adaptiven Immunität unter der Stressbelastung proliferieren. Dies geschieht analog zu den proinflammatorischen, klassischen Monozyten, die an deren Aktivierung beteiligt sind. Die Aktivierung der T-regulatorischen Zellen unter Stress scheint nicht hinreichend zur Suppression der Th17-Zellen zu genügen, sodass diese Dynamik weitreichende Folgen tragen könnte. Die Auswirkungen dieser Th17/Treg-Dysbalance sollte hinsichtlich der Entwicklung einer depressiven Episode oder Autoimmunerkrankung unter Stress in weiterführenden Studien untersucht werden.

Die in dieser Studie nachgewiesene, verminderte Expression des antiinflammatorisch wirksamen Acetylcholinrezeptors alpha-7 auf B-Lymphozyten in der Erholungsphase könnte eine Antikörperproduktion im Anschluss an eine Stressreaktion begünstigen. Somit übernimmt der Rezeptor die Rolle eines Mediators in der humoralen Immunreaktion unter Stress.

ABSTRACT

Background: Since the 80's changes of cell groups under stress have been investigated. Under chronic stress immunosuppression occurs, while acute stress causes immunological dysregulation. Our work specified whether the mentioned principle can also be transferred to the combined acute and chronic stress reaction caused by the German final exam in medical studies. This study investigated if there was evidence of a suppression of the proinflammatory and the proliferation of antiinflammatory cells and their subtypes, cytokines and the associated acetylcholine receptor.

Methods: The retrospective case-control study investigated a total of 37 female medical students of the University Hospital Charité Berlin undergoing their final exam. Time measurements were carried out 12 weeks before the exam, hence in a phase of chronic stress, immediately after the exam, at a time of acute stress, and 12 weeks after the exam, i.e. during the recovery phase. The cells were detected using flow cytometry.

Results: Suppression of the proinflammatory cellular immune response was demonstrated by the significant decrease in CD3-positive T lymphocytes, cytotoxic T cells and natural killer cells. The total number of T-helper cells was suppressed without showing a significant shift of Th1 and Th2 cells. The proinflammatory Th17 cells, however, performed a significant increase under the combined stress load. The same trend was registered investigating the classical, also proinflammatory, monocytes, that are activators of the Th17 cells. Regarding the antiinflammatory cell-response, the T-regulatory cells showed increased activity under stress without proliferation. The acetylcholine receptor alpha-7 was found to be reduced on B lymphocytes in the recovery phase.

Conclusion: The proinflammatory T-helper cells type 17 seemingly play a role in the immune response under combined acute and chronic stress by proliferating unlike the other investigated proinflammatory cell groups of adaptive immunity. This finding shows an analogy to the development of the proinflammatory classical monocytes that are involved in their activation. The activation of the T-regulatory cells under stress seems to be insufficient to suppress the Th17 cells, which means that this dynamic could have far-reaching consequences. The impact of this Th17/Treg imbalance should be

investigated in further studies with regards to the development of a depressive episode or autoimmune disease under stress. The suppression of the anti-inflammatory acetylcholine receptor alpha-7 could trigger antibody production by the B lymphocytes in the recovery phase after the combined stress reaction. Thus, the receptor plays the pivotal role of a mediator in the humoral immune response under stress.

1 EINLEITUNG

Das Immunsystem ist eines der komplexesten Geflechte des menschlichen Körpers. Orchestriert wird es durch Zellen, Moleküle und unterschiedliche Organe, die mithilfe von Mediatoren wie Zyto- und Chemokine sowie Rezeptoren und Zell-Zell-Kommunikation miteinander in Kontakt stehen und dadurch schnell und effektiv gemeinsam gegen Krankheitserreger kämpfen oder körpereigene Funktionen übernehmen können. Die Komplexität des Systems ist nicht zuletzt nach Entdeckung von immer mehr Zellgruppen zuweilen schwer zu erfassen. Im Folgenden soll eine Zusammenschau der untersuchten Zellgruppen den Überblick erleichtern.

1.1 Das Immunsystem – Ein Zusammenspiel unterschiedlicher Zellpopulationen

1.1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem unterscheiden sich in ihren Abwehrsystemen

Der Körper besitzt zwei unterschiedliche Abwehrmechanismen, das angeborene und das adaptive Immunsystem, deren Aufgabe es ist, den Organismus vor Angriffen von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen zu schützen. Darüber hinaus ist es in der Lage, pathologisch veränderte, gealterte oder apoptotische körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren, sowie Entzündungs- und Heilungsprozesse zu steuern (1).

Das angeborene Immunsystem bildet die unspezifische, nicht auf bestimmte Erreger spezialisierte, Abwehr gegen Krankheitserreger. Mitunter wird die mechanische Barriere der Haut und Schleimhaut des Körpers dazugezählt, jedoch auch humorale Bestandteile wie Plasmaproteine, Komplementbausteine und Zytokine. Als wichtigster Bestandteil werden zelluläre Komponenten, die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, engl.: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) wie Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen durch das Eindringen von Krankheitserregern aktiviert. Diese Zellen können körperfremde von körpereigenen Strukturen unterscheiden indem sie unspezifische, pathogen-assoziierte molekulare

Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen, sogenannte PAMP (engl. *pathogen associated molecular patterns*), bei Bakterien sind dies beispielsweise Lipopolysaccharide, erkennen. Eine direkte Bekämpfung des Erregers ist durch jeweils zellspezifische Abwehr-, Zerstörungs- und Entzündungsmechanismen schon innerhalb von Sekunden bis Minuten möglich.

Erst Tage später wird durch die Aktivierung der spezifischen Immunzellen – das adaptive Immunsystem – in Gang gebracht. Dieses hat nun die Möglichkeit, spezifisch und somit besonders effektiv auf die Krankheitserreger zu reagieren. Die T-Zellen bilden hierbei den zellvermittelten Teil der Immunantwort, die B-Zellen hingegen den humoralen Anteil, indem sie nach Aktivierung Antikörper produzieren. Diese passen zum Krankheitserreger wie ein Schlüssel zum Schloss und können ihn somit schnell und wirkungsvoll eliminieren. Durch die Bildung von sogenannten Gedächtniszellen stehen beim nächsten Erregerkontakt umgehend große Mengen an spezialisierten Antikörpern bereit, die eine sofortige Immunantwort möglich machen (2).

Die folgende Darstellung (Abbildung 1) zeigt vereinfacht die Differenzierung in die unterschiedlichen PBMCs, ausgehend von der pluripotenten Stammzelle. Die Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems sind in grün, die des adaptiven Immunsystems in blau dargestellt. Die natürliche Killerzelle als wichtiger Vermittler übernimmt Funktionen beider Systeme.

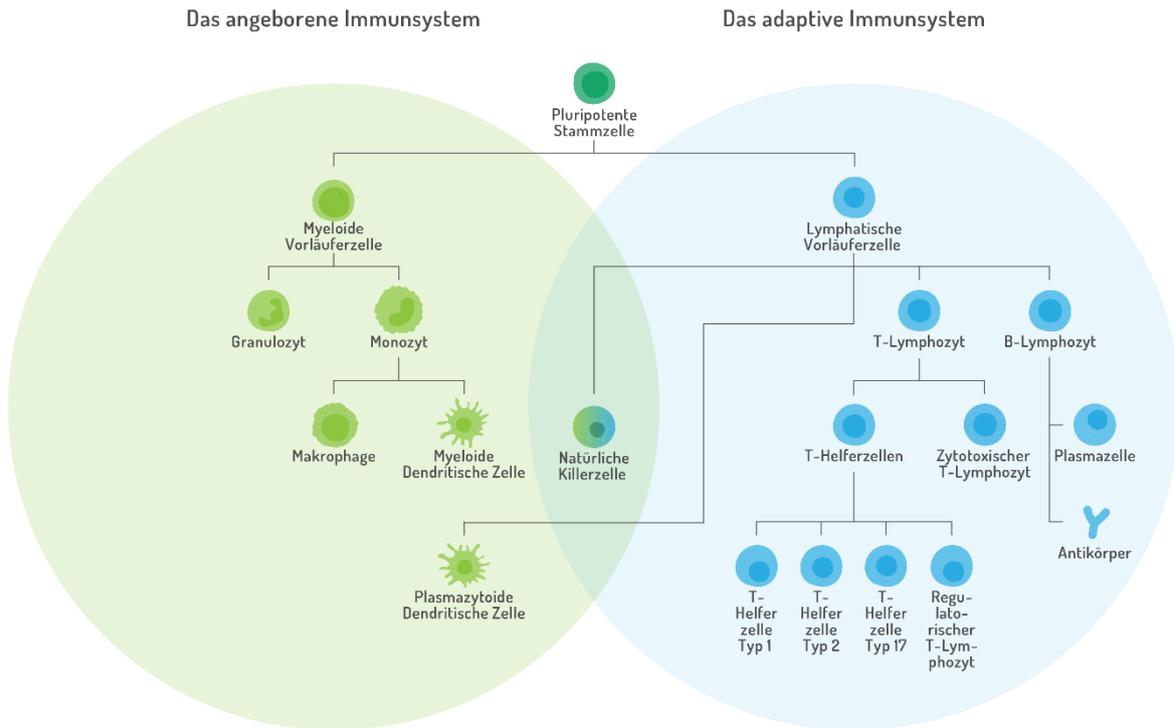


Abbildung 1: Das angeborene und das adaptive Immunsystem.

1.1.2 Die Mediation der Immunantwort findet durch Zyto- und Chemokine sowie über Zell-Zell-Kontakte und Cluster of Differentiation statt

Das angeborene und adaptive Immunsystem steht in einem gesunden Organismus in einem fein abgestimmten Gleichgewicht. Die einzelnen Komponenten treten durch zahlreiche Signal- und Aktivierungsmechanismen in Kontakt, die größtenteils durch Zytokine vermittelt werden. Zytokine sind kleine Peptide, die von immunwirksamen Zellen sezerniert werden und die Proliferation und Aktivität von anderen Zellen beeinflussen können. Zu ihnen gehören Interleukine (IL) und Interferone (IFN), die meist zur Kommunikation der Zellen untereinander dienen, Tumornekrosefaktoren (TNF), Wachstumsfaktoren und zuletzt Chemokine, die Zellpopulationen chemotaktisch an den Ort der Entzündung locken sollen.

Proinflammatorische Zytokine, also immunwirksame Botenstoffe, die Entzündungsvorgänge hervorrufen oder verstärken können, sind vornehmlich IL-1, IL-6 und TNF- α sowie IFN- γ . Sie werden hauptsächlich von T-Helferzellen und Monozyten

sezerniert und entfalten ihre Wirksamkeit über Aktivierung und Differenzierung der Zielzelle oder regen diese zur Proliferation und Sekretion weiterer Zytokine an.

IL-4, IL-10 und TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor beta, engl. *Transforming growth factor β*) fungieren hauptsächlich als antiinflammatorische Zytokine, indem sie in der Zielzelle beispielsweise die Zytokinproduktion hemmen oder die Phagozytose fördern (3).

Auch direkter Zell-Zell-Kontakt kann eine Immunantwort auslösen. So treten beispielsweise B-Zellen, Makrophagen und – als wichtigster Vertreter – dendritische Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC, engl. *Antigen-presenting cell*) auf, die Antigene erst durch Phagozytose aufnehmen und dann auf ihrer Oberfläche mitsamt dem Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II, (MHC-II, engl. *Major Histocompatibility Complex II*) präsentieren. Der T-Zell-Rezeptor (TCR, engl. *T cell receptor*) auf T-Lymphozyten erkennt und bindet daraufhin die auf diese Art präsentierten Antigene, wodurch die T-Lymphozyten aktiviert werden und weitere Zytokine bilden. Diese Zytokine wiederum stimulieren die B-Lymphozyten, die proliferieren und in der Folge Antikörper produzieren (4).

Weitere wichtige Oberflächenmoleküle, die maßgeblich an der interzellulären Kommunikation beteiligt sind, heißen CD (engl. *Cluster of Differentiation*, sog. „Unterscheidungsgruppen“) und sind membrangebundene Glykoproteine und -lipide, die hauptsächlich Rezeptor- oder Signalfunktionen einnehmen. Diese können in der Forschung genutzt werden, indem die für einzelne Zellgruppen spezifischen CD-Proteine mithilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert, und die Zellen somit eindeutig identifiziert werden können (5).

1.1.3 Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes

(a) Die T-Lymphozyten und deren Selektion im Thymus

Eine der wichtigsten Zellpopulationen des adaptiven, zellulären Immunsystems sind T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, deren Name durch deren Reifungsort, dem Thymus, geprägt ist. Sie machen zwischen 44-75 % der PBMCs des menschlichen Blutes aus und tragen das CD3-Antigen auf ihrer Oberfläche (6). T-Lymphozyten

entstehen aus haematopoetischen Stammzellen im Knochenmark und reifen in einem Vorgang der positiven und negativen Selektion im Thymus aus. Sie sind dann fähig, von APC präsentierte, an MHC-Rezeptoren gebundene, körperfremde Antigene mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors zu erkennen (7). Bei der Selektion entscheidet sich, welchen Weg der T Lymphozyt einschlagen wird. Bindet eine dieser Zellen mittels Korezeptor CD4 an das auf MHC-II präsentierte Antigen, entwickelt sich der Lymphozyt zur T-Helferzelle, die von nun an das CD3 und CD4-Antigen tragen. Ist der Korezeptor jedoch CD8 und die APC präsentiert mithilfe von MHC-I, entsteht eine zytotoxische T-Zelle. Im Anschluss an die Selektion siedeln sich die T-Lymphozyten in den sogenannten sekundären lymphatischen Organen, also Lymphknoten und Milz, an (1).

(b) Zytotoxische T-Lymphozyten lösen die Apoptose der Zielzelle aus

Die in Folge des Vorganges der Ausdifferenzierung im Thymus den Korezeptor CD8 tragenden zytotoxischen T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T Lymphocytes*) erkennen nun Pathogene auf der Oberfläche der Zielzellen und leiten bei diesen unmittelbar die Apoptose ein. Dies passiert entweder durch direkten Zell-Zell-Kontakt durch die Freisetzung von zytotoxischen Proteinen wie Perforin und Granzyme oder mithilfe von mediatorisch wirksamen, proinflammatorischen Zytokinen, TNF- α und IFN- γ . Dabei induziert TNF- α die Apoptose in der Zielzelle durch eine Caspase während IFN- γ den verstärkten Aufbau von MHC-Klasse-I Molekülen auf allen Zellen fördert, um eine vermehrte Antigenpräsentation der Zellen zu ermöglichen (8). Im Zusammenspiel mit den antigenpräsentierenden dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen können sie sogar Tumorzellen eliminieren. Diese Eigenschaft wird im Sinne einer antitumoralen Immuntherapie bereits erfolgreich therapeutisch nutzbar gemacht (9).

(c) T-Helferzellen Typ 1 und Typ 17 wirken proinflammatorisch, T Helferzellen Typ 2 antiinflammatorisch

Die Differenzierung der CD4+ Zellen erfolgt durch die Konfrontation mit unterschiedlichen Zytokinen, die von dendritischen Zellen und anderen APC sezerniert werden. So induziert IL-12 die Entstehung von T-Helferzellen Typ 1, auch **Th1-Zellen** genannt, die von da an proinflammatorische Zytokine, hauptsächlich IFN- γ , IL-2 und TNF- α , produzieren und zuständig sind für die zelluläre Abwehr von intrazellulären

Mikroorganismen (10). **Interferon-gamma** (IFN- γ) ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin und wird hauptsächlich von TH1-Zellen nach Kontakt mit Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen gebildet. Auch andere Zellgruppen sind in der Lage, IFN- γ zu bilden, mitunter sind das – wie weiter oben bereits erwähnt – zytotoxische T-Zellen aber auch dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen. IFN- γ stimuliert die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen, regt die APC zu einer vermehrten Antigenpräsentation durch gesteigerte Produktion von MHC-II-Molekülen an und steigert die MHC-I-Produktion in allen Körperzellen. Zudem kann es die Proliferation der TH2-Zellen hemmen (11). IL-2 stimuliert die T-Zellen und fördert die Entwicklung von zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen und die Antikörperbildung durch B-Zellen. TH1-Zellen können indirekt die Immunantwort regulieren, indem sie durch den Einfluss von IL-2 die T-regulatorischen Zellen (Treg) aktivieren (12).

Unter der Einwirkung des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 entsteht die Untergruppe der **Th2-Zellen**, die für die humorale Immunantwort verantwortlich sind und gegen extrazelluläre Pathogene vorgehen (13). Sie sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. **IL-4** stimuliert einerseits autokrin, das heisst innerhalb der Zelle, die Differenzierung der T-Helferzellen zu T-Helferzellen Typ 2 und bewirkt andererseits zusammen mit IL-5 als wichtigste Aufgabe den Antikörperklassenwechsel der B-Zellen von IgM zu IgG, IgE und IgA. Die Th2-Zellen wirken demnach als Gegenspieler zu den Th1-Zellen antiinflammatorisch, indem sie mittels IL-4 die Aktivierung der Makrophagen hemmen und durch IL-10 die IFN- γ -Produktion von TH1-Zellen und Makrophagen inhibieren (14).

Eine optimale Balance zwischen der Th1- und Th2-vermittelten Immunreaktion ist essentiell für einen gesunden Organismus. Eine überschießende proinflammatorische Zytokinproduktion kann zu akuten Entzündungsreaktionen im Körper mit Gewebeschädigung und Fieber bis hin zum Schock und Tod führen. Eine exzessive antiinflammatorische Immunantwort hingegen ist assoziiert mit atopischen Erkrankungen und Allergien (15).

Die Differenzierung der CD4+ Zellen zu **Th17-Zellen** erfolgt durch die Aktivierung eines ROR γ t Rezeptors im Zusammenspiel mit dem Zytokin TGF- β . Sie werden aktiviert durch Zellkontakte und Zytokinausschüttung von DCs und Makrophagen und reguliert durch die Zytokine der TH1- und TH2-Zellen. Th17-Zellen produzieren das

proinflammatorische Zytokin **IL-17**, locken so Neutrophile und Makrophagen an den Ort der Entzündung und bilden so einen wichtigen Vertreter in der Bekämpfung von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen. Sie haben, wie die verwandten Zellgruppen der TH-Zellen Typ 1 und 2, zudem die Fähigkeit, die B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion von IgM, IgG und IgA anzuregen. Bei Fehlregulationen dieser Zellgruppe kann es zu der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose kommen (16). Interessanterweise wurden erhöhte Th17 Spiegel im Mausmodell mit depressivem Verhalten in Verbindung gebracht, sodass diese Zellreihe in Zukunft Grundlage für eine Th17-gezielte antidepressive Therapie sein könnte (17).

(d) Regulatorische T-Lymphozyten wirkend hemmend auf die Immunantwort

Regulatorische T-Lymphozyten, auch als T-regulatorische Zellen oder Treg bezeichnet, differenzieren sich aus CD4-positiven T-Helferzellen unter dem Einfluss von TGF- β zu zwei Untergruppen. Die natürlichen T-regulatorischen Zellen (nTreg) entstehen im Thymus und die induzierbaren Treg (iTreg) in sekundären lymphatischen Organen und im peripheren Gewebe (18). Die Selektion der Zellen im Thymus geht nach dem „Goldlückchen-Prinzip“ vonstatten. Herrscht eine starke Affinität zum MHC-Komplex, geht die Zelle in die Apoptose. Hierbei spielt auch die Stärke der Bindung an den T-Zell-Rezeptor eine Rolle (19). Die Funktion beider Gruppen unterscheidet sich unwesentlich, wobei die iTregs eine größere Variabilität des TCR aufweisen (20). Sowohl nTreg als auch iTreg tragen den intrazellulär liegenden Transkriptionsfaktor **FoxP3** (engl. *Forkhead-Box-Protein P3*), der eine deutliche Unterscheidung zu den übrigen T-Lymphozyten erlaubt und durch vermehrte oder verminderte Expression Funktion und Differenzierung der Tregs steuert (21, 22).

Da eine Anfärbung des intrazellulären FoxP3 Proteins oft nur schwer gelingt, ist eine Identifizierung auch über die Kombination der Oberflächenmarker CD4, CD25 und die geringe Dichte des Interleukin-7-Rezeptors (CD127^{low}) möglich. Die Abgrenzung gelingt so zu den CD4⁺CD25⁺ T-Helferzellen, die nach Aktivierung durch IL-2 den Oberflächenmarker CD127 tragen und keine regulatorische Funktion innehaben (23).

T-regulatorische Zellen exprimieren inhibitorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β , die hemmend auf die DC-Differenzierung wirken, oder durch direkte Zell-Zell-Kontakte

Apoptose in T-Lymphozyten auslösen können, und somit durch unterschiedliche Mechanismen die Immunantwort modulieren (24). Die Tregs sind zudem in der Lage, die proinflammatorischen Th17-Zellen zu inhibieren. Die beiden Zellgruppen nutzen zwar interessanterweise den gleichen, über das Zytokin TGF- β vermittelten, Aktivierungsweg, sind jedoch Gegenspieler in der Immunantwort. Eine Dysbalance des Th17/Treg Verhältnisses ist ein entscheidender Faktor in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (25).

Ein Mangel an T-regulatorischen Zellen aufgrund einer Mutation des FoxP3-Faktors kann im Menschen eine schwere Autoimmunerkrankung, das IPEX-Syndrom (engl. *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrome*) auslösen. Somit wird den Tregs eine entscheidende Funktion in der Regulation der Entzündungsreaktion zugeschrieben, deren Wegfall mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses und der rheumatoiden Arthritis sowie der Entstehung von Krebserkrankungen assoziiert ist (26, 27).

Je nachdem, ob T-regulatorische Zellen schon Antigen-Kontakt hatten oder nicht, kann man sie in **naive T-regulatorische Zellen und Memory-T-regulatorische Zellen**, auch effector Tregs genannt, einteilen. Dabei sind die naiven Zellen dieser Klasse CD45RA positiv und CCR4 negativ, wobei die effector Tregs im Gegensatz dazu CD45RA negativ und CCR4 positiv sind.

Die naiven Tregs entsprechen einem ruhenden Stadium und können nach Aktivierung durch Proliferation und vermehrter Expression des FoxP3 Transkriptionsfaktors das Stadium der effector Tregs überführt werden. Ihre Zahl fällt mit dem Alter ab, wobei die Zahl der effector oder Memory Tregs gegenläufig dazu ansteigt (24). Naive Tregs sind demnach durch die Oberflächenmarker CD45RA⁺FoxP3^{low}CD127^{low} definiert und die Memory Tregs durch CD45RA⁻FoxP3^{hi}CD127^{low}.

Der Chemokinrezeptor Typ 4 (CCR4) entspricht CD194 und ist beteiligt an der Aktivierung und Migration der Tregs. Er ist hauptsächlich auf der Oberfläche von T-Helferzellen Typ 2 und T-regulatorischen Zellen zu finden und spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Rekrutierung und der Aktivierung immunregulatorischer Zellen im septischen Geschehen (28). Annähernd 75 % der

T-regulatorischen Zellen tragen den CCR4, sind auf ihre regulatorische Funktion bereits vorbereitet, produzieren mehr inhibitorisch wirksames IL-10 und hemmen die Aktivität der CD8-positiven T-Lymphozyten (29).

(e) B-Lymphozyten produzieren Antikörper

Die B-Lymphozyten machen 15-25 % der PBMCs aus und sind als Vertreter des spezifischen, humoralen Immunsystems als einzige Zellen in der Lage, auf einen Antigenreiz hin Antikörper zu produzieren. Zusätzlich sind sie zu Antigenpräsentation und Zytokinproduktion fähig und sind somit sowohl kostimulatorisch als auch immunmodulatorisch tätig. Zusammen mit den T-Lymphozyten übernehmen sie also die wichtigsten Aufgaben des adaptiven Immunsystems.

Die Ausbildung der B-Lymphozyten findet im Knochenmark statt, wo es zur Ausbildung des B-Zell-Rezeptors (BCR, engl. *B cell receptor*) kommt. Die Oberflächenrezeptoren, die die Identifizierung der Zelle ermöglichen, sind CD19, CD20 und CD21, die an dem Aufbau des B-Zell-Rezeptors beteiligt sind (30). Die Aktivierung der zunächst naiven B-Lymphozyten findet in lymphatischen Organen – insbesondere der Milz und den Lymphknoten – statt, sobald eine Antigenbindung an den zelleigenen Rezeptor den Prozess der Antikörperproduktion in Gang setzt. Diese kann entweder in Abhängigkeit von kostimulatorisch wirkender T-Helferzellen oder unabhängig von diesen mithilfe von Kreuzvernetzung des BCR stattfinden (31). Bindet eine auf das auf der B-Zell-Oberfläche präsentierte Antigen spezialisierte T-Helferzelle mithilfe des TCR an den Komplex, wird die B-Zelle, mithilfe der Ausschüttung des Zytokins IL-4, zur Proliferation und Differenzierung zu einer Plasma- oder Gedächtniszelle angeregt (32). Die Plasmazellen sind in der Lage, Antikörper zu produzieren, wohingegen die Gedächtniszellen die Antigeninformation lediglich „speichern“, um beim nächsten Kontakt mit dem Pathogen eine schnellere Immunreaktion hervorzurufen.

B-Lymphozyten treten mit T-Lymphozyten, T-Helferzellen und dendritischen Zellen in Interaktion. Dies geschieht über die Produktion von Zytokinen, wobei die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen vermitteln und die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-35 diese Entwicklung hemmen indem sie die Proliferation der regulatorischen T-Zellen vermitteln (33).

(f) Natürliche Killerzellen lösen die Apoptose in Zielzellen aus

Natürliche Killerzellen machen ca. 15 % der PBMCs im menschlichen Blut aus. Sie entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und zählen morphologisch zu den Lymphozyten (34). Auf ihrer Oberfläche tragen sie in mehr als 90 % der Fälle CD56^{dim} und in 10 % CD56^{bright}. Dabei übernehmen die CD56^{bright} Zellen immunregulatorische Funktionen, während die Zellen mit hoher CD56-Expression zytotoxisch tätig sind (35). CD16 ist auf fast allen CD56^{dim} Zellen vorhanden, während der Oberflächenmarker in 50 % auf den CD56^{bright} Zellen fehlt (36).

Sie gehören klassischerweise zum angeborenen Immunsystem, da ihnen, im Gegensatz zu T- und B-Lymphozyten, spezifische Antigenrezeptoren wie TCR und BCR fehlen (37). Sie stellen jedoch eine wichtige Verbindung zwischen diesem und dem adaptiven Immunsystem dar. Sie nehmen über Zytokine Kontakt zu anderen Immunzellen auf und regulieren insbesondere die dendritischen Zellen als Vertreter der antigenpräsentierenden Zellen (38, 39). Zu ihren besonderen Fähigkeiten gehört es, über ein antigenspezifisches Gedächtnis eine schnelle Immunreaktion auszulösen (40). Sie entfalten ihre Wirkung, indem sie, wie der Name schon verrät, mithilfe ihrer zytolytischen Granula in virusinfizierten Zellen und Tumorzellen die Apoptose auslösen. Sie erkennen hierbei Zellen, denen der körpereigene MHC-I-Komplex fehlt, ein Mechanismus, der auch als „Missing-self-Hypothese“ (engl. *missing-self-hypothesis*) bezeichnet wird (41). Wie diese NK-Zell-Aktivierung durch Viren oder Tumorzellen unterwandert wird, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Checkpoint-Inhibitoren, die die körpereigene Immuntoleranz modifizieren, haben bereits einen Weg in die NK-Zell-basierte Immuntherapie gefunden (42).

(g) Monozyten betreiben Phagozytose und sezernieren das proinflammatorische Zytokin TNF- α

Monozyten machen etwa 10-30 % aller im Blut zirkulierenden PBMCs aus, Hauptspeicherort ist die Milz. Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und zirkulieren bis zu drei Tage im nicht-aktivierten Zustand im Blut, bevor sie bei akuten Infektionen ins Gewebe migrieren und sich dort zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen differenzieren. Dies geschieht unter dem Einfluss durch

das durch TH1-Zellen sezernierte IFN- γ oder TNF- α . Ein weiterer starker Aktivator ist das bereits zuvor erwähnte, von Bakterien ausgeschüttete LPS (43).

Makrophagen betreiben nach Aktivierung Phagozytose der Erreger und sezernieren neben anderen proinflammatorischen Enzymen wie IL-10 und TGF- β und Faktoren insbesondere das Zytokin TNF- α , das pyrogen und proinflammatorisch bis hin zum Schock wirkt und zudem die Konzentration von Krankheitserregern in einem Organismus verringern kann. Das Zytokin fördert die Migration von Neutrophilen zu dem Ort der Entzündung und stimuliert die Makrophagen zur Phagozytose und Zellreifung (44, 45).

Bisher ist kein einzelner Oberflächenmarker bekannt, der ausschließlich auf Monozyten exprimiert wird. Die Kombination aus CD14 und CD16 identifizieren diese jedoch eindeutig. Anhand der Intensität der Expression der Oberflächenmarker können die Monozyten in drei Untergruppen aufgeteilt werden, wobei die klassischen Monozyten, auch inflammatorische Monozyten genannt, (engl. *classical monocytes*) CD14^{hi} CD16^{neg} auf ihrer Oberfläche tragen und mit 80-95 % den Hauptanteil der im Blut zirkulierenden Monozyten bilden (46). Die Übergangsmoноzyten (engl. *intermediate monocytes*) exprimieren CD14^{hi} CD16^{lo} und machen 2-8 % der Monozyten aus. Die nicht-klassischen Monozyten, auch residenten Monozyten, (engl. *non-classical monocytes*) CD14^{lo} CD16^{hi} bilden die Gegenspieler und sind mit 2-11 % vertreten (47). Die nicht-klassischen Monozyten entwickeln sich aus den klassischen Monozyten, somit wird mit höherem Reifegrad eine höhere Dichte des CD16-Oberflächenproteins, und mit geringerem Reifegrad eine höhere CD14-Expression assoziiert (48).

Die drei Untergruppen unterscheiden sich in der Funktion insofern, dass die klassischen und intermediären Monozyten vornehmlich Phagozytose und Antigenpräsentation betreiben, an der Proliferation und Stimulation der T-Zellen und der Angiogenese beteiligt sind, sowie proinflammatorische und regulatorische, sowie zellaktivierende Zytokine sezernieren (49). Die nicht-klassischen Monozyten sind hingegen vorwiegend antiinflammatorisch tätig und hauptsächlich für die vaskuläre Homöostase zuständig, indem sie durch das vaskuläre Endothel „patrouillieren“. Sie scheinen jedoch nicht nur protektiv gegen Arteriosklerose zu agieren, sondern sind auch an deren Entstehung beteiligt, eine Eigenschaft, an der insbesondere unter dem Aspekt der pharmakologischen Nutzbarmachung aktuell intensiv geforscht wird (50).

(h) Dendritische Zellen präsentieren Antigene

Dendritische Zellen (DC, engl. *dendritic cells*) nehmen die Hauptrolle bei der Antigenpräsentation ein und stellen die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem her. Im menschlichen Körper gibt es zahlreiche Arten von dendritischen Zellen, die sich alle in der Morphologie, Herkunft und Funktion unterscheiden. Die meisten dieser DC befinden sich in Oberflächengewebe, die in Kontakt mit der Außenwelt stehen, wie beispielsweise der Haut, Lunge, Schleimhaut des Verdauungstraktes oder Nase, weshalb ihr Anteil im peripheren Blut nur ca. 1 bis 1,5 % beträgt (51). Im peripheren Gewebe nehmen die Zellen, deren Name von den charakteristischen Zellfortsätzen stammt, Antigene auf und migrieren daraufhin in lymphatisches Gewebe. Dort präsentieren diese die prozessierten Antigene mitsamt dem MHC-II Rezeptor an T- und B-Lymphozyten und lösen so, insbesondere über eine T-Zell-Aktivierung, aber auch über Kommunikation mit B-Lymphozyten und NK-Zellen, die Immunantwort aus (52). Kostimulatorisch werden Zytokine wie Interleukin-12 (IL-12) und Interferon-alpha (IFN- α) ausgeschüttet. Fallen diese kostimulatorischen Elemente weg, können DC jedoch auch antiinflammatorisch tätig sein, indem sie Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen hervorrufen. Dies geschieht über die Hemmung der T-Zell-Proliferation (53).

Dendritische Zellen sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die entweder aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, oder direkt aus Monozyten entstehen und sich unter den Gesichtspunkten der Herkunft, der Lokalisation und der Funktion in unterschiedliche Untergruppen einteilen lassen (54, 55). Anhand von Oberflächenmarkern lassen sie sich in eine plasmatische (pDC) und zwei myeloide (mDC) Zellgruppen differenzieren.

Plasmazytoide DC (pDC) sind im Gegensatz zu den myeloiden dendritischen Zellen (mDC) typischerweise negativ für CD11c und tragen die spezifischen Marker CD303 und CD304. Sie sind aus lymphoiden Vorläuferstufen entwickelt, halten sich im peripheren Blut oder lymphatischen Organen auf, und können abhängig vom Kontext den Klassenwechsel von Th1 zu Th2 hervorrufen sowie Natürliche Killerzellen aktivieren (56). Sie produzieren große Mengen an Interferon und spielen eine entscheidende Rolle bei der antiviralen und antibakteriellen Abwehr (57, 58).

Myeloide dendritische Zellen (mDC), zu denen Langerhanszellen und interstitielle DC gehören, tragen unter anderem den Oberflächenmarker CD11c. Sie differenzieren sich in zwei Untergruppen, wobei die mDC Typ 1 (mDC1) den spezifischen Marker CD11c und die mDC Typ 2 (mDC2) den Marker CD141 tragen.

Die **mDC1** machen ca. 1 % aller mononukleären Zellen aus und zeigen einen höheren Aktivitätswert als die übrigen DC. Sie sind im Gegensatz zu den mDC2 stärker an der Aktivierung der CD4-positiven T-Helferzellen und Th-17 beteiligt und weniger an der Antigenpräsentation an CD8-positive T-Zellen.

Die **mDC2** weisen nur etwa 0,1 % der mononukleären Zellen auf und können neben der Antigenpräsentation nekrotische Zellen phagozytieren. Sie sezernieren im Vergleich zu den übrigen DC am wenigsten IL-12 (59).

CD86 fungiert als Marker zur Identifizierung der stimulierten dendritischen Zellen. Er wird von reifen DCs sezerniert und hat eine kostimulatorische Funktion bei der Aktivierung der T-Lymphozyten. Im Vergleich zu den mDC haben die pDC ein geringeres Aktivierungspotential (60).

1.2 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor alpha-7 regelt die Immunantwort herab

Acetylcholin (ACh) ist weitreichend bekannt als Neurotransmitter des zentralen, peripheren und vegetativen Nervensystems, übernimmt also beispielsweise die Aufgabe eines Botenstoffes zur Erregungsübertragung von den Nervenendigungen zur Muskulatur. Überraschenderweise spielt es nicht nur eine wichtige Rolle im Bereich der motorischen Endplatte von Neuronen, sondern auch als Mediator in der Kommunikation der Immunzellen untereinander im Sinne eines auto- oder parakrinen Effekts. Dazu wird das Acetylcholin vor allem in den CD4-positiven T-Helferzellen mittels des Enzyms Acetyltransferase hergestellt. Man unterscheidet zwei Typen von Acetylcholinrezeptoren, die transmembranär gelegen sind. Diese sind – abhängig vom an sie bindenden Agonisten – die nikotinischen und muskarinischen Rezeptoren.

Einige Zellen des Körpers, unter anderem T- und B-Zellen, sowie Makrophagen und dendritische Zellen, tragen sowohl muskarinische als auch nikotinische

Acetylcholinrezeptoren, inklusive den nikotinischen alpha-7 Acetylcholinrezeptor (nAChR α 7). Dabei ist alpha-7 eine der der bisher 17 bekannten Untereinheiten des Rezeptors, ein Ionenkanal, der über die Passage von Kalziumionen eine Signalkaskade auslöst (61). Der nAChR α 7 auf Immunzellen nimmt eine Sonderrolle unter den nikotinischen Rezeptoren ein, da er entscheidenden Einfluss auf die Zellen im Sinne einer Immunmodulation nimmt. Er hemmt die Immunreaktion, indem er die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten drosselt, die Proliferation und Differenzierung der T-Helferzellen hemmt, die Fähigkeit der Antigenpräsentation von APCs herabreguliert und die Zytokinproduktion der Makrophagen blockiert, vorzugsweise TNF- α und IL-1 β . Die immunsuppressive Funktion der Tregs wird ebenfalls moduliert, zudem die Phagozytosefähigkeit der dendritischen Zellen und Zytokinproduktion der T-Lymphozyten. Insbesondere das vor allem durch T-Helferzellen Typ I ausgeschüttete Zytokin IFN- γ wird dezimiert (62, 63).

Auf B-Lymphozyten ist der nAChR α 7 mit 60 % im Vergleich zu den übrigen Subtypen der häufigste nikotinische Acetylcholinrezeptor und hat einen unterschiedlichen Effekt auf die B-Lymphozyten, abhängig von ihrem Reifestadium. So fördert er die B-Zell-Reifung und inhibiert dann die Aktivierung der reifen Zellen. Er regelt die Proliferation der Zellen und deren Antikörperproduktion herunter und greift in die B-Zell/T-Zell-Kommunikation ein. Er nimmt jedoch keinen Einfluss auf den IgM-IgG-Klassenwechsel oder die Memory-B-Zell-Aktivierung, reguliert also nicht alle Funktionen der Zellgruppe (64, 65).

1.3 Stress, seine Formen und hormonellen Komponenten

Stress und seine Rolle für die Entstehung von Krankheiten wird seit den 1970er Jahren intensiv in Mausmodellen und am Menschen untersucht. In den meisten Studien wird Prüfungsstress als ein „kurzer, naturalistischer Stress“ charakterisiert. Er hält länger an als der „akute Stress“ bei Aufgaben wie Kopfrechnen oder eine Rede halten, aber dauert kürzer als eine „stressvolle Episode“, wie sie beispielsweise bei einer Naturkatastrophe oder dem Verlust eines Ehepartners auftritt. Darüber hinaus sind noch weitere Stressoren untersucht worden, die sich dadurch auszeichnen, dass die Dauer durch das Individuum nicht abschätzbar ist. So entsteht beispielsweise ein „chronischer

Stressor“ bei physischer Behinderung und ein „entfernter Stressor“ bei traumatischen Ereignissen in der Kindheit (66, 67).

Im Mausmodell arbeitet man mit unterschiedlichen Stressmodellen. Beispielhaft ist hier das R-SDS-Modell (engl. *repeated social defeat stress*) zu erwähnen, welches häufig zur Verwendung kommt. Das Protokoll sieht beispielsweise die Konfrontation mit einem aggressiven Gegenspieler unter gleichzeitiger Fixierung im Käfig vor. Diese Form von Stress ist äquivalent zum chronischen sozialen Stress beim Menschen und kann nachweislich zu depressivem Verhalten führen (68, 69).

Das vorliegende Studienmodell arbeitet mit einer kombinierten chronischen und akuten Stressepisode. Die Lernphase zwölf Wochen vor dem Examen entspricht einem Zeitraum chronischen Stresses, während die Examensprüfung selbst einem akuten Stressor gleichkommt. In der Erholungsphase nach dem Examen hingegen bestand eine vergleichsweise stressarme Zeit.

1.4 Effekte von Stress auf das Immunsystem: Studienlage

Das Immunsystem – einmal aktiviert – ist ein fein abgestimmtes Gefüge des Zusammenspiels diverser Zellpopulationen. Unter starkem Stress kann dieses Gleichgewicht gestört werden, da der Organismus unter dem Einfluss von Stresshormonen steht und somit die Immunreaktion zugunsten des „fight or flight“ Mechanismus in den Hintergrund rückt.

Hans Selye erwähnte erstmals im Jahre 1936 die direkten Auswirkungen akuten Stresses auf das Immunsystem, indem er das sogenannte „Allgemeine Adaptationssyndrom“ beschreibt. Durch Versuche am Mausmodell bewies er, dass sich akuter Stress immunsuppressiv auf den Körper auswirkt (70). Kiecolt-Glaser et al führten daraufhin 1984 eine Studie an Medizinstudenten unter Prüfungsstress durch, die eine stressbedingte Verringerung der NK-Zellen beweisen konnte (71), später wurde auch die Lymphozytensuppression und Hemmung der Antikörperproduktion unter chronischem Stress bewiesen (72, 73).

Eine große Metaanalyse von 2004 unter Segerstrom et al. fasste schließlich die Erkenntnisse aus über 300 verschiedenen Artikeln zusammen, in denen vorwiegend die

T- und T-Helferzellen als Vertreter der zellulären, B-Zellen als Vertreter der humoralen und NK-Zellen als Vertreter der unspezifischen Immunabwehr untersucht wurden. Akuter Stress über Minuten bis Stunden führte zu einer Aktivierung nicht nur des angeborenen, sondern auch des adaptiven Immunsystems. Dhabhar et al. sehen darin einen Mechanismus, der für eine erwünschte Immunreaktion, beispielsweise im Rahmen einer Impfung oder der Wundheilung, für therapeutische Zwecke genutzt werden kann (15, 74). Naturalistischer Stress führte zu einer Reduktion der zellulären Immunabwehr, also der proinflammatorischen, durch Th1-Zellen vermittelten, Immunantwort. Dies geschieht unter Erhaltung der humoralen, mitunter durch Th2-Zellen regulierten, Immunreaktion und ohne Veränderung der absoluten Zellzahlen. Chronische Stressoren hingegen unterdrückten beide Systeme (66, 67).

Besonders interessant ist auf Ebene der Stressmediatoren der Acetylcholinrezeptor auf Immunzellen. Akuter Stress entfaltet seine Wirkung nicht nur über das Stresshormon Cortisol und die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin als Vermittler des sympathischen Nervensystems oder Acetylcholin als Mediator des parasympathischen Nervensystems (PNS). Es findet vielmehr auch eine neuronal vermittelte Stressreaktion des PNS über den Nervus vagus, der cholinerge, antiinflammatorische Aktivierungsweg (CAP, engl. *cholinergic anti-inflammatory pathway*) über die Milz statt. Dort werden T-Zellen aktiviert, die über die Sekretion von Acetylcholin Makrophagen und andere nAChR α 7 exprimierende Immunzellen in der Produktion proinflammatorischer Zytokine hemmen. Dies ist der sogenannte „cholinerge, antiinflammatorische Reflex“ (engl. *cholinergic anti-inflammatory reflex*) (75, 76). Der Acetylcholinrezeptor α 7 spielt demnach eine entscheidende Rolle in der Immunmodulation unter Stress und könnte als Angriffspunkt zielgerichteter Substanzen für zukünftige Pharmakotherapie genutzt werden (77).

2 FRAGESTELLUNG

In der Stressforschung wächst in den letzten Jahrzehnten die Einsicht, dass Stress bei der Genese chronischer Krankheiten, Autoimmunpathologien und bei der Entstehung von Krebserkrankungen eine große Rolle spielt (78). Die Zellen des Immunsystems fungieren hierbei als maßgebliche Vermittler.

In dieser Studie sollte der Einfluss von Stress auf junge Menschen und deren einerseits bereits vielfach untersuchte, andererseits erst im letzten Jahrzehnt entdeckte Immunzellgruppen, untersucht werden. Dabei lag der Arbeit die Hypothese zugrunde, dass eine stressvolle Episode bei Medizinstudentinnen, die Lernphase für das Hammerexamen, in Kombination mit kurzem, naturalistischen Stress, der Prüfung an sich, grundlegende Veränderungen diverser Immunzellpopulationen verursacht.

Im Einzelnen wurden folgende Hypothesen bearbeitet:

1. Proinflammatorische Zellen des Immunsystems werden unter Examensstress supprimiert. Dies betrifft in unterschiedlichem Maße die Zellen der angeborenen und der erlernten Immunität. Deren korrespondierenden Zytokine reagieren analog zu dieser Entwicklung. Untersucht wurden:
 - a. Monozyten mit deren proinflammatorischen Untergruppen und das von ihnen sezernierte Zytokin TNF- α
 - b. Natürliche Killerzellen
 - c. T-Lymphozyten als größter Vertreter der erworbenen Immunität und die korrespondierenden proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α auf T-Lymphozyten und lebenden Zellen
 - d. Zytotoxische T-Lymphozyten
 - e. T-Helferzellen in deren Gesamtzahl und in aktivierter Form, vom Typ 1 und 17 und die proinflammatorischen zugehörigen Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α

2. Die antiinflammatorischen Zellgruppen der angeborenen und erlernten Immunität werden in der Lernphase vor und der Stressphase während des Hammerexamens aktiviert oder proliferieren. Hierzu gehören:
 - a. Nicht-klassische Monozyten
 - b. T-Helferzellen Typ 2 mit dem zugehörigen Zytokin IL-4
 - c. Regulatorische T-Lymphozyten
3. Die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen und deren korrespondierende Phänotypen werden unter Examensstress aktiviert
4. Die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten als Repräsentanten der humoralen Immunität werden unter Examensstress supprimiert.
5. Der Acetylcholinrezeptor hat einen immunmodulierenden Effekt auf T-, T-Helfer-, B-, NK-Zellen und Monozyten und wird entsprechend der zuvor genannten Hypothesen exprimiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden wird die vollständige Auflistung der verwendeten Materialien vorgenommen und die zur Beantwortung der Fragestellung angewandten Methoden erläutert.

3.1 Material

3.1.1 Geräte

In Tabelle 1 sind alle für die Zellisolation verwendeten, in Tabelle 2 die für die Durchflusszytometrie gebrauchten Geräte aufgeführt.

Für die Zellisolation verwendete Geräte

Artikel	Hersteller
Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sterilwerkbank Heraeus Laminair HBB 2448	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Reagenzglasschüttler Grant Bio PCV-2400 Combined Centrifuge/Vortex Mixer (Combi Spin)	Keison Products, Chelmsford, England
Kühlschrank	Liebherr
Tiefkühler Innova® U535 Upright Freezer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Für die Zellisolation verwendete Geräte

Für die Durchflusszytometrie verwendete Geräte

Artikel	Hersteller
BD FACSCanto™ II Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Sysmex KX-21N Hämatologie-Analysator	Sysmex GmbH, Bornbarch, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad WNB10	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Artikel	Hersteller
Reagenzglasschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
HERAcell® 240 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kühlschrank Pentan	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Gefrierschrank Pentan	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Heraeus® HERAsafe® Sicherheitswerkbänke	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland

Tabelle 2: Für die Durchflusszytometrie verwendete Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 3 sind alle für die Zellisolation, Auftauprozesse und Oberflächenfärbungen verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Für die Zellisolation, Auftauprozesse und Färbungen verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Infusionszubehör Butterfly-Kanüle 21G grün	Hospira GmbH, München, Deutschland
BD Vacutainer® Röhrchen 6,0 ml K2 EDTA 10,8 mg	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® Einmalhalter	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer® multiple sample luer adapter	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CryoPure Röhrchen 1,8 ml Weiss	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Germany
Freezing container, Nalgene® Mr. Frosty 86 mm × 117 mm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FACS Tubes 5ml REF 55.1579	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Germany
Transferpipetten 3,5ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Germany
Pipetten Eppendorf Research Plus 0,5-5ml, 100-1000µl Eppendorf Research 0,1-2,5µl und 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland

Artikel	Hersteller
ErgoOne 20-200µl	
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl und 5ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Germany
50ml BD Falcon™ Tubes steril, konisch, mit Schraubverschluss	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
15ml BD Falcon™ Tubes steril, konisch, mit Schraubverschluss	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
SafeSeal Gefäß 0,5ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Germany

Tabelle 3: Für die Zellisolation, Auftauprozesse und Färbungen verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Antikörper, Isotypkontrollen, Beads

In Tabelle 4 sind alle für die Färbungen verwendeten Antikörper, Isotypkontrollen und Beads aufgeführt.

Antikörper, Isotypkontrollen und Beads zur Ausführung der Oberflächenfärbungen

Artikel	Hersteller
FITC anti-human CD8 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE anti-human CD25 (M-A251) Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PerCP anti-human CD4 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE-Cy7 anti-human CD127 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
Alexa Fluor 647 anti-human FoxP3 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
APC-Cy7 anti-human CD45RA Antibody	BioLegend Inc, London, UK
Pacific Blue anti-human CD3 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
Brilliant Violet 510 anti-human CD194 Antibody (CCR4)	BioLegend Inc, London, UK
FITC anti-human CD304 (Neuropilin-1) Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE anti-human CD1c Antibody	BioLegend Inc, London, UK
7-AAD (7-amino-actinomycin D) Viability Staining Solution	BioLegend Inc, London, UK
PE-Cy7 anti-human CD141 (Thrombomodulin) Antibody	BioLegend Inc, London, UK
APC anti-human CD11c Antibody	BioLegend Inc, London, UK

Artikel	Hersteller
APC-Cy7 anti-human CD14 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
Brilliant Violet 421 anti-human CD86 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
Brilliant Violet 510 anti-human CD19 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE anti-human CD16 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE-Cy7 anti-human CD4 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
APC anti-human CD56 (NCAM) Antibody	BioLegend Inc, London, UK
FITC anti-human IFN γ Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE anti-human IL17 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
PE-Cy7 anti-human TNF- α Antibody	BioLegend Inc, London, UK
APC anti-human IL-4 Antibody	BioLegend Inc, London, UK
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody (FoxP3 Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
APC/Cy7 Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody (CD45RA Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
Brilliant Violet 421™ Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody (CD 86 Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
FITC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody (IFN γ Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody (IL17 Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
PE/Cy7 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (TNF- α Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
APC Rat IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (IL4 Isotyp)	BioLegend Inc, London, UK
Anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha-7 antibody	Abcam plc, Cambridge, UK
Goat Control IgG (Isotyp nAChR a7)	Abcam plc, Cambridge, UK
FITC-conjugated Donkey Anti-Goat IgG (Sekundäntikörper nAChR a7)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Baltimore Pike, USA
Anti Mouse IgG Compensation Bead Set anti Mouse IgG beads negative control beads (BSA)	TransMIT GmbH, Giessen, Deutschland

Tabelle 4: Antikörper, Isotypkontrollen und Beads zur Ausführung der Oberflächenfärbungen

3.1.4 Lösungen zur Zellstimulation, Proteaseinhibitor

In Tabelle 5 sind alle für die intrazelluläre Zytokinfärbung gebrauchten Zellstimulantien und Proteaseinhibitoren aufgeführt.

Zellstimulantien und Proteaseinhibitoren, die für die Durchführung der intrazellulären Zytokinfärbung benötigt wurden

Artikel	Hersteller
Brefeldin A Solution	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
Ionomycin calcium salt from <i>Streptomyces conglobatus</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BD GolgiStop™ containing Monensin	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 5: Zellstimulantien und Proteaseinhibitoren, die für die Durchführung der intrazellulären Zytokinfärbung benötigt wurden

3.1.5 Nährmedien und Puffer

In Tabelle 6 sind alle für die Durchflusszytometrie verwendeten Nährmedien und Puffer aufgeführt.

Nährmedien und Puffer für die Durchflusszytometrie

Medium	Hersteller
RPMI-1640 Medium Modified, with 20mM HEPES and L-glutamine, without sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10 % heat deactivated fetal calf serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (10x) sterile filtered without Ca and Mg	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
AB Serum	Serum eines anonymen Spenders mit der Blutgruppe AB

Medium	Hersteller
Gibco® DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (1x) no calcium, no magnesium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Biocoll Separating Solution Dichte 1,077 g/ml, isotonisch	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Gibco® AIM V® Serum Free Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO 33,3 % Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: Nährmedien und Puffer für die Durchflusszytometrie

3.1.6 Mischungen

In Tabelle 7 sind alle für die Durchflusszytometrie selbständig angefertigten Mischungen mit der jeweiligen Zusammensetzung aufgeführt.

Für die Oberflächenfärbungen hergestellten Mischungen

Name	Zusammensetzung
Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % FCS 2U/ml Heparin
PBS-Waschpuffer	50ml PBS 1 % FCS
Permeabilisationspuffer Intrazellulärfärbung (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)	10 % Perm/Wash Buffer 90 % H ₂ O
Permeabilisationslösung FoxP3 (eBioscience)	75 % Fixation/Permstabilisations-Lösung 25 % Fix/Perm Diluent
Permeabilisationspuffer FoxP3 (eBioscience)	10 % Permeabilisationspuffer 90 % H ₂ O
Ionomycin	1 mg/ml in DMSO gelöst (Stimulation mit 1 µg/ml)
PMA	50 µg/ml in DMSO gelöst (Stimulation mit 50 ng/ml)
Acetylcholinrezeptor α7 Antikörper-Suspension	10 % Antikörper 90 % PBS

Name	Zusammensetzung
Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ Isotyp-Suspension	10 % Goat Control IgG 90 % PBS

Tabelle 7: Für die Oberflächenfärbungen hergestellten Mischungen

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Die Datenerhebung fand zwischen Februar und August 2010 statt. Es handelte sich hierbei um eine retrospektive Studie im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie. Die Teilnehmerinnen wurden durch eine Anzeige auf dem schwarzen Brett der Universitätsklinik Charité Berlin angeworben. Nach Abschluss der Studie wurde jede Teilnehmerin mit 200 Euro vergütet. Die ethischen Erfordernisse wurden im Sinne der Deklaration von Helsinki (79) erfüllt und somit fand die Studie die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Berlin am 25.7.2014 mit dem AZ EA1/134/14.

3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien waren: weibliche Medizinstudentinnen zwischen 18 und 48 Jahren, die keine hormonelle oder endokrine Medikation, einschließlich Kortikoide, Antihypertensiva, hormonelle Kontrazeption, Antidepressiva und Schmerzmedikamente einnehmen. Sie sollten frei von chronischen Krankheiten sein und weder an Fettleibigkeit noch an Bluthochdruck, metabolischen, allergischen oder psychischen Erkrankungen leiden. Es sollte kein übermäßiger Nikotin-, Kaffee-, Tee oder Alkoholkonsum vorliegen sowie keine übermäßige sportliche Betätigung, insbesondere nicht am Tage der Blutentnahme. Zum Ausschluss führten zudem eine vorliegende akute Infektion, Schwangerschaft oder eine ausgeprägte stressvolle Episode, wie beispielsweise der Tod eines Familienangehörigen

3.2.3 Teilnehmercharakteristika und Ausschlussgründe der primär eingeschlossenen Studienteilnehmerinnen

Alle Studienteilnehmerinnen waren Medizinstudentinnen mit einem Alter zwischen 21-32 Jahren mit einem Durchschnittsalter von MW 25.91 +/- SD 2.27. Sie erwiesen sich als homogene Gruppe, die zumeist mit anderen Studenten oder Familienangehörigen zusammenlebten, unverheiratet aber oft in einer Partnerschaft waren, soziale Kontakte pflegten und hinreichend finanziell durch staatliche Gelder oder die Eltern unterstützt wurden. Die Lebensumstände entsprachen den typischen Bedingungen eines Studierenden im Berliner Stadtzentrum. Es wurden keine Unterschiede diesbezüglich im Vergleich der Gruppen oder zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten gefunden. Alle Studienteilnehmerinnen bestanden das Examen und waren zufrieden mit ihrem Ergebnis.

Die Studentinnen wurden in zwei Gruppen eingeteilt, in eine Stress- und eine Kontrollgruppe. Diejenigen, die am sogenannten „Hammerexamen“, dem zweiten Teil der ärztlichen Prüfung, teilnahmen, wurden als Stressgruppe bezeichnet. Die Teilnehmerinnen, die sich im letzten regulären Semester des Medizinstudiums befanden, wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Die Stressgruppe stand nachweislich unter einem höheren Stressniveau als die Kontrollgruppe (80).

Aus unterschiedlichen Gründen konnten einige der primär eingeschlossenen Studienteilnehmerinnen nicht in der Auswertung berücksichtigt werden. Die Teilnehmerinnen mit den Probennummern 2, 4, 5 und 15 wurden ausgeschlossen, da eines der Ausschlusskriterien zu mindestens einem Untersuchungszeitpunkt zutraf, beispielsweise musste eine Teilnehmerin ein krebskrankes Kind pflegen. Die Proben der Teilnehmerinnen mit den Nummern 1 und 6 der Stressgruppe konnten nicht eindeutig zugeordnet werden und wurden daher nicht in die Auswertung miteingeschlossen. Die Probennummern 3 der Kontrollgruppe und 30 der Stressgruppe wurden aus allen Messungen ausgeschlossen, da die Zellzahlbestimmung im Sysmex-Gerät eine zu geringe Anzahl ergab und somit verfälschte Ergebnisse geliefert hätte. Somit verringerte sich die Gesamtprobenzahl auf 17 in der Kontrollgruppe und 16 in der Stressgruppe, also insgesamt auf $n = 33$.

Zusätzlich zu den zuvor ausgeschlossenen Probennummern verringerte sich die Anzahl der Proben in der „Immunstatus-“, „DC-“ und „Zytokinfärbung“ wiederum jeweils um 4 Proben, da die Proben mit den Nummern 26 und 32 aus der Kontrollgruppe und die Nummern 23 und 29 der Stressgruppe wegen zu geringen Zellzahlen herausfielen. In der „DC-“ und „Zytokinfärbung“ fielen die Proben 24 und 28 der Stressgruppe heraus, da nach den vorangehenden Färbungen nicht genug Zellen für eine weitere Färbung vorhanden blieben, wobei sich die Gesamtprobenzahl für diese Messungen um jeweils zwei Proben der Stressgruppe verminderte und sich somit die Probenzahl für die „DC-Messung“ auf $n = 27$ reduzierte.

Bei der als letztes durchgeführten Oberflächenfärbung „Zytokine“ konnte keine Färbung der Proben 16 und 36 der Kontrollgruppe vorgenommen werden, wodurch sich die Gesamtprobenzahl auf $n = 25$ verringerte. Die Ergebnisse der „FoxP3-“ und „Immunstatusfärbung“ wurden für die CD3-positiven T-Lymphozyten und CD4-positiven T-Lymphozyten kombiniert. Analog dazu wurden die Ergebnisse der Immunstatus- und DC-Färbungen für die Monozyten und B-Lymphozyten kombiniert.

In Tabelle 8 ist nachzuvollziehen, welche Proben von den jeweiligen Messungen ausgeschlossen wurden und aus welchem Grund. In den jeweiligen Spalten sind die Probennummern aufgetragen sowie die zugehörige Gruppe. In den beiden rechten Spalten ist nachvollziehbar, aus welchen Oberflächenfärbungen die Studienteilnehmerin ausgeschlossen wurden und aufgrund welchen labortechnischen Problems dies geschah.

Ausschlussgründe primär eingeschlossener Studienteilnehmerinnen

Probennr.	Gruppe	Ausschluss aus Färbungen	Ausschlussgrund
1	Stressgruppe	FoxP3, IS, DC, Zy	Proben nicht zuzuordnen
3	Kontrollgruppe	FoxP3, IS, DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
6	Stressgruppe	FoxP3, IS, DC, Zy	Proben nicht zuzuordnen
16	Kontrollgruppe	Zy	Geringe Gesamtzellzahl
23	Stressgruppe	IS, DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
24	Stressgruppe	DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl

Probennr.	Gruppe	Ausschluss aus Färbungen	Ausschlussgrund
26	Kontrollgruppe	IS, DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
28	Stressgruppe	DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
29	Kontrollgruppe	IS, DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
30	Stressgruppe	FoxP3, IS, DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
32	Kontrollgruppe	IS, DC, Zy	Geringe Gesamtzellzahl
36	Kontrollgruppe	Zy	Geringe Gesamtzellzahl

Tabelle 8: Ausschlussgründe primär eingeschlossener Studienteilnehmerinnen

Entsprechend der Anzahl der ausgeschlossenen Teilnehmerinnen reduzierte sich die Anzahl der in der Messung eingeschlossenen Proben. Tabelle 9 beschreibt, wie viele Proben nach Ausschluss noch für die jeweilige Oberflächenfärbung zur Verfügung standen.

Anzahl der Teilnehmerinnen (n) nach Ausschluss

Färbung	n Stressgruppe	n Kontrollgruppe	n gesamt
Gesamtprobenzahl	19	18	37
FoxP3	17	16	33
Immunstatus	15	14	29
DC	13	14	27
Zytokine	13	12	25

Tabelle 9: Anzahl der Teilnehmerinnen n nach Ausschluss

3.2.4 Probenentnahme und PBMC Zellisolation

In einem Telefonat wurden die Studentinnen über die Studie und die Ein- bzw. Ausschlusskriterien informiert, und in Kleingruppen von 6-8 Personen in das Labor des Instituts für Psychoneuroimmunologie am Charité Campus Virchow-Klinikum geladen. Die Entnahme der Blutproben fand jeweils zwischen 8:00 und 9:00 Uhr morgens statt. Während die Probandinnen die Fragebögen ausfüllten, wurden die Proben direkt weiterverarbeitet. Die Blutentnahme erfolgte immer zur gleichen Tageszeit zu

insgesamt drei Zeitpunkten. Der erste Zeitpunkt fand 12 Wochen vor dem Examen (im Folgenden auch „Termin 1“ oder „T1“ genannt) statt, im Monat Januar, die zweite Blutentnahme im Monat April in den zwei Wochen nach dem schriftlichen Examen, noch vor Bekanntgabe der Noten (entspricht „Termin 2“ oder „T2“) und die dritte Blutentnahme 12 Wochen nach dem Examen, im Monat Juli (in dieser Arbeit auch „Termin 3“ oder „T3“ betitelt). Pro Probandin wurden zwei EDTA-Blutröhrchen (6 ml) abgenommen und bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Als nächster Schritt erfolgte die Isolation der PBMCs, der mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

Vorerst wurden die beiden, jeweils 6 ml fassenden EDTA-Röhrchen bei 1800rpm für 5 Minuten mit Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und für einen späteren Arbeitsschritt bei -4°C verwahrt. Der Unterstand beider EDTA-Röhrchen wurde in ein gemeinsames 50 ml Falconröhrchen überführt und mit sterilem PBS auf 12 ml aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Nun wurden je 6 ml des Zell/PBS-Gemisches vorsichtig auf zwei mit 3 ml Biocoll bestückten 15 ml Falconröhrchen gegeben ohne dass sich beide Reagenzien vermischten. Anschließend wurden die Falconröhrchen bei 2400rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Der Interphasenring, der sich am Übergang von Biocoll zu PBS gesammelt hatte, wurde nun mit einer sterilen Transferpipette vorsichtig abgesaugt und in jeweils ein neues 15 ml Falconröhrchen überführt. Die Falconröhrchen wurden daraufhin mit PBS auf 12 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Diesmal bei 1800rpm für 10 Minuten mit Bremse bei Raumtemperatur, wobei ein Pellet entstand. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen per Ratschen (das Falconröhrchen wurde über einen umgedrehten Röhrchenständer gezogen) vom Boden des Röhrchens gelöst und mit dem im Kühlschrank verwahrt Plasma auf 1 ml aufgefüllt. Nun wurde jeweils der Inhalt eines Falconröhrchens in ein mit 450 µl DMSO und 550 Plasma versetztes Nunc-Röhrchen überführt. Das Nunc-Röhrchen wurde dann einmal kurz geschwenkt. Im Anschluss wurden die dann isolierten Zellen bei -80°C in einer Nalgane-Gefrierbox, das zum Zellschutz mit 80 %-igem Alkohol gefüllt war, eingefroren. Nach einer Woche wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Proben wurden am 25.03.2014 auf Trockeneis von Berlin nach Gießen geschickt und direkt in flüssigem Stickstoff gelagert. Die FACS-Messung erfolgte daraufhin im biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg in Gießen in Zusammenarbeit mit der

FACS Core Facility Klinische Immunologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein.

3.2.5 Durchflusszytometrie: Prinzip, Messung und Auswertung

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, das Aussagen über verschiedene Zelleigenschaften wie Größe und Granularität treffen kann und diese mittels Antikörper zuvor gezielt markierten Rezeptoren sichtbar machen kann. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln und mit hoher Geschwindigkeit an Lasern unterschiedlicher Wellenlänge vorbeigeleitet (81). Die von den Zellen emittierten Lichtsignale werden gefiltert und anschließend mithilfe von Detektoren aufgefangen. Die Größe der Zellen kann anhand des Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *Forward Scatter*), die Granularität anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC, engl. *Side Scatter*) bestimmt werden. Weitere Zelleigenschaften werden mittels der Fluorochrome, die zuvor per Antikörperbindung an die Zellen geheftet werden, analysiert und direkt in einem sogenannten „Dotplot“, einem zweidimensionalen Diagramm, an dem zwei verschiedene Eigenschaften auf x- und y-Achse aufgetragen werden können (s. Abbildung 2), dargestellt. Dabei entspricht jeder Punkt einem gemessenen Ereignis. Es wird jeweils ein CD-Marker als Abszisse und Ordinate aufgetragen. Zellen, die für beide Marker negativ sind, befinden sich am Schnittpunkt beider Achsen. Die Fluoreszenzintensität nimmt von links nach rechts (x-Achse) bzw. von unten nach oben (y-Achse) zu, sodass die am weitesten vom Nullpunkt entfernten Ereignisse am positivsten für den jeweiligen Marker sind.

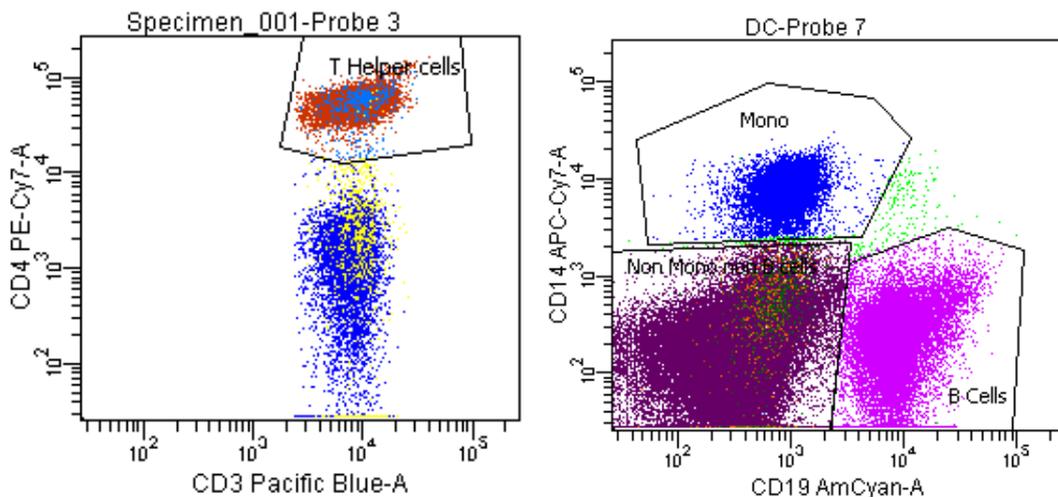


Abbildung 2: Beispiel eines Dotplots.

Das BD FACSCanto II Durchflusszytometer hat drei verschiedene Laser, einen Argonionenlaser mit der Wellenlänge 488, einen Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 633 und einen Diodenlaser mit der Wellenlänge 405. Diese Gegebenheit macht die gleichzeitige Messung von acht Kanälen möglich. Um ein möglichst breites Spektrum über die Veränderungen der verschiedenen Zellpopulationen unter Stress zu gewinnen, wurden insgesamt vier verschiedene Oberflächenfärbungen mit jeweils acht unterschiedlichen antikörpergekoppelten Fluorochromen vorgenommen. Bei den vier Oberflächenfärbungen handelt es sich um die „FoxP3-Färbung“, den „Immunstatus“, die „DC-Färbung“ und die „Zytokinfärbung“.

Mit Hilfe der Arbeitsgruppe um Holger Hackstein wurde ein sogenanntes „Panel“ erstellt (s. Tabelle 10). Dieses zeigt die Kombination der zur Charakterisierung einer Zellpopulation erforderlichen Oberflächenmarker mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE, PerCP, PE-Cy7, ABC, ABC-Cy7, Pacific Blue bzw. Brilliant Violet421 und AmCyan bzw. Brilliant Violet510. Bei den Oberflächenmarkern handelt es sich um Oberflächenproteine, die gegen die Cluster of Differentiation auf der Oberfläche der Zellen, oder Bestandteile, die sich innerhalb einer Zelle befinden, wie beispielsweise Zytokine, gerichtet sind. Der Marker 7AAD ist ein intrazellulärer DNA-Marker, der spezifisch an die DNA nekrotischer Zellen bindet und somit dabei helfen kann, tote Zellen auffindig zu machen und diese aus der Auswertung auszuschließen.

In Tabelle 10 ist das in diesem Fall für die Durchflusszytometrie verwendete Panel abgebildet. In der obersten Zeile sind die drei Laser mit den Wellenlängen 488, 633 und 405 aufgetragen, darunter die acht möglichen Messkanäle. In jedem Kanal ist die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes möglich, die jeweilige Wellenlänge ist in Klammern angegeben. Am linken Rand sieht man die vier unterschiedlichen Oberflächenfärbungen (FoxP3=FoxP3-Färbung, DC=DC-Färbung) untereinander aufgelistet, in denen jeweils acht verschiedene Marker zur Zell-/Zytokinidentifizierung zur Verfügung stehen. Wurde ein spezieller Klon oder eine anderer Fluoreszenzfarbstoff, abweichend vom Herstellerprotokoll, verwendet, ist die jeweilige Bezeichnung in Klammern angegeben.

Das für die Durchflusszytometrie verwendete Panel

	488 Laser				633 Laser		405 Laser	
Kanäle	1	2	3	4	5	6	7	8
Fluoreszenzfarbstoffe	FITC (530)	PE (585)	PerCP (670)	PE-Cy7 (780)	APC (660)	APC-Cy7 (780)	Pacific Blue (450)/ BV421 (421)	AmCyan/ BV510 (510)
FoxP3	CD8	CD25 (M-A251)	CD4	CD127	FoxP3	CD45RA	CD3	CCR4
Immunstatus	CHRNA7	CD16	7AAD	CD4	CD56	CD14	CD3	CD19
DC	CD304	CD1c	7AAD	CD141	CD11c	CD14	CD86 (BV421)	CD19
Zytokine	IFN- γ	IL17	CD4	TNF- α	IL4 (MP4-25D2)	CD14	CD3	

Tabelle 10: Das für die Durchflusszytometrie verwendete Panel

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der BD FACSDiva Software (Version 6.1.3). Um im Datenanalyseprogramm festzulegen, welche Ereignisse im Dotplot zu welcher Zellpopulation gezählt werden soll, wurden die Ereignisse in Fenster eingeschlossen und durch das Programm gezählt. Zur Standardisierung der Ergebnisse wurden Masken erstellt, die jeden Messtag nur minimal angepasst wurden. Die weitere Bearbeitung und graphische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Seattle, WA, USA). Von den mehrfach gemessenen Zellpopulationen der vier Kanäle wurde jeweils der Durchschnittswert für die statistische Auswertung berechnet.

3.2.6 Auftauprotokoll

Zu Beginn wurde das Zellkulturmedium vorbereitet, indem in einem 50 ml Falconröhrchen RPMI 1640 mit FBS und Heparin gemischt wurden. Anschließend wurde der für alle kommenden Waschschriffe verwendete PBS-Waschpuffer ebenfalls in 50 ml Falcons angesetzt.

Für die Messungen wurden die Nunc-Röhrchen erst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in jeweils ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Um die Zellen von dem Frostschutzmittel DMSO zu waschen, wurden sie tröpfchenweise mit dem Zellkulturmedium versetzt und die Probe so auf 20 ml aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren bei 500 g für fünf Minuten wurde der Überstand abgeschüttet und die Pufferreste aus dem schräg gehaltenen Falcon pipettiert, um übermäßige Verdünnung zu vermeiden. Erneut wurden 500 µl Medium zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit den Zellen vermischt. Zur korrekten Messung im FACS-Gerät wird eine Zahl von mindestens einer Million Lymphozyten für die Färbungen mit langen Waschschriffen oder seltenen Zellen und von 500.000 für einen einfachen Immunstatus benötigt. Um nun eine Zellzahlanalyse durchzuführen, wurden jeweils 60 µl in Eppendorf-Tubes pipettiert und das Blutbild am Hämatologie-Analysator gemessen. Die Konzentrationen wurden auf die Gesamtprobenmenge umgerechnet, indem man die im Analysator gemessene Zellzahl ins Produkt mit der Gesamtprobenmenge setzte ($WBC \times \text{Gesamtprobenmenge}$, z. B. $4,2 \times 10^3 \times 550 \mu\text{l} = 2,31 \times 10^6$).

3.2.7 Oberflächenfärbung und Kompensationsmessung

Für einen Arbeitstag wurden in der Regel zehn Stunden berechnet, um alle vier Färbungen parallel zueinander vorzunehmen. Es wurde mit der am meisten Zeit beanspruchenden intrazellulären Zytokinfärbung begonnen. Daraufhin folgte die ebenfalls intrazelluläre FoxP3-Färbung, dann der Immunstatus und schließlich die DC-Färbung.

Da verschiedene Faktoren wie Länge der Waschschriffe und Chemikalien sich zwischen den Oberflächenfärbungen unterscheiden, variieren die für die Durchflusszytometrie verwendeten Zellzahlen. Für den Immunstatus wurden 5×10^5 Zellen benötigt, für die anderen drei Färbungen idealerweise 1×10^6 . Die errechneten

Mengen X wurden jeweils in ein FACS-Röhrchen pipettiert und je nach Färbung entweder mit dem PBS-Waschpuffer auf insgesamt 100 μ l, oder mit dem Zellkulturmedium auf 1000 μ l aufgefüllt. Waren die Zellzahlen nicht ausreichend für alle vier Färbungen, wurden für diese spezifische Probe nicht alle vier Färbungen vorgenommen. In Einzelfällen waren die Zellzahlen nach dem Auftauprozess so gering, dass keine Färbung vorgenommen werden konnte.

Mittels einmaliger **Kompensationsmessung** wurden die Überlappungen der Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome, das sogenannte „Spillover“ herausgerechnet und somit vermieden, dass Signale eines Farbstoffs fälschlicherweise einem anderen Spektrum zugeordnet wurden. Zur Antikörperbindung wurden als Zellersatz Beads verwendet, als Negativkontrolle dienten mit BSA überzogene Beads. Die Kompensationsmessungen wurden einmalig durchgeführt und wurden für alle Messtage gleichermaßen gespeichert.

(a) Zytokinfärbung

Die für die intrazelluläre Zytokinfärbung und Zelldetektion verwendeten Oberflächenmarker und ermittelten Zellgruppen sind in Tabelle 11 aufgelistet. Der für die Zellgruppe charakteristische Marker ist dabei hervorgehoben.

Die in der Zytokinfärbung durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen

Oberflächenmarker	Zellgruppe
IFN- γ +	IFN- γ positive Zellen
IL-4+	IL-4 positive Zellen
IL-17+	IL-17 positive Zellen
TNF- α +	TNF- α positive Zellen
CD3+	T-Lymphozyten
CD3+IFN- γ +	IFN- γ positive T-Lymphozyten
CD3+IL-4+	IL-4 positive T-Lymphozyten
CD3+IL-17+	IL-17 positive T-Lymphozyten

Oberflächenmarker	Zellgruppe
CD3+TNF- α +	TNF- α positive T-Lymphozyten
CD14+	Monozyten
CD14+ TNF- α +	TNF- α positive Monozyten
CD3+CD4+	T-Helferzellen
CD3+CD4+IFN- γ +	T - Helferzellen Typ 1
CD3+CD4+IL-4+	T - Helferzellen Typ 2
CD3+CD4+IL-17+	T - Helferzellen Typ 17
CD3+CD4+TNF- α +	TNF- α positive T-Helferzellen

Tabelle 11: In der Zytokinfärbung durch Oberflächenmarker definierte Zellgruppen

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll von BD Bioscience zur Bestimmung der T-Helfer-Zellen Typ 1, Typ 2 und Typ 17, der T-Zellen und Monozyten. Außerdem wurden jeweils die Zytokine auf den bereits genannten sowie allen lebenden Zellen untersucht.

Nach dem Auftauen der Proben wurde die errechnete Menge X, also ca. eine Million Zellen, in das FACS-Röhrchen pipettiert und mit dem Zellkulturmedium auf insgesamt 1000 μ l aufgefüllt. Nun wurden zu den Proben jeweils 1 μ l Brefeldin A zur Blockierung des intrazellulären Proteintransports, sowie PMA und Ionomycin zur Zellstimulation hinzugegeben und die Proben vier Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde 1 μ l Monensin hinzugegeben, welches ebenfalls die intrazellulären Transportprozesse unterbricht und somit zur Akkumulation von Zytokinen in der Zelle führt. Innerhalb der Inkubationszeiten wurden die übrigen drei Oberflächenfärbungen vorgenommen.

Nach insgesamt sechs Stunden wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen und mit jeweils 2 ml PBS-Waschpuffer versetzt und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden 10 μ l AB Serum als FC-Block zu den Proben gegeben und diese 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Oberflächenfärbung, indem jeweils 1,25 μ l CD4 + PerCp, CD 14 + APC-Cy7 und

CD 3 + Pacific Blue hinzugegeben wurden. Zur Bestimmung der Menge der Antikörper wurden im Vorversuch verschiedene Konzentrationen getestet und die Menge auf ein Viertel der vom Hersteller angegebenen reduziert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurden zum Waschen 2 ml PBS-Waschpuffer zugegeben und die Proben 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen permeabilisiert, um die Färbung der intrazellulären Strukturen zu ermöglichen. Hierfür wurden 250 µl Fixation/Permstabilisations-Lösung (BD Bioscience) hinzugegeben und die Proben 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Permeabilisierung der Zellen wurden die Probenröhrchen zum Mischen lediglich geschwenkt, um einer Zelllyse vorzubeugen. Zum Waschen wurden nun 1000 µl Perm/Wash Buffer verwendet und die Proben im Anschluss für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs wurden erneut 10 µl AB Serum zugegeben, diesmal um die intrazellulären unspezifischen Bindungen der Färbeantikörper zu verhindern, und 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Ein weiteres FACS-Röhrchen wurde für die Isotypkontrolle vorbereitet. Diese dient als Negativkontrolle, da die Isotyp-Kontrollantikörper an unspezifische Antigene binden und somit vom Ergebnis subtrahiert werden können. Es wurde jeweils ein Anteil aus jedem Probenröhrchen ins Iso-Röhrchen gefüllt und gegebenenfalls mit PBS ergänzt, sodass die Menge im Iso-Röhrchen ungefähr der Menge der Probenröhrchen entsprach. Dieses wurde nun mit den Isotyp-Kontroll-AK für FITC, PE, PE-Cy7 und APC versetzt.

Im Anschluss wurden jeweils 1,25 µl Antikörper INF γ + FITC für die Identifizierung der Th1-Zellen, IL17 + PE für die Th17 Zellen, TNF- α + PE-Cy7 für die Monozyten und IL4 + APC für die Th2-Zellen in die Probenröhrchen gegeben, gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit jeweils 1 ml Perm/Wash Buffer und Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 g. Im Anschluss konnte am FACS-Gerät mit 1.000.000 Events gemessen werden.

(b) FoxP3-Färbung

In Tabelle 12 sind die für das FoxP3-Färberegime verwendeten Oberflächenmarker und die detektierten Zellgruppen aufgelistet. Der für die Zellgruppe charakteristische Marker ist jeweils hervorgehoben.

Die in der FoxP3 Färbung durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen

Oberflächenmarker	Zellgruppe
CD3+	T-Lymphozyten
CD3+ CD8+	Zytotoxische T-Lymphozyten
CD3+ CD4+	T-Helferzellen
CD3+ CD4+CD25+	Aktivierte T-Helferzellen
CD3+CD4+CD25+ CD127low	Regulatorische T-Lymphozyten (Treg)
CD3+CD4+CD25+ FoxP3+	FoxP3-positive Treg
CD3+CD4+CD25+CD127low CD45RA-	Memory Treg
CD3+CD4+CD25+CD127low CD45RA+	Naive Treg
CD3+CD4+CD25+CD127low CCR4+	Memory Treg
CD3+CD4+CD25+CD127low CCR4-	Naive Treg
CD3+CD4+ CD45RA+CCR4-	Naive Treg
CD3+CD4+ CD45RA-CCR4+	Memory Treg

Tabelle 12: In der FoxP3-Färbung durch Oberflächenmarker definierte Zellgruppen

Das Färbeprotokoll erfolgte nach der Anleitung von eBioscience. Nach dem Auftauen der Proben wurde die errechnete Menge X in Probenröhrchen pipettiert und mit Waschpuffer auf 100 µl aufgefüllt. Nun wurden jeweils 10 µl AB Serum hinzugegeben und die Proben damit 10 Minuten inkubiert. Danach wurden jeweils 1,25 µl aller Färbeantikörper hinzugegeben: CD 8 + FITC, CD25 + PE, CD4 + PerCp, CD127 + PE-Cy7, CD3 + Pacific Blue, CCR4 (= CD194) + BV510. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden 2 ml PBS mit 1 % FBS hinzugegeben und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert, bevor jeweils 500 µl Permeabilisationslösung zugegeben und gemischt wurden. Nach einer halbstündigen Inkubation wurden jeweils 1 ml Permeabilisationspuffer hinzugegeben und die Proben 5 min bei 500 g zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden 10 µl AB Serum als FC-Block zugegeben und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Auch in diesem Färbeprotokoll erfolgte eine Isotypkontrolle. Die Iso-Röhrchen und Proben wurden anschließend nach den Färbeschritten mit PBS + 1 % FBS auf 100 µl

aufgefüllt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nun wurden jeweils 2 ml Permeabilisationspuffer hinzugegeben und die Röhrchen 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs gab man 60 µl PBS-Waschpuffer hinzu, um eine Schädigung der Zellen durch den Permeabilisationspuffer zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben im FACS mit 1.000.000 Events gemessen.

(c) Immunstatus

In Tabelle 13 sind die für den Immunstatus verwendeten Oberflächenmarker und die mithilfe des Färbeprotokolls ermittelten Zellgruppen aufgeführt. Der für die Zellgruppe charakteristische Marker ist hervorgehoben.

Die im Immunstatus durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen

Oberflächenmarker	Zellgruppe
CD3+	T-Lymphozyten
CD19+	B-Lymphozyten
CD4+CD3+	T-Helferzellen
CD16+CD56+	Natürliche Killerzellen
CD14+CD16+	Monozyten gesamt
CD14++CD16-	Klassische Monozyten
CD14++CD16+	Intermediäre Monozyten
CD14+CD16++	Nicht-klassische Monozyten
CD3+CHRNA7+	AChRalpha-7 auf T-Lymphozyten
CD19+CHRNA7+	AChRalpha-7 auf B-Lymphozyten
CD4+CD3+ CHRNA7+	AChRalpha-7 auf T-Helferzellen
CD14+CD16+CHRNA7+	AChRalpha-7 auf Monozyten
CD16+CD56+CHRNA7+	AChRalpha-7 auf NK-Zellen

Tabelle 13: Im Immunstatus durch Oberflächenmarker definierte Zellgruppen

Nach dem Auftauen wurde die errechnete Menge X , also ca. 5×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und mit Waschpuffer auf 100 μl aufgefüllt. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben mit 10 μl AB Serum versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anders als bei den übrigen Oberflächenfärbungen ist der Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ Antikörper noch ungekoppelt, sodass er in einem weiteren Arbeitsschritt an ein Sekundärantikörper gebunden werden musste, der den Fluoreszenzfarbstoff trägt. Die nAChR $\alpha 7$ Antikörper- und Isotyp-Suspensionen wurden erstellt, die im Anschluss zum Einsatz kamen. Der Isotyp wurde auf die bereits zuvor erläuterte Methode erstellt, mit Waschpuffer auf 100 μl aufgefüllt und mit 1 μl nAChR $\alpha 7$ Isotyp-Suspension versetzt. Analog dazu wurden die Probenröhrchen mit 10 μl nAChR $\alpha 7$ Antikörper-Suspension versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nun wurden die Proben mit 2ml Waschpuffer versetzt und dann für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und gemischt. Zur Fluoreszenzmarkierung des nAChR $\alpha 7$ Antikörpers und Isotyps wurde nun 1 μl des Sekundär-Antikörpers hinzugegeben. Im Anschluss wurden nun jeweils 1,25 μl des CD16 + PE Antikörpers zur Bestimmung von Monozyten und NK-Zellen, CD4 + PE-Cy7 zum Auffinden von Th-Zellen, CD56 + APC für die NK-Zellen, CD14 + APC-Cy7 für die Monozyten, CD3 + Pacific Blue für Lymphozyten und CD19 + BV510 für B-Zellen zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nun wurden die Zellen mit 2 ml Waschpuffer befüllt und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Nun wurden jeweils 2,5 μl 7AAD + PerCP hinzugegeben und die Proben erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnten die Proben im FACS mit 500.000 Events gemessen werden.

(d) DC-Färbung

Die für die DC-Färbung verwendeten Oberflächenmarker und die mithilfe dieser bestimmten Zellgruppen sind in Tabelle 14 aufgelistet. Der für die Zellgruppe jeweils charakteristische Marker ist hervorgehoben.

Die in der DC-Färbung durch Oberflächenmarker definierten Zellgruppen

Oberflächenmarker	Zellgruppe
CD14+	Monozyten gesamt
CD19+	B-Lymphozyten
CD304+CD11c low	plasmazytoide dendritische Zellen (pDC)
CD304+CD1c low CD86+	Aktivierte pDC
CD304+CD1c low CD86-	Nicht-aktivierte pDC
CD1c+CD11c+	myeloide dendritische Zellen Typ 1 (mDC1)
CD1c+CD11c+ CD86+	aktivierte mDC1
CD1c+CD11c+ CD86-	Nicht-aktivierte mDC1
CD141+CD11c+	myeloide dendritische Zellen Typ 2 (mDC2)
CD141+CD11c+ CD86+	aktivierte mDC2
CD141+CD11c+ CD86-	Nicht-aktivierte mDC2

Tabelle 14: In der DC-Färbung durch Oberflächenmarker definierte Zellgruppen

Nach dem Auftauen wurde die errechnete Menge X, also ca. eine Million Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und mit Waschpuffer auf 100 µl aufgefüllt. Zum Waschen wurden die Proben mit 2 ml Waschpuffer versetzt und dann für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Zur Färbung der Oberflächenantikörper wurden nun jeweils 1,25 µl CD304 + FITC zur Bestimmung der pDCs, CD1c + PE zur Bestimmung der mDC1-Zellen, CD141 + PE-Cy7 für die mDC2-Zellen, CD11c + APC zur Differenzierung zwischen mDCs und pDCs, CD14 + APC-Cy7 für die Monozyten und CD19 + BV510 zur Bestimmung der B-Zellen hinzugegeben. Es erfolgte eine Isotypkontrolle. Nun wurde das Probenröhrchen mit 1,25 µl CD86 versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Waschpuffer hinzugegeben und die Zellen für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Marker 7AAD färbt die intrazellulär gelegene DNA von Zellen an und dient somit zur Detektion von apoptotischen Zellen. Er wurde erst 5 Minuten vor der FACS-Messung hinzugegeben mit einer Menge von jeweils 2,5 µl. Nachdem die Proben 5 Minuten bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert worden waren, konnten die Proben im FACS mit 1.000.000 Events gemessen werden.

3.2.8 Statistische Auswertung mit Sensitivitätsanalyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 22.0 (IBM SPSS 22.0, Armonk, NY, USA). Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA, engl. *Analysis Of Variance*) wurde genutzt, um die Abhängigkeiten in den Daten angemessen modellieren zu können. Geprüft wurde mit dem allgemeinen linearen Modell (GLM, engl. *General Linear Model*), ob eine Interaktion zwischen der Stress- und Kontrollgruppe in deren Entwicklung über den gesamten Beobachtungszeitraum bestand. Untersucht wurden zudem der jeweilige Verlauf der Stress- und Kontrollgruppe, mit dem Zeitpunkt als Wiederholungsfaktor (engl. *within*) einerseits, sowie der Unterschied zu den Messzeitpunkten im paarweisen Vergleich der Gruppen untereinander mit der Gruppe als Zwischensubjektfaktor (engl. *between*) andererseits. Eine statistische Evidenz wurde bei Irrtumswahrscheinlichkeiten ab Werten $p < 0,05$ angenommen.

Somit wurden drei Nullhypothesen formuliert:

1. Es besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf die Veränderung über den Gesamtzeitraum der Messung (Interaktion)
2. Es besteht kein Unterschied innerhalb der jeweiligen Gruppe im Verlauf über die Zeit zwischen den drei Messzeitpunkten T1, T2 und T3 (within)
3. Es besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen untereinander zum jeweiligen Zeitpunkt T1, T2 und T3 (between)

Zur Prüfung der Testvoraussetzungen wurden Residuen im Varianzkomponentenmodell mit der Prozedur des gemischten linearen Modells (LMM, engl. *Linear Mixed Model*) erzeugt. Im Anschluss wurden die Residuen auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und auf Varianzhomogenität mittels Levene-Tests geprüft.

Vor Berechnung der Statistik wurden zunächst extreme Ausreißer mithilfe der berechneten Boxplots detektiert. War nur ein Wert von drei Messzeitpunkten auffällig, wurden auch die Daten der übrigen Zeitpunkte zur Sensitivitätsanalyse herausgenommen. Die CD45RA negativen regulatorischen T-Zellen zeigten als extreme Ausreißer die beiden der Stressgruppe zugehörigen Probennummern 37 und 38. Die Ergebnisse der Berechnungen der p-Werte erwiesen sich stabil nach Herausnahme der beiden Werte, sodass nach dieser Sensitivitätsanalyse die Ursprungsdaten genutzt werden konnten.

Bei der Untersuchung der nichtaktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen fielen drei Ausreißer auf. Bei Berechnung der Daten unter Herausnahme von Probennummern 10 und 14 der Kontrollgruppe und Probennummer 38 der Stressgruppe wurde der Verlauf zwischen Zeitpunkt 2 und 3 für beide Gruppen signifikant. Die Entwicklung der Gruppen über die Zeit erfuhr keine Änderung, sodass auch für diese Variable die Ursprungsdaten zur Analyse verwendet wurden.

Der entscheidende Qualitätstest war, wie bereits erwähnt, der Test auf Normalverteilung der Residuen auf Basis des gemischten linearen Modells. Besonderes Augenmerk wurde aufgrund der Größe der Stichprobe insbesondere dem Kolmogorov-Smirnov Test zugewandt. Bei Signifikanz dieses Testes $p < 0,05$ wurden unterschiedliche Transformationsverfahren wie Logarithmieren, die Quadratwurzel ziehen oder Quadrieren genutzt.

Eine Transformation wurde vorgenommen bei den Monozyten, den FoxP3 positiven T-regulatorischen Zellen, den CD45RA negativen T-regulatorischen Memory Lymphozyten und den CD45RA positiven naiven T-regulatorischen Lymphozyten, den Acetylcholinrezeptoren auf allen untersuchten Zellen, den intermediären und nicht-klassischen Monozyten, den plasmazytoiden, aktivierten und nichtaktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen, den aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 1, sowie den aktivierten myeloiden und nicht-aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 2, den Interleukin-4 positiven lebenden Zellen, den Interleukin-17 positiven lebenden Zellen, den Interleukin-4 positiven T- und T-Helferzellen und zuletzt den Interferon-gamma positiven lebenden T-Helferzellen.

Die nach Transformation ermittelten p-Werte zeigten keine Änderung der Signifikanz, sodass diese in den Ergebnisteil eingingen, da die Normalverteilungsannahme bestätigt wurde. Da es sich um prozentuale und keine absoluten Werte handelte, wurden die Graphiken mithilfe der untransformierten Ursprungsdaten berechnet, um die direkte Vergleichbarkeit der Zellgruppen untereinander und deren Verteilungsverhältnisse im Blut beizubehalten.

Die Transformation der Monozyten, der CD45RA positiven naiven T-regulatorischen Lymphozyten, der Acetylcholinrezeptoren auf allen untersuchten Zellen, der intermediären und nicht-klassischen Monozyten, der gesamten plasmazytoiden und aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen, der aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 und der Interleukin-4 positiven T-Helferzellen mittels Logarithmieren war erfolgreich. Die Residuen zeigten sich normalverteilt und der Kolmogorov-Smirnov Test war nicht mehr signifikant, sodass die transformierten Daten in die Auswertung eingingen.

Nach Transformation der FoxP3 positiven T-regulatorischen Zellen zeigten sich die Residuen annähernd normalverteilt, sodass beschlossen wurde, die logarithmierten Werte dieser Variable ebenfalls in die Auswertung aufzunehmen.

War die gewünschte Normalverteilung der Residuen unter Transformation noch immer nicht gegeben, wurden als weitere Sensitivitätsanalyse die Berechnungen unter Herausnahme einzelner Ausreißer-Werte durchgeführt. Als Ausreißer wurden Werte definiert, die größer oder kleiner als das Dreifache der Standardabweichung waren.

Dies war der Fall für die CD45RA negativen T-regulatorischen Memory Lymphozyten, den nichtaktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen, den aktivierten myeloiden und nicht-aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 2, den Interleukin-4 positiven lebenden Zellen, den Interleukin-17 positiven lebenden Zellen, den Interleukin-4 positiven lebenden T- und T-Helferzellen und den Interferon-gamma positiven lebenden T-Helferzellen.

Die Ergebnisse der Berechnungen der p-Werte der Entwicklung der Gruppen über die Zeit erwiesen sich durchweg stabil nach Herausnahme der Ausreißer, obwohl vereinzelt die Werte der paarweisen Vergleiche einiger Variablen signifikant wurden. Deshalb

konnten für die CD45RA negativen T-regulatorischen Memory Lymphozyten, den nichtaktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen, den Interleukin-17 positiven lebenden Zellen und den Interferon-gamma positiven lebenden T-Helferzellen die Ursprungsdaten genutzt werden, da weder die Herausnahme der Ausreißer noch eine Transformation zielführend war und die Qualitätstests signifikant blieben. Die Ausreißer wurden als zufällige Abweichung gewertet oder als Ursache der insbesondere in der vierten Färbung gering ausgefallenen Zellzahl angesehen.

In dem Fall, dass die Normalverteilung der Residuen annähernd gegeben war, beziehungsweise die Störung der Normalverteilung der Residuen nicht erheblich war, ohne dass die Herausnahme der Ausreißer eine Änderung der Signifikanz erbrachte, wurden die p-Werte, die sich aus der Transformation ergaben für die Auswertung gebraucht. Demzufolge flossen die p-Werte der logarithmierten Daten der Interleukin-4 positiven lebenden Zellen und der Interleukin-4 positiven T-Zellen in die Auswertung ein. Die aktivierten und nicht-aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 nehmen eine Sonderrolle ein, da eine Transformation durch Logarithmieren nicht zielführend war, andere Mechanismen jedoch zu einer Annäherung an eine Normalverteilung der Residuen führte. Die aktivierten myeloiden DC Typ 2 wurden demnach mittels Quadratwurzel berechnet, die nichtaktivierten DC Typ 2 mittels Quadrierens, wobei die Ergebnisse unter Vorbehalt präsentiert werden, da die Normalverteilung der Residuen nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte.

4 ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studie präsentiert. Zur Übersichtlichkeit werden lediglich deutliche Tendenzen sowie signifikante Ergebnisse besprochen, die Darstellung aller weiteren Ergebnisse erfolgt in Tabellenform.

4.1 Detektion proinflammatorischer Immunzellen und deren Zytokine unter Stress bei Medizinstudentinnen

4.1.1 Gesamtzahl der Monozyten, deren proinflammatorischen Untergruppen und das zugehörige Zytokin TNF- α unter Examensstress

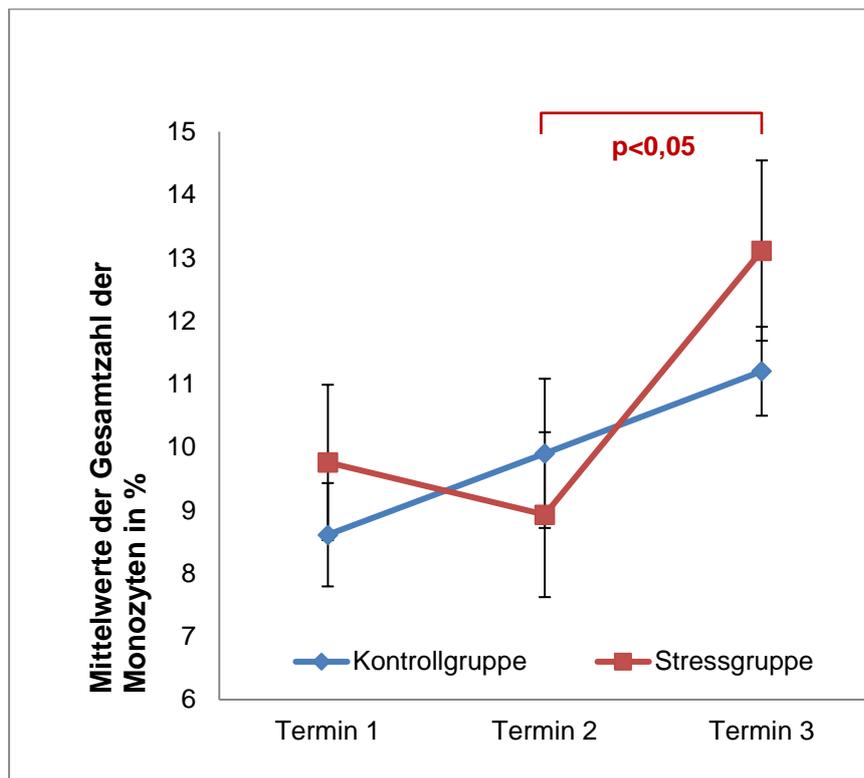


Abbildung 3: Gesamtzahl der Monozyten (CD14+CD16+) in % zu den jeweiligen Terminen

Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Monozyten. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Balken oberhalb (rot) markiert die Signifikanz der Stressgruppe im Verlauf zwischen T2 und T3. Alle durch CD14 und CD16 markierten Monozyten der Stressgruppe zeigten einen signifikanten Anstieg zwischen Termin 2

und Termin 3 ($p=0,005$). Zeitgleich ist der Verlauf der Kontrollgruppe nicht signifikant. Es ergab sich also insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Stressgruppe, aber eine interessante Entwicklung der Stressgruppe in der Erholungsphase nach dem Examen.

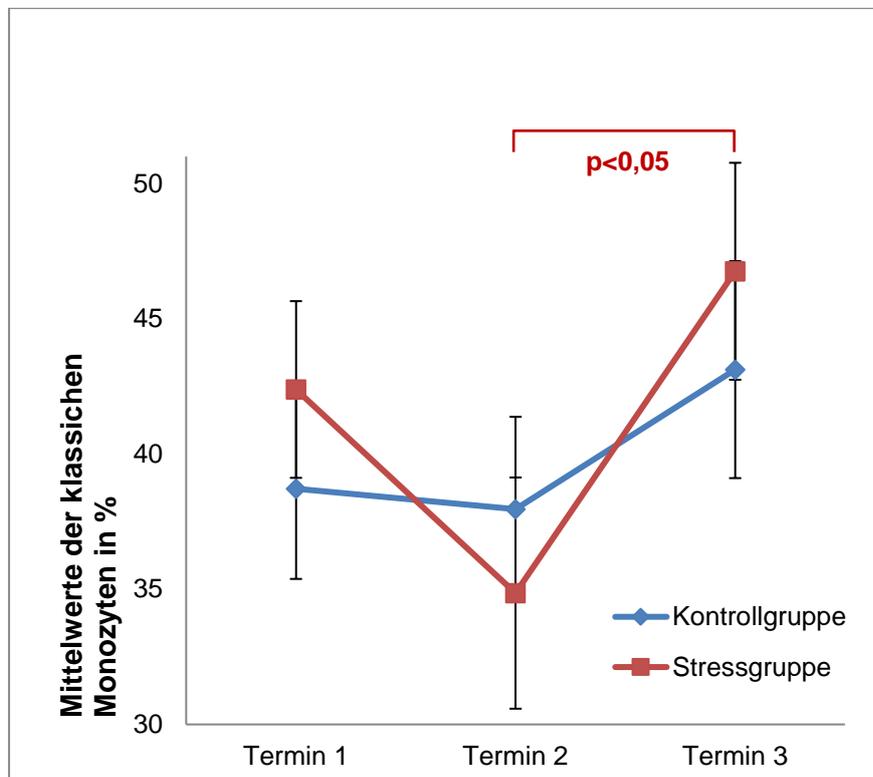


Abbildung 4: klassische Monozyten (CD14++CD16-) in % zu den jeweiligen Terminen

In Abbildung 4 sind die Werte der CD14-hochpositiven und CD16-negativen klassischen Monozyten als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Balken oberhalb (rot) markiert die Signifikanz der Stressgruppe im Verlauf zwischen T2 und T3. Es ist also nachvollziehbar, wie die Hauptvertreter der Monozyten einen signifikanten Anstieg in der Erholungsphase der 12 Wochen nach dem Hammerexamen zeigt ($p=0,007$). Die Kontrollgruppe wird nicht signifikant im Verlauf. Zu den drei Zeitpunkten zeigten die Gruppen zwar deutliche Differenzen, diese waren jedoch zu keinem Messzeitpunkt signifikant.

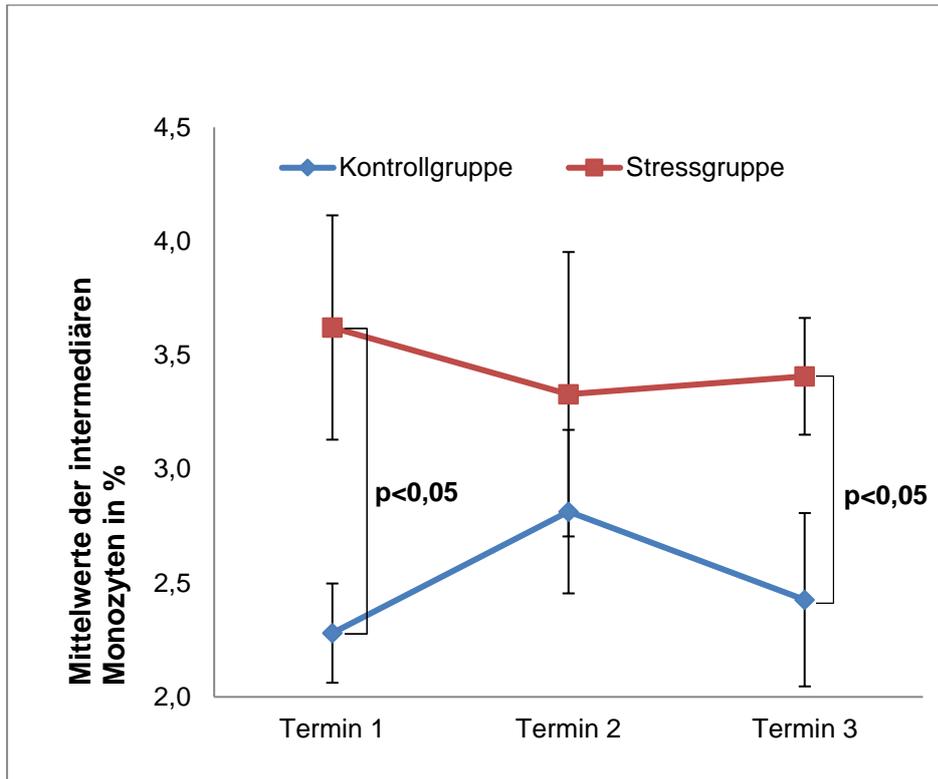


Abbildung 5: Intermediäre Monozyten (CD14++CD16+) in % zu den jeweiligen Terminen

Abbildung 5 bildet den Verlauf der CD14-hochpositiven und CD16-normal positiven und somit reiferen intermediären Monozyten ab. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die Balken (schwarz) zu Termin 1 und 2 markieren die Signifikanz zwischen den Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt. Somit zeigten die intermediären Monozyten der Stressgruppe signifikant höhere Mittelwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe am Termin 1 ($p=0,036$) und Termin 3 ($p=0,026$), wurden also 12 Wochen vor und 12 Wochen nach dem Examen vermehrt exprimiert.

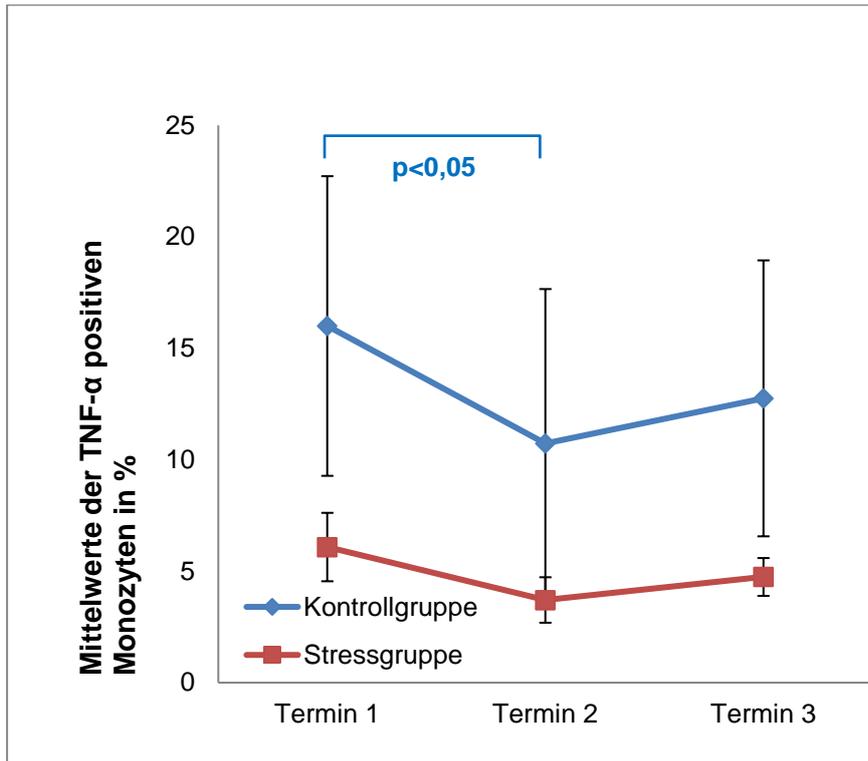


Abbildung 6: TNF- α positive Monozyten (CD14+TNF α +) in % zu den jeweiligen Terminen.

Die Werte der TNF- α positiven Monozyten sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt (Abbildung 6). Der Balken oberhalb (blau) markiert die Signifikanz der Kontrollgruppe im Verlauf zwischen T1 und T2. Der Unterschied zwischen Stress- und Kontrollgruppe ist zwar an den unterschiedlichen Messtagen deutlich erkennbar, jedoch wurde dieser zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die Kontrollgruppe wurde im Verlauf zwischen T1 und T2 signifikant ($p=0,026$).

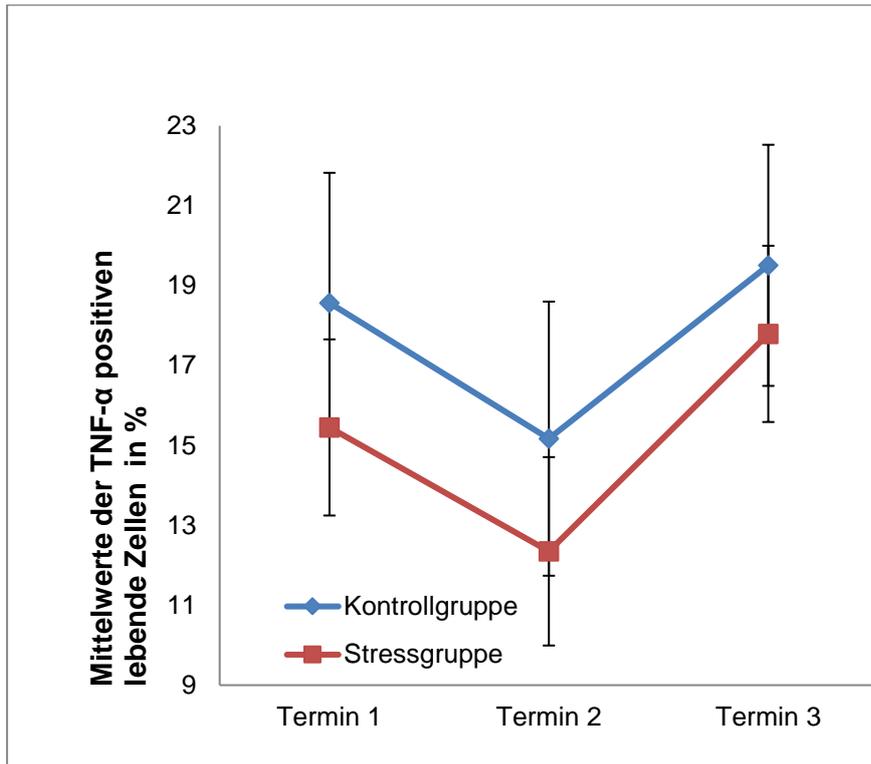


Abbildung 7: TNF- α positive lebende Zellen (TNF- α +) in % zu den jeweiligen Terminen

Betrachtet man die Unterschiede der Stress- und Kontrollgruppe der TNF- α positiven lebenden Zellen zu den einzelnen Messzeitpunkten, weisen diese zwar Differenzen auf, dieser Unterschied ist jedoch im paarweisen Vergleich zu keinem Messzeitpunkt signifikant. Auch der Verlauf der Kurven wird nicht signifikant, wie man in Abbildung 7 (die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt) nachvollziehen kann.

4.1.2 Entwicklung der Natürlichen Killerzellen über die Zeit

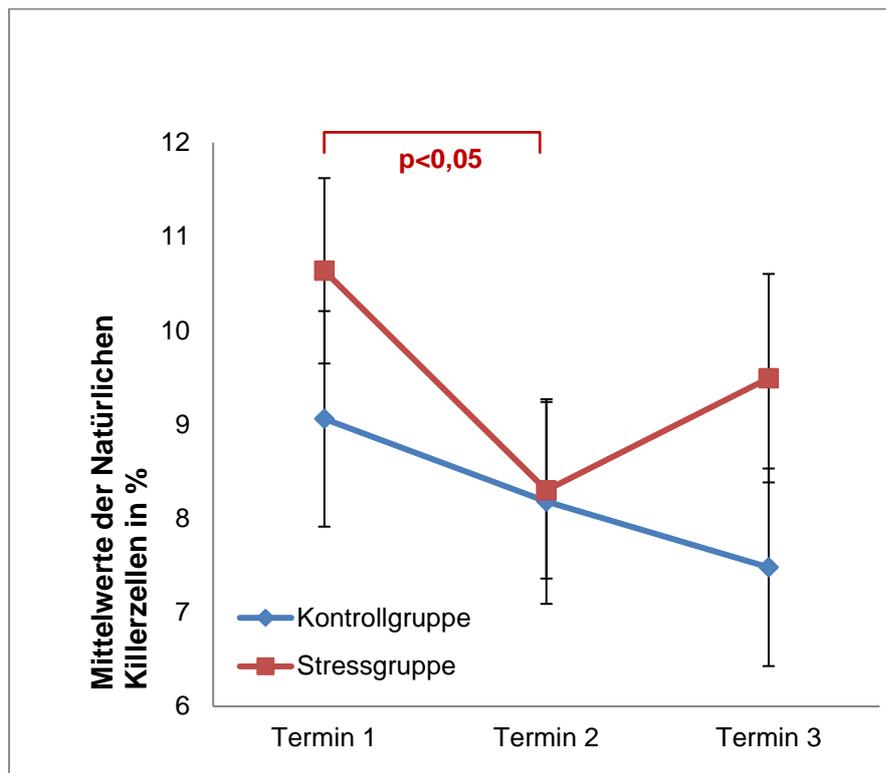


Abbildung 8: Natürliche Killerzellen (CD16+CD56+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Mittelwerte mit Standardabweichung der apoptotisch wirksamen, CD16- und CD56-positiven Natürlichen Killerzellen sind in Abbildung 8 dargestellt. Der Balken oberhalb (rot) markiert die Signifikanz der Stressgruppe im Verlauf zwischen T1 und T2. Diese Zellen zeigen einen signifikanten Verlauf innerhalb der dreimonatigen Lernphase vor dem Examen ($p=0,035$). Die Stressgruppe fällt deutlich ab, während die Kontrollgruppe keine signifikante Entwicklung vollzieht.

4.1.3 T-Lymphozyten unter Examensstress und die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α auf T-Lymphozyten und lebenden Zellen

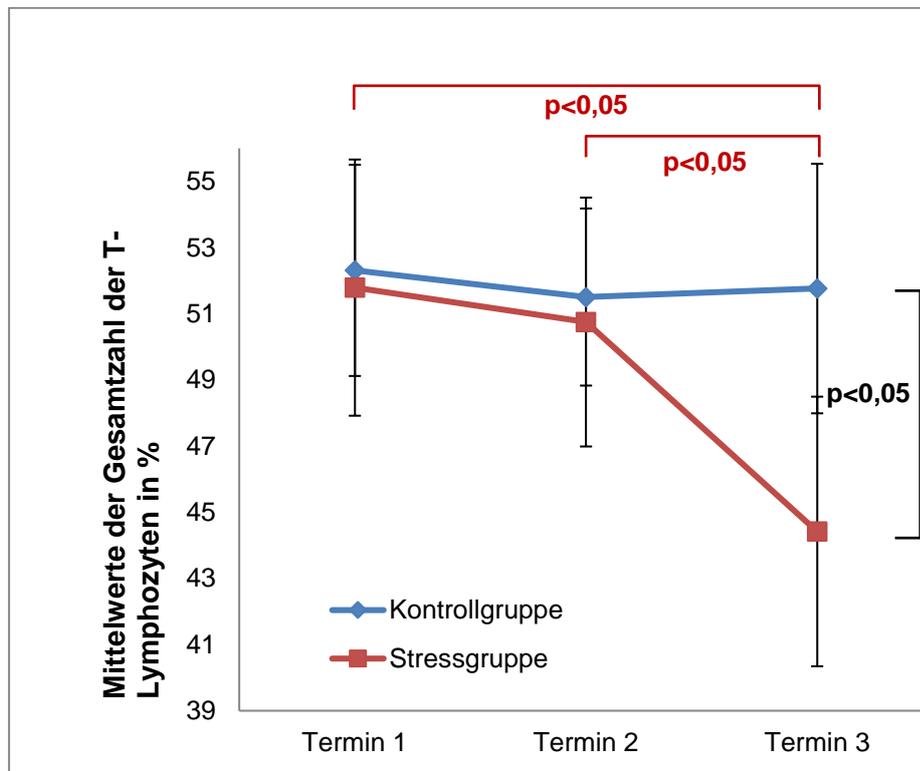


Abbildung 9: Gesamtzahl der T-Lymphozyten (CD3+) in % zu den jeweiligen Terminen

Um zunächst einen generellen Eindruck in die Entwicklung der T-Zell-Populationen zu gewinnen, wurde der Pan-Lymphozytenmarker CD3 als größter Vertreter der erworbenen Immunität ausgewertet. In Abbildung 9 sind die Werte der Stress- und Kontrollgruppe als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Balken oberhalb (rot) markieren die Signifikanz der Stressgruppe im Verlauf zwischen T1 und T3 sowie T2 und T3. Der Balken seitlich (schwarz) markiert die Signifikanz zwischen den Gruppen im Verlauf. In der Stressgruppe ergab sich bei der Messung der Gesamtzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten im Verlauf des Beobachtungszeitraumes ein signifikanter Abfall vom Messzeitpunkt T2, das heisst direkt nach der Examensprüfung, zu T3 in der Entspannungsphase nach der Prüfung ($p=0,01$). Dabei fällt insbesondere der Kurvenverlauf zwischen Termin 2 und 3 auf, der ebenfalls signifikant wird ($p=0,034$). Diese Entwicklung war in der Kontrollgruppe der Medizinstudentinnen nicht zu beobachten. Dabei entwickelten sich die Gruppen signifikant unterschiedlich über die Zeit ($p=0,05$ (0,04995)).

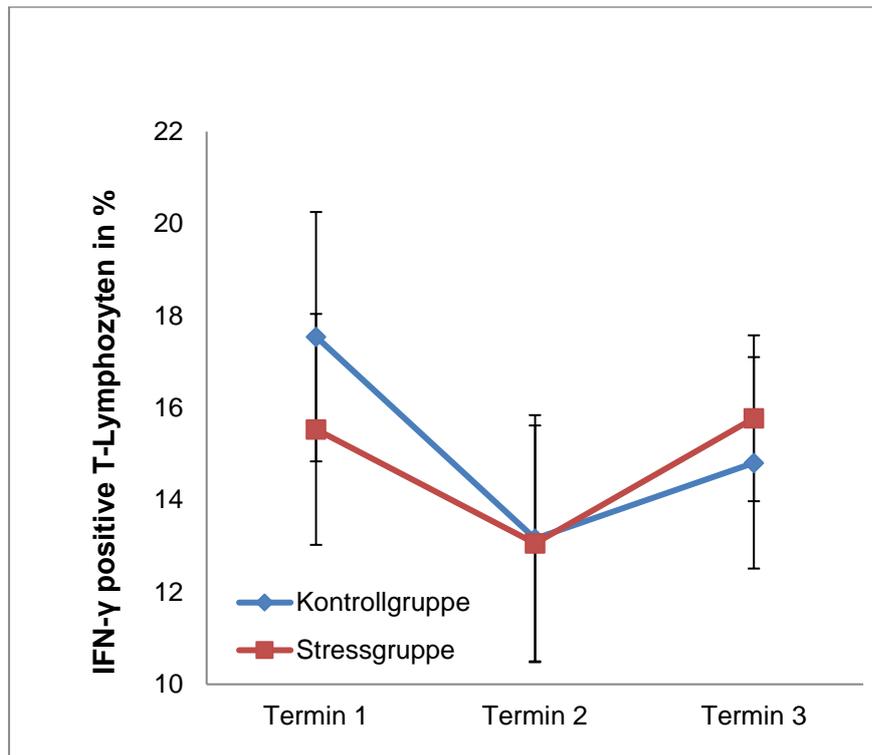


Abbildung 10: IFN- γ positive T-Lymphozyten (CD3+IFN- γ +) in % zu den jeweiligen Terminen

Wie in Abbildung 10 dargestellt, starteten die Mittelwerte der Kontroll- und Stressgruppe der IFN- γ positiven T-Lymphozyten mit jeweiliger Standardabweichung zum ersten Messzeitpunkt zwar auf einem unterschiedlichen Niveau, wurden jedoch im paarweisen Vergleich als nicht-signifikant ausgewiesen.

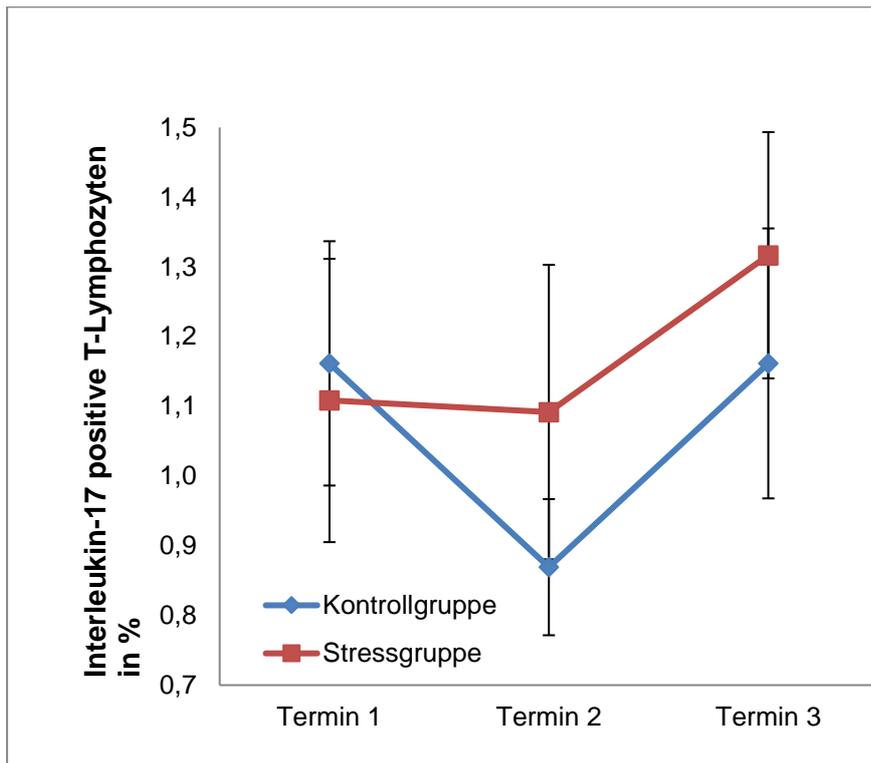


Abbildung 11: Interleukin-17 positive T-Lymphozyten (CD3+IL-17+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Unterschiede der Werte der Interleukin-17 positiven T-Lymphozyten der Stress- und Kontrollgruppe sind in Abbildung 11 gut nachvollziehbar. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Weder zwischen den Gruppen, noch innerhalb einer Gruppe im Verlauf zeigte sich eine signifikante Entwicklung.

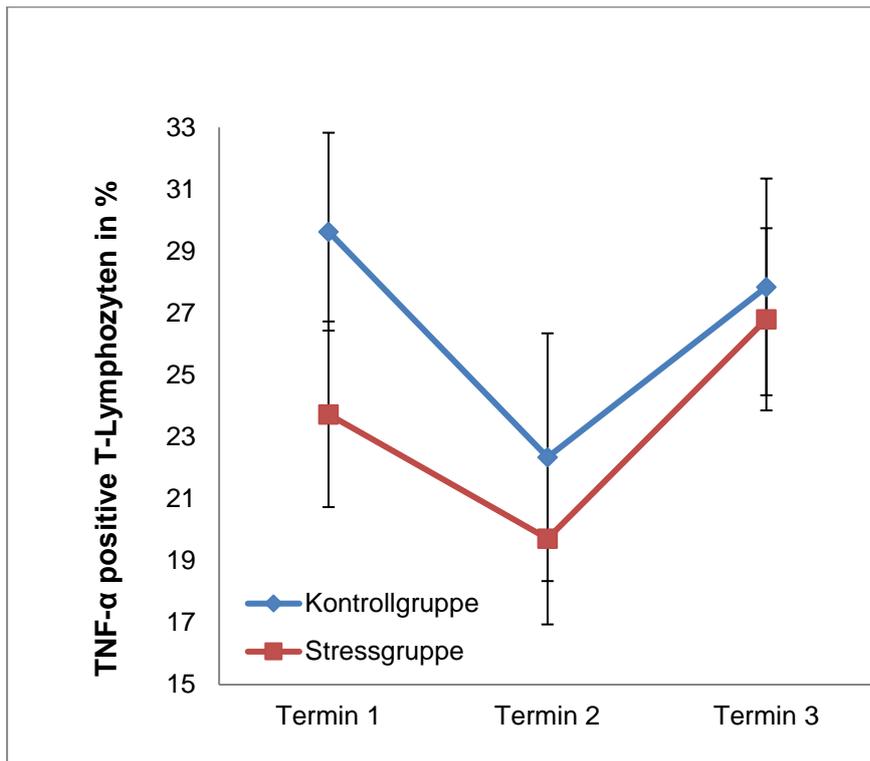


Abbildung 12: TNF- α positive T-Lymphozyten (CD3+TNF- α +) in % zu den Terminen

Die Stressgruppe der TNF- α positiven T-Lymphozyten wies zwar insbesondere zu Termin 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschiedliche Werte auf, bevor sich die Gruppen im Verlauf wieder nähern (Abbildung 12), jedoch wurde dieser ebenso wie der Verlauf innerhalb der Gruppen nicht signifikant. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

4.1.4 Entwicklung der zytotoxischen T-Lymphozyten unter Examensstress

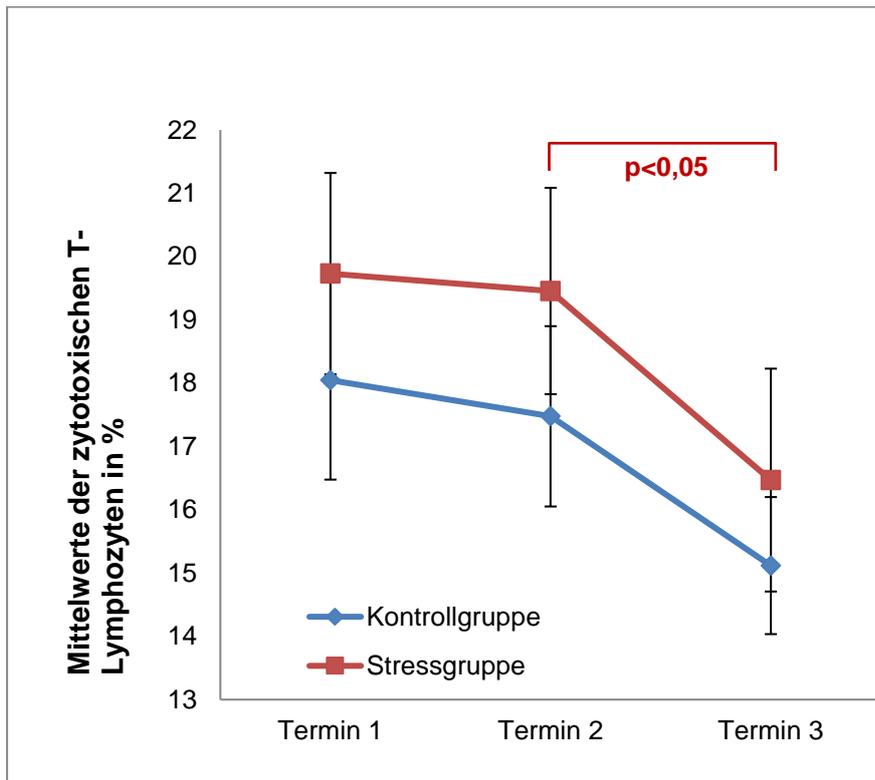


Abbildung 13: Zytotoxische T-Lymphozyten (CD3+CD8+) in % zu den jeweiligen Terminen

Bei der Detektion der zytotoxischen T-Lymphozyten, mit ihren spezifischen Markern CD3 und CD8, fiel ein signifikanter Kurvenverlauf in der Erholungsphase der 12 Wochen nach dem Examen auf (vgl. Abbildung 13, die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Balken oberhalb (rot) markiert die Signifikanz der Stressgruppe im Verlauf zwischen T2 und T3.). Die Vertreter der adaptiven Immunabwehr zeigen einen deutlichen Rückgang, während die Kontrollgruppe keine signifikante Entwicklung zeigte.

4.1.5 Detektion der T-Helferzellen mit deren Unterformen Typ 1 und Typ 17 sowie deren zugeordnete proinflammatorische Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α

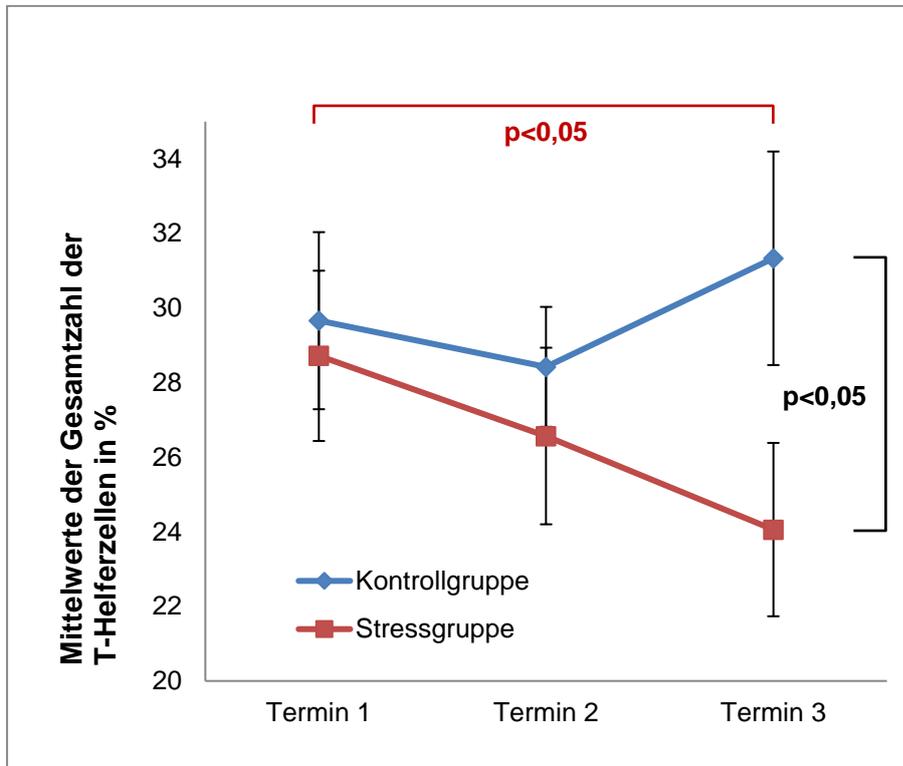


Abbildung 14: Gesamtzahl der T-Helferzellen (CD3+CD4+) in % zu den jeweiligen Terminen

Bei der Ermittlung der Gesamtzahl der CD3 und CD4 positiven T-Helferzellen konnte ein Rückgang der Zellgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg festgestellt werden, der statistisch signifikant wurde ($p=0,039$). Die Entwicklung war auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich ($p=0,034$), dabei zeigen sich besonders deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu Termin 3. Abbildung 14 zeigt die Werte der Stress- und Kontrollgruppe, die als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt sind. Der Balken oberhalb (rot) markiert die Signifikanz der Stressgruppe im Verlauf zwischen T1 und T3. Der Balken seitlich (schwarz) markiert die Signifikanz zwischen den Gruppen im Verlauf.

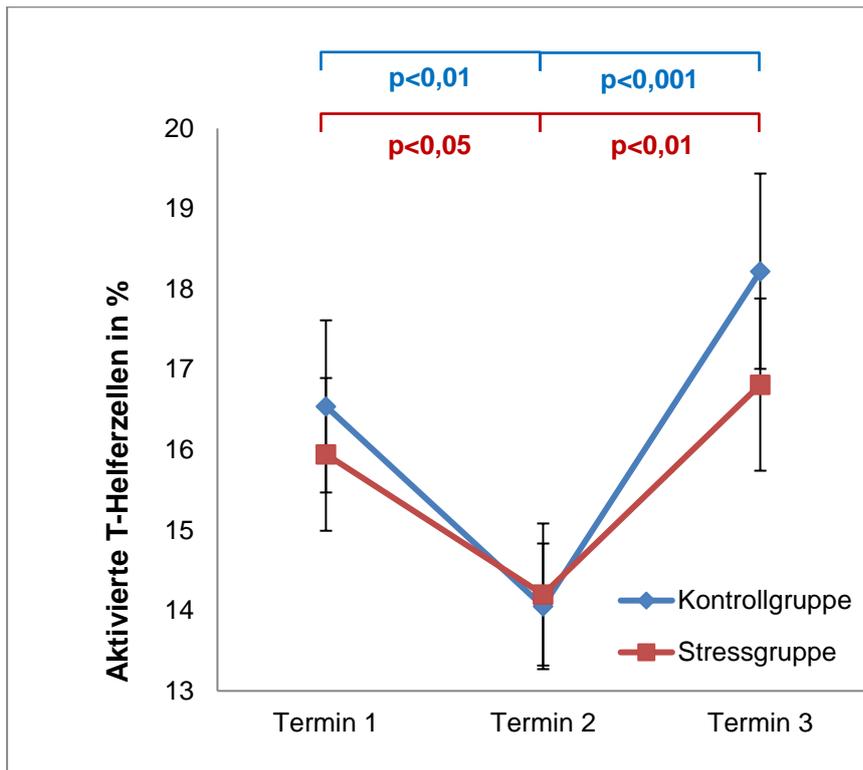


Abbildung 15: Aktivierte T-Helferzellen (CD3+CD4+CD25+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Entwicklung der Stress- in Bezug auf die Kontrollgruppe war insgesamt annähernd analog und wies keine signifikante Differenz auf, sondern näherten sich im Gegenteil zum Examen auf fast identische Werte an (vgl. Abbildung 15, die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die beiden roten Balken oberhalb markieren die signifikante Entwicklung der Stressgruppe und die beiden blauen Balken markieren die signifikante Entwicklung der Kontrollgruppe im Verlauf jeweils zwischen T1 und T2 und zwischen T2 und T3.). Der Werteabfall zwischen den ersten beiden Zeitpunkten war innerhalb der Stressgruppe signifikant ($p = 0,038$), der Werteanstieg zwischen Zeitpunkt 2 und 3 stark signifikant ($p=0,003$). Die Kontrollgruppe entwickelte sich ähnlich und wurde stark signifikant zwischen Zeitpunkt 1 und 2 ($p = 0,002$) und Zeitpunkt 2 und 3 ($p = 0,000$).

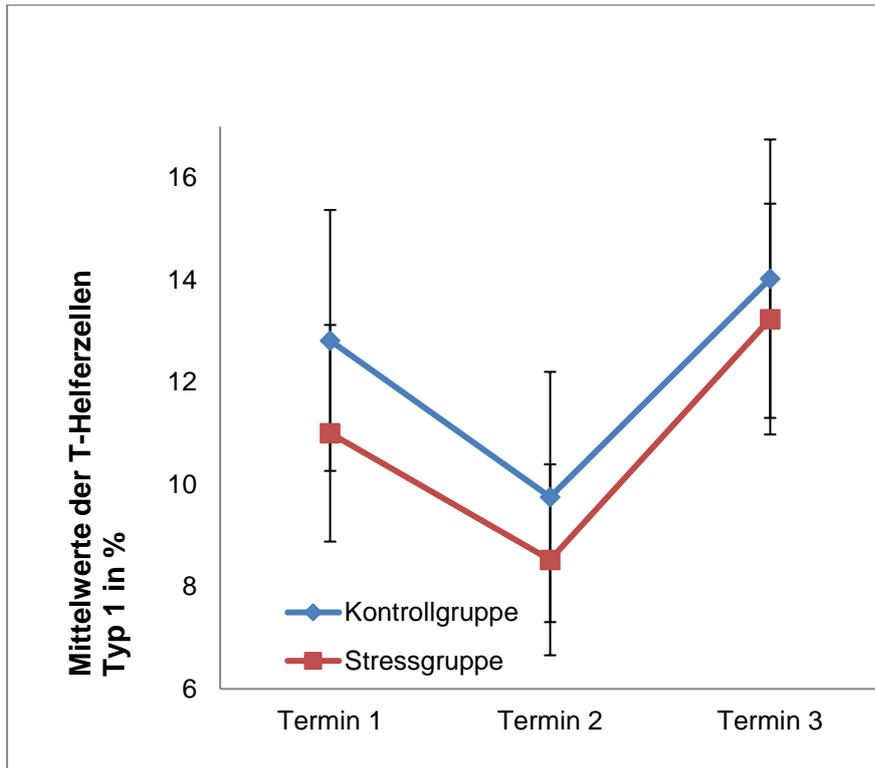


Abbildung 16: T-Helferzellen Typ 1 (CD3+CD4+IFN- γ +) in %

Die Interferon-gamma positiven T-Helferzellen Typ 1 zeigten, wie in Abbildung 16 nachvollziehbar über den Beobachtungszeitraum hinweg keinen signifikanten Verlauf oder Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

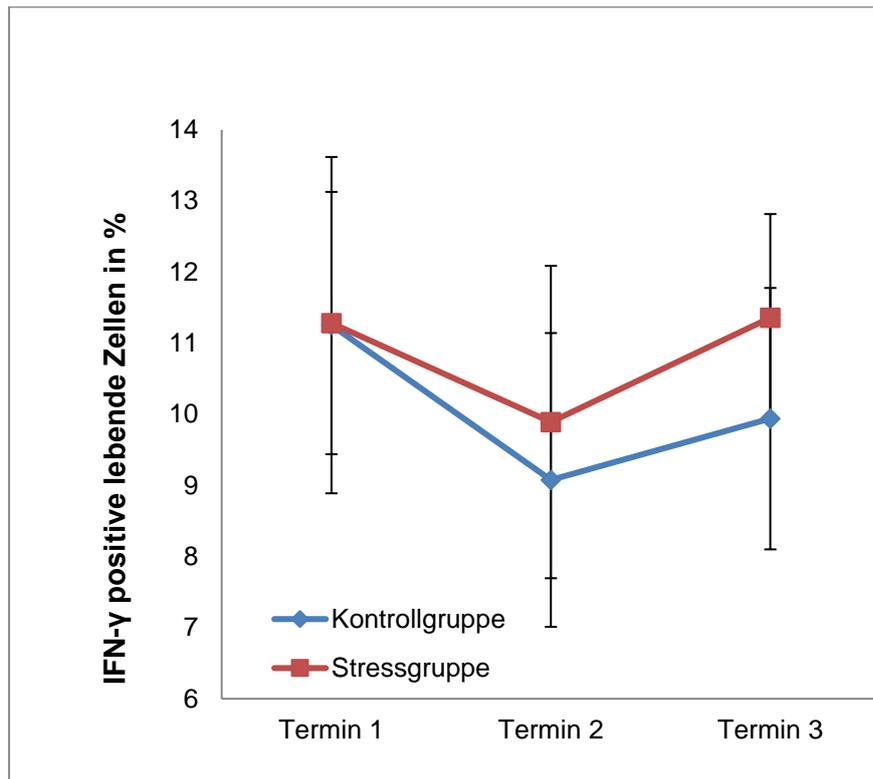


Abbildung 17: Die Mittelwerte mit Standardabweichung der IFN- γ positiven Zellen (IFN- γ +) in %

Die Stressgruppe der IFN- γ positiven lebenden Zellen wurde weder zwischen den Messzeitpunkten noch im Gesamtverlauf signifikant und war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 17).

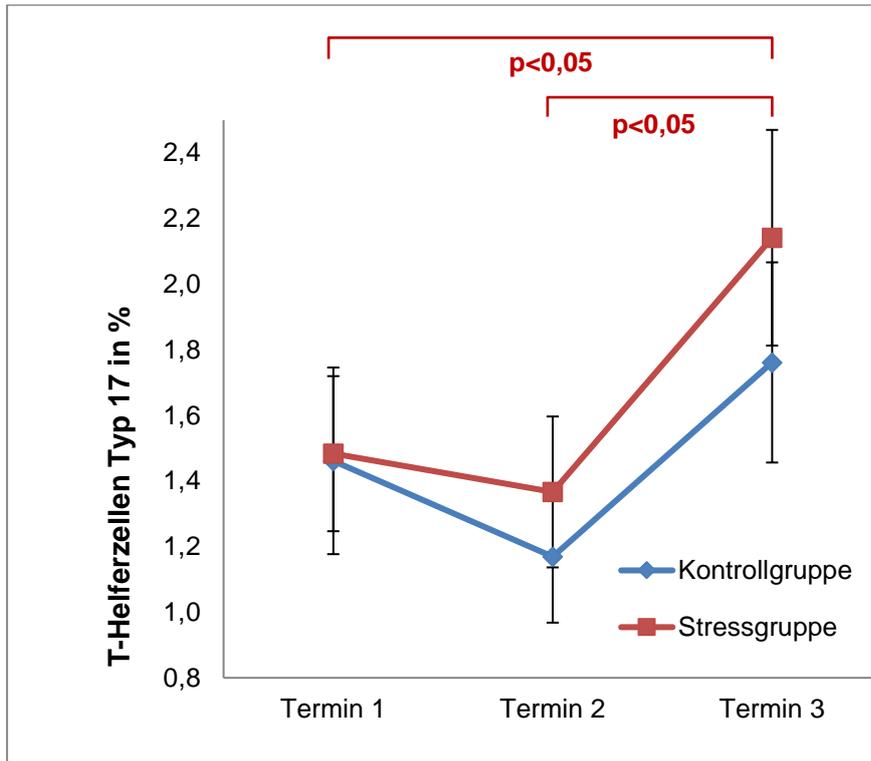


Abbildung 18: T-Helferzellen Typ 17 (CD3+CD4+IL-17+) in %

In Abbildung 18 kann man den deutlichen Anstieg der Interleukin-17 positiven T-Helferzellen Typ 17, insbesondere in der Erholungsphase nach dem Examen nachvollziehen. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die beiden Balken oberhalb (rot) markieren die signifikante Entwicklung der Stressgruppe im Verlauf jeweils zwischen T1 und T3 und zwischen T2 und T3. Der Verlauf der Stressgruppe zeigte signifikante Werte innerhalb zwischen Termin 2 und 3 ($p = 0,046$). Insgesamt war der Verlauf über die 24 Wochen hinweg ebenfalls signifikant ($p = 0,02$). Diese Entwicklung war in der Kontrollgruppe der Medizinstudentinnen nicht zu verzeichnen.

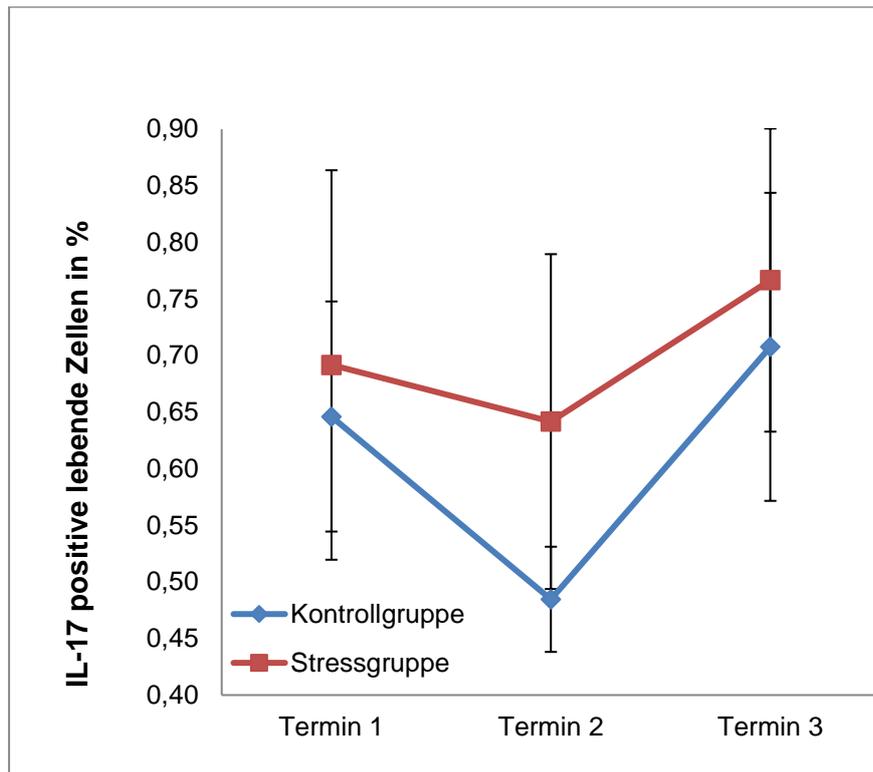


Abbildung 19: IL-17 positive Zellen (IL-17+) in % zu den jeweiligen Terminen

Wie in Abbildung 19 nachvollziehbar, zeigten die Gruppen einen ähnlichen Verlauf über den gesamten Messzeitraum. Weder zu den verschiedenen Zeitpunkten, noch innerhalb der Gruppen im Verlauf konnte eine Signifikanz festgestellt werden. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

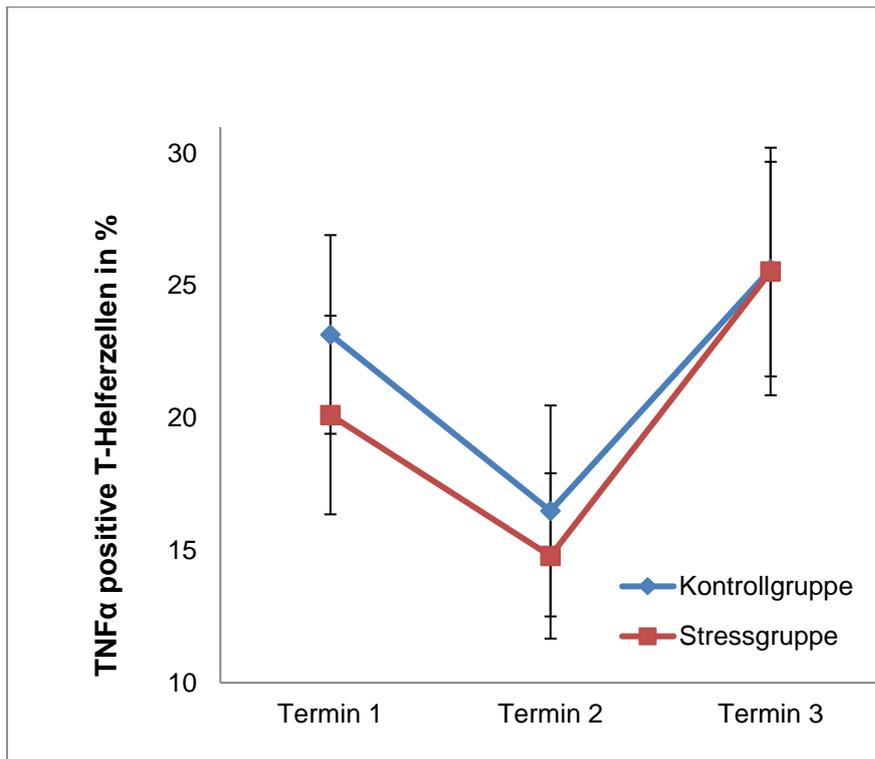


Abbildung 20: TNF- α positive T-Helferzellen (CD3+CD4+TNF- α +) in % zu den jeweiligen Terminen

Vergleicht man in Abbildung 20 die als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellten Werte, entwickelten sich die Gruppen der TNF- α -positiven T-Helferzellen zu keinem der Zeitpunkte signifikant unterschiedlich. Auch der Verlauf zwischen den Zeitpunkten zeigte keine Signifikanz, obwohl beide Gruppen die Tendenz zur verminderten Expression zum Examenstermin aufwiesen.

4.2 Nachweis antiinflammatorischer Immunzellen und deren Zytokine unter Stress bei Medizinstudentinnen

4.2.1 Entwicklung der nicht-klassischen Monozyten über die Zeit

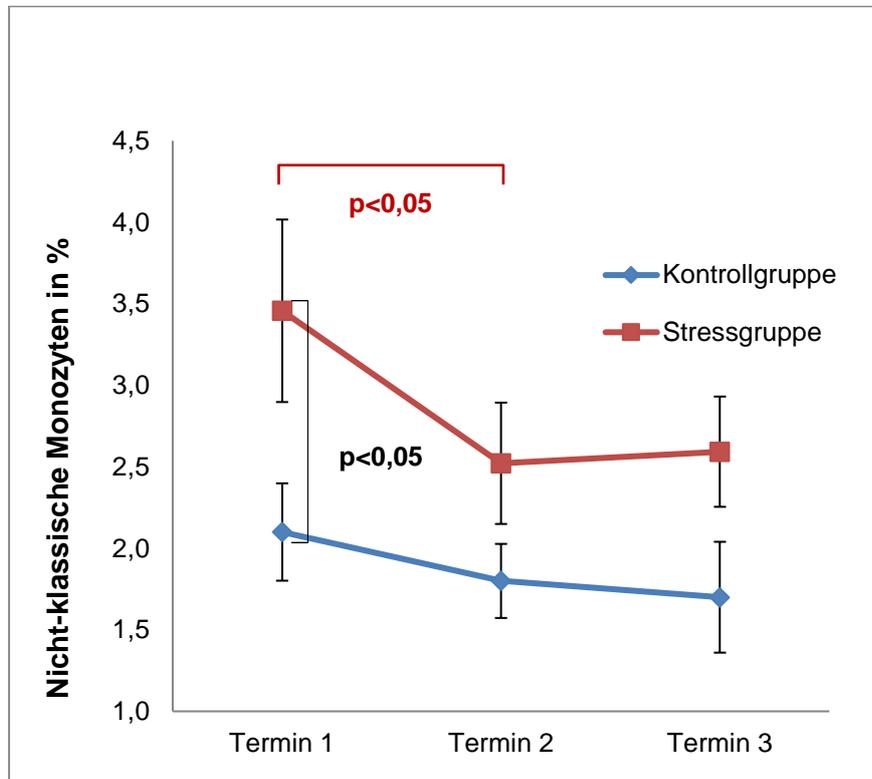


Abbildung 21: Nicht-klassische Monozyten (CD14+CD16++) in % zu den Terminen 1, 2 und 3

Die antiinflammatorischen Monozyten der Stressgruppe starteten, wie in Abbildung 21 nachvollziehbar, zum ersten Messzeitpunkt von einem signifikant höheren Niveau als die Kontrollgruppe ($p=0,037$). Im Anschluss zeigte die Stressgruppe eine signifikante Zellreduktion zwischen Termin 1 und 2 ($p=0,035$). Die Kontrollgruppe verlief fast konstant und zeigte keine signifikante Entwicklung. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der senkrechte Balken (schwarz) markiert den im paarweisen Vergleich signifikanten Unterschied der Gruppen zu T1, der Balken oberhalb (rot) markiert den signifikanten Verlauf der Stressgruppe zwischen T1 und T2.

4.2.2 Verlauf der T-Helferzellen Typ 2 und des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-4 auf T-Lymphozyten und lebenden Zellen

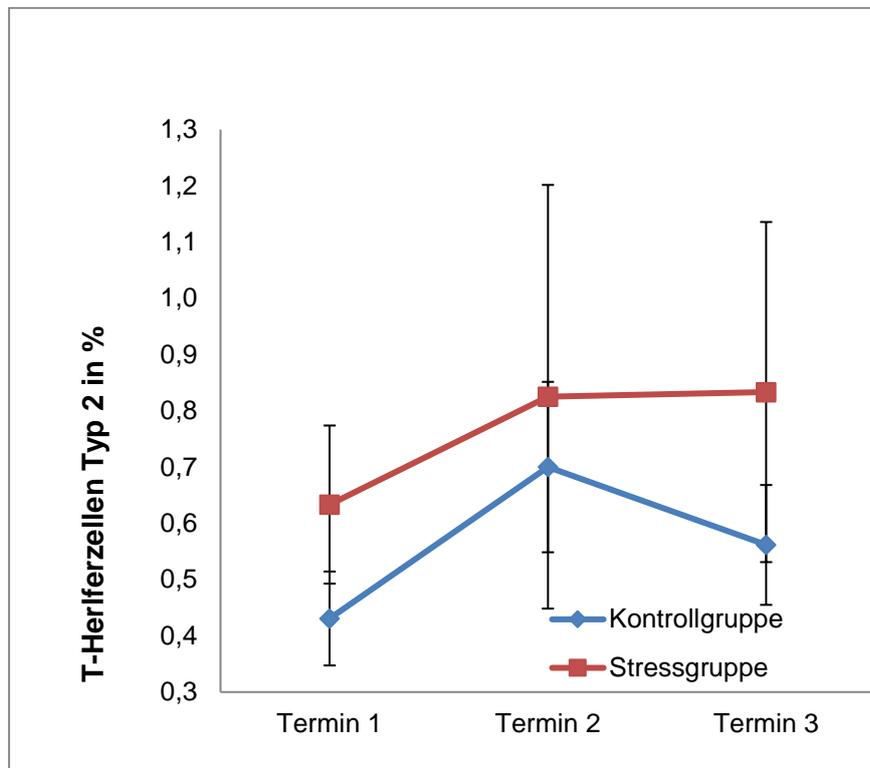


Abbildung 22: T-Helferzellen Typ 2 (CD3+CD4+IL-4+) in % zu den Terminen

Die in der oberen Graphik als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellten Werte der Stress- und Kontrollgruppe waren zwar insbesondere zum Zeitpunkt 3 sehr unterschiedlich (s. Abbildung 22), dieser war jedoch im paarweisen Vergleich nicht signifikant. Auch der Verlauf zwischen den Zeitpunkten war trotz Aufwärtstrend nicht signifikant.

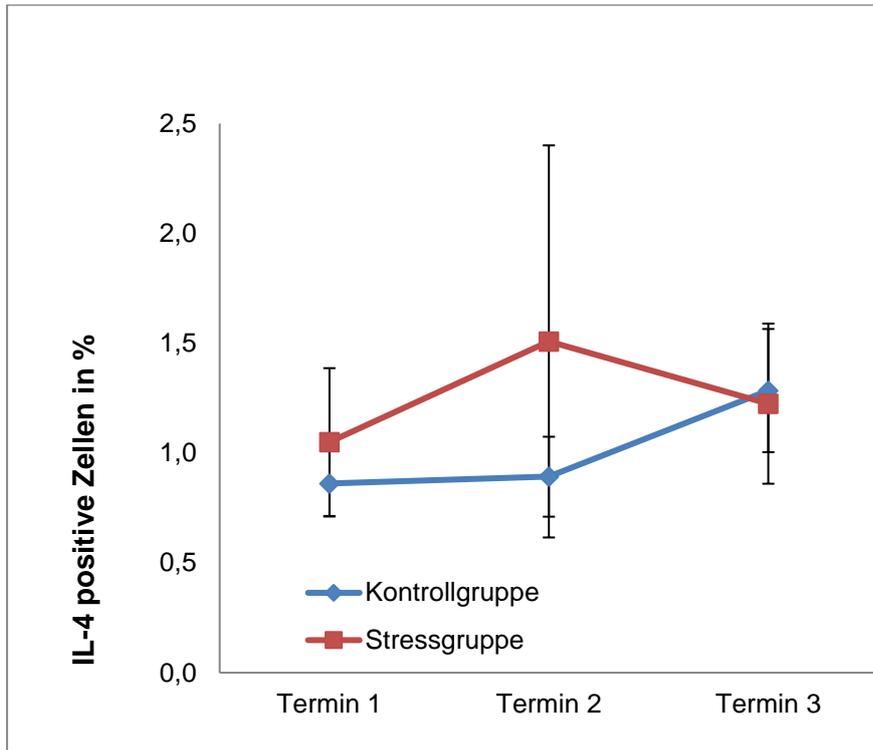


Abbildung 23: IL-4 positive Zellen (IL-4+) in % zu den Terminen

Bei Betrachtung der Mittelwerte und Standardabweichung aller untersuchten IL-4 positiven Zellen (Abbildung 23) wird folgender Trend deutlich: zu Zeitpunkt 1 starteten die Gruppen auf einem ähnlichen Niveau, bevor sie sich zu Zeitpunkt 2 deutlich voneinander unterschieden (vgl.), ohne dass der Unterschied zwischen Stress- und Kontrollgruppe signifikant wird.

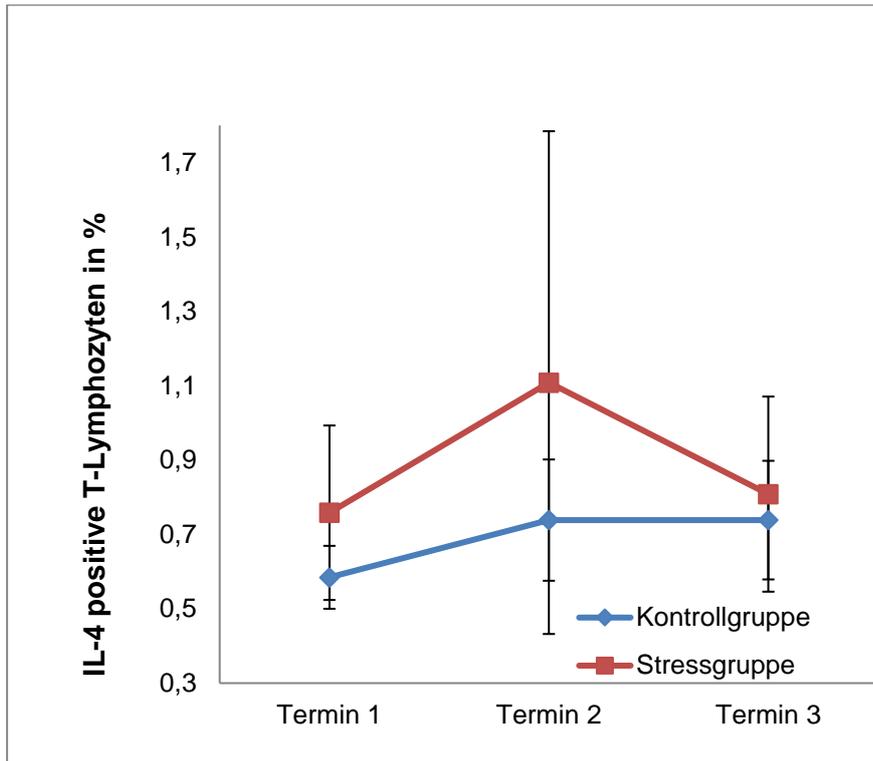


Abbildung 24: IL-4 positive T-Lymphozyten (CD3+IL-4+) in % zu den Terminen

In Abbildung 24 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Interleukin-4 positiven T-Lymphozyten graphisch dargestellt. Der Unterschied zwischen den Gruppen wurde zwar zu Zeitpunkt 2 größer, wies jedoch im paarweisen Vergleich zu keinem der drei Messzeitpunkte eine Signifikanz auf. Auch der Verlauf der Werte war sowohl für Kontroll-, als auch Stressgruppe nicht signifikant aufsteigend oder abfallend.

4.2.3 Die aktivierten und deaktivierten regulatorischen T-Lymphozyten

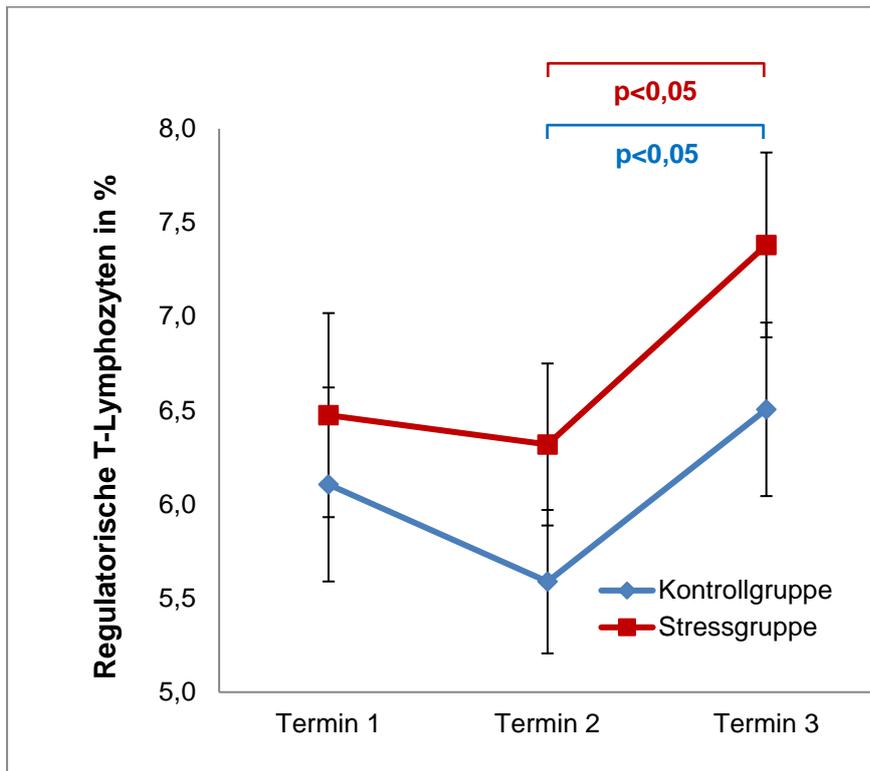


Abbildung 25: Regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+CD127low) in % zu den jeweiligen Terminen

In Abbildung 25 ist die Entwicklung der T-regulatorischen Zellen dargestellt. Der rote Balken oberhalb markiert die signifikante Entwicklung der Stressgruppe und der blaue Balken markiert die signifikante Entwicklung der Kontrollgruppe im Verlauf zwischen T2 und T3. Bei Betrachtung der Zellgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten zeigte sich eine deutliche Differenz der Gruppen zu Zeitpunkt 2, die zu Zeitpunkt 3 maximal, ohne dass dieser Unterschied im paarweisen Vergleich signifikant wurde. Der Verlauf der Stressgruppe wurde in der Erholungsphase signifikant, also zwischen Termin 2 und 3 ($p= 0,016$). Die Kontrollgruppe entwickelte sich analog zur Stressgruppe und wurde im Anstieg Zeitpunkt 2 und 3 ebenfalls signifikant ($p= 0,036$).

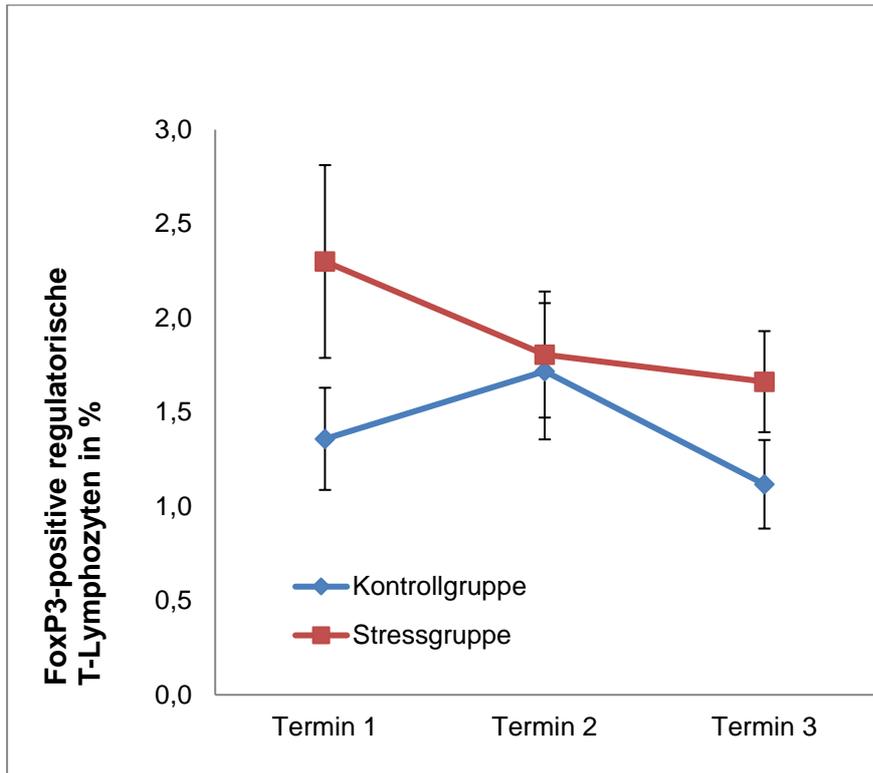


Abbildung 26: FoxP3 positive regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) in % zu den drei Zeitpunkten

Bei Betrachtung von Abbildung 26 fällt die unterschiedliche Entwicklung der Gruppen der mit dem intrazellulären Marker FoxP3 ermittelten regulatorischen T-Lymphozyten über die Zeit auf. Die Gruppen starteten auf einem nicht-signifikant unterschiedlichen Niveau, näherten sich zu Zeitpunkt 2 sehr stark aneinander an, und driften zu Zeitpunkt 3 wieder auseinander, ohne dass der Unterschied signifikant wurde.

(a) Naive regulatorische T-Lymphozyten

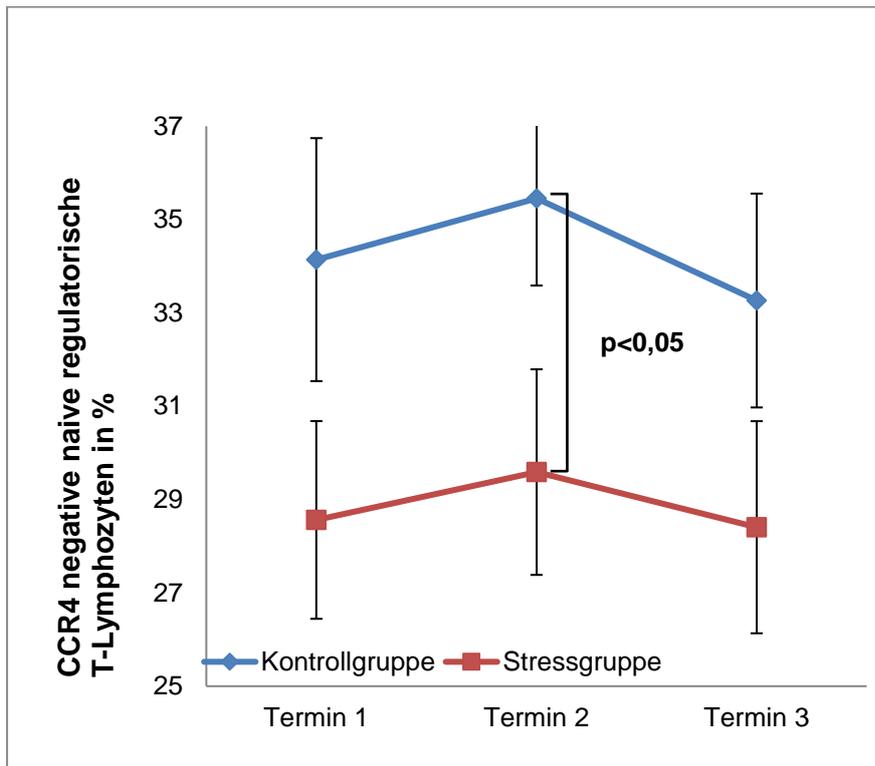


Abbildung 27: CCR4 negative naive regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+CD127lowCCR4-) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Stressgruppe der durch das Fehlen des Chemokinrezeptors CCR4 gekennzeichneten regulatorischen T-Zellen verläuft auf einem deutlich niedrigeren Niveau als die Kontrollgruppe. In der Abbildung 27 wird dies bei Betrachtung der Mittelwerte mit Standardabweichung nachvollziehbar. Dieser Unterschied wurde zu Termin 2 knapp signifikant unterschiedlich ($p=0,05$ (0,049989)), das heißt es waren zum Examenszeitpunkt in der Stressgruppe weniger naive regulatorische Zellen nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Der Balken mittig markiert den signifikanten Unterschied der Gruppen zu Termin 2.

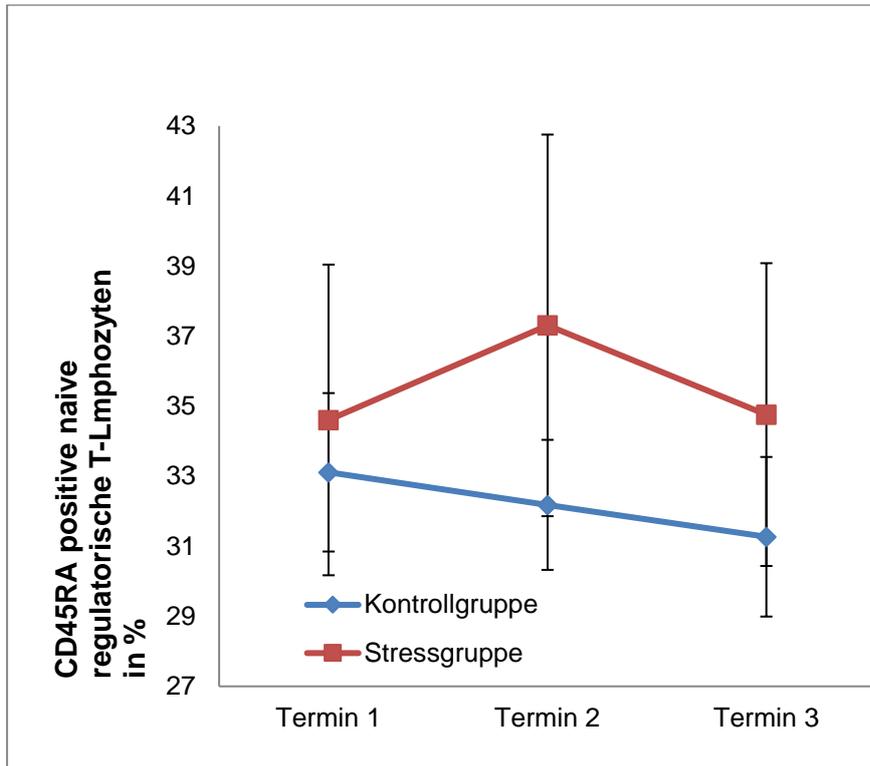


Abbildung 28: CD45RA positive naive regulatorische T-Lymphozyten (CD3+CD4+CD25+CD127lowCD45RA+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Gruppen der durch den Marker CD45RA gekennzeichneten, naiven regulatorischen T-Lymphozyten waren – wie in Abbildung 28 nachvollziehbar – zu Termin 2 maximal unterschiedlich ausgeprägt, wobei der Unterschied im paarweisen Vergleich nicht als signifikant gedeutet werden konnte. Die Werte sind in der Graphik als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

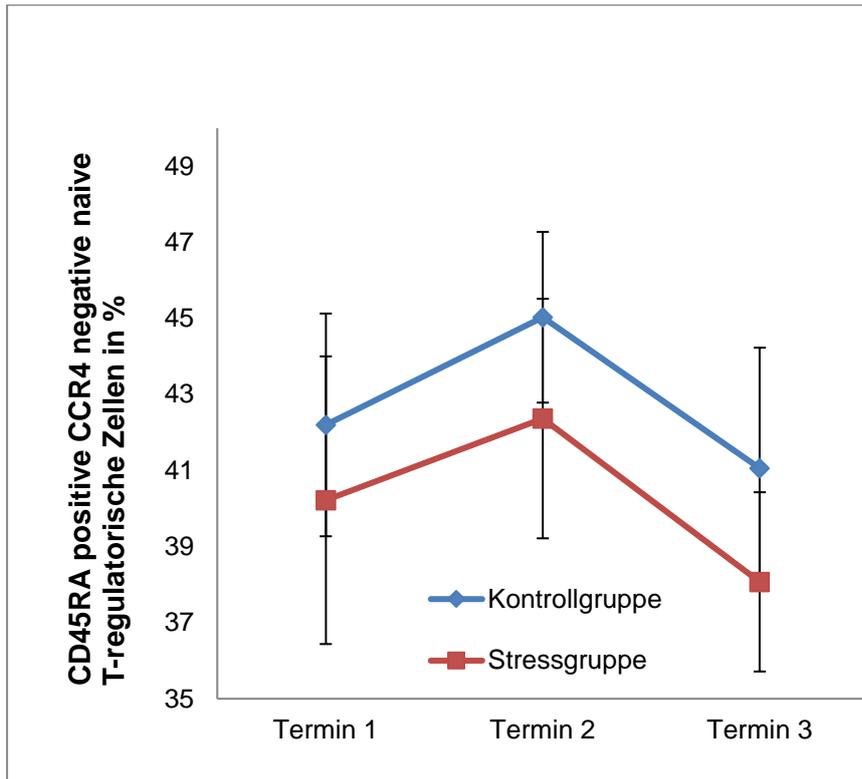


Abbildung 29: CD45RA positive CCR4 negative naive T-regulatorische Zellen (CD3+CD4+CD45RA+CCR4-) in % zu den jeweiligen Terminen

Zu allen drei Messzeitpunkten waren die Werte der CD45RA positiven und CCR4 negativen T-Helferzellen und somit naiven T-regulatorischen Zellen von Kontroll- und Stressgruppe sehr ähnlich, sodass der Unterschied zu den Messzeitpunkten nicht signifikant wurde (Abbildung 29, die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt). Weder zwischen den Gruppen im paarweisen Vergleich, noch innerhalb einer Gruppe im Verlauf zeigte sich eine signifikante Entwicklung.

(b) Regulatorische Memory T-Lymphozyten

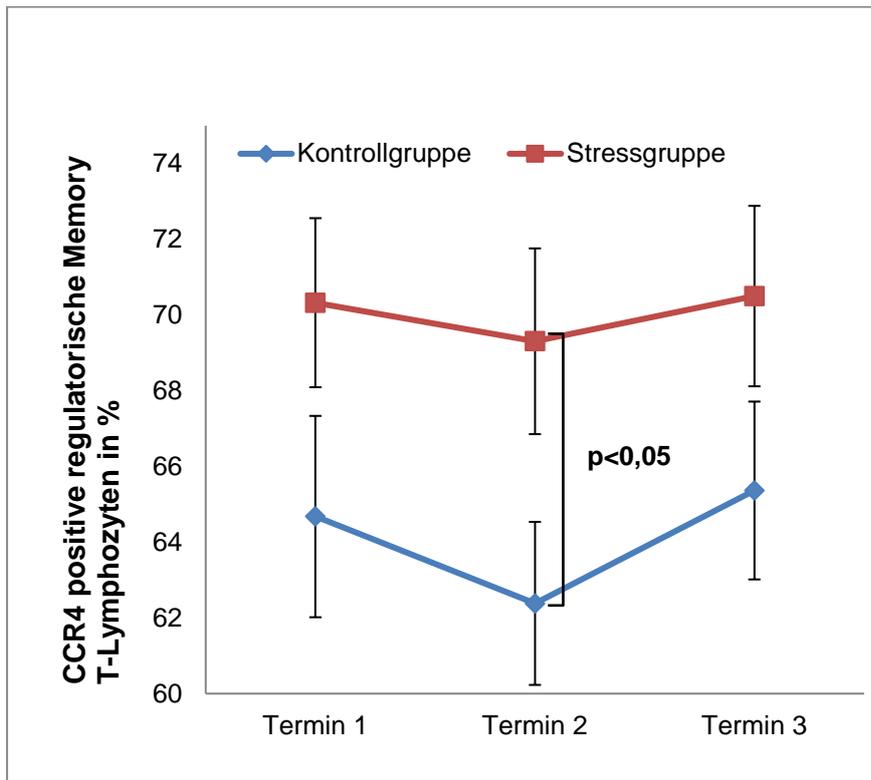


Abbildung 30: CCR4 positive T-regulatorische Memory-Zellen (CD3+CD4+CD25+CD127lowCCR4+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Gruppen der Chemokinrezeptor CCR4 positiven regulatorischen T-Zellen starteten zum Zeitpunkt 1 bereits mit unterschiedlichen Werten und wurden zu Zeitpunkt 2 im paarweisen Vergleich signifikant unterschiedlich. ($p = 0,041$) im Sinne eines deutlich erhöhten Nachweises der Memory-Treg um den Examenszeitpunkt. Die Werte sind in Abbildung 30 als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Balken mittig (schwarz) markiert den signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zu T2.

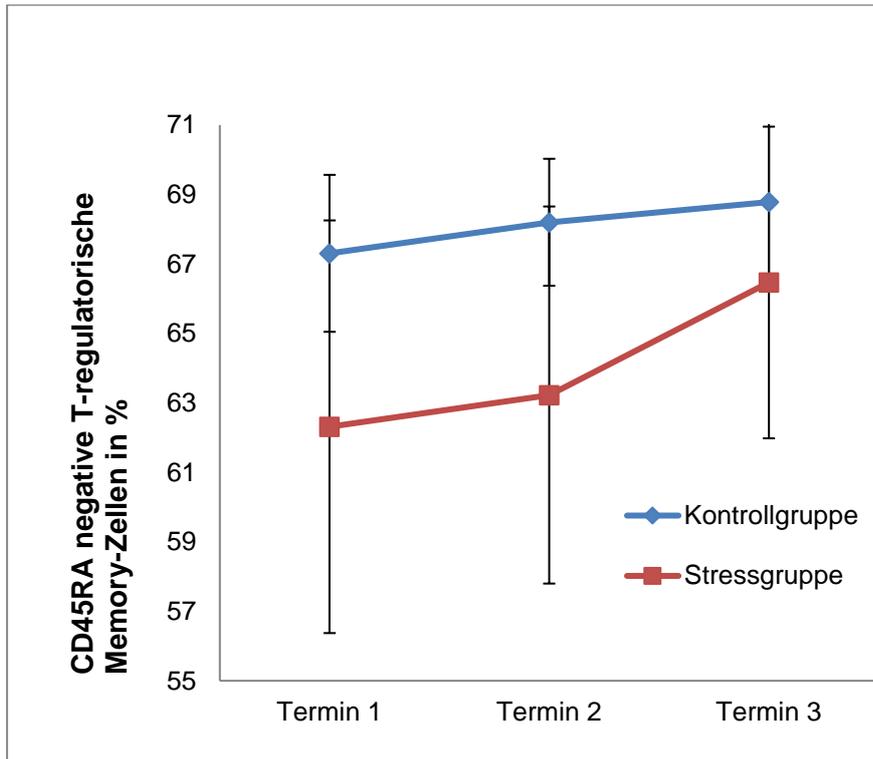


Abbildung 31: CD45RA negative T-regulatorische Memory-Zellen (CD3+CD4+CD25+CD127lowCD45RA-) in % zu den jeweiligen Terminen

In Abbildung 31 sind die Werte der CD45RA negativen regulatorischen Memory-T-Lymphozyten als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die Stressgruppe zeigte zwar über den gesamten Messzeitraum niedrigere Zellzahlen als die Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch im paarweisen Vergleich nicht signifikant.

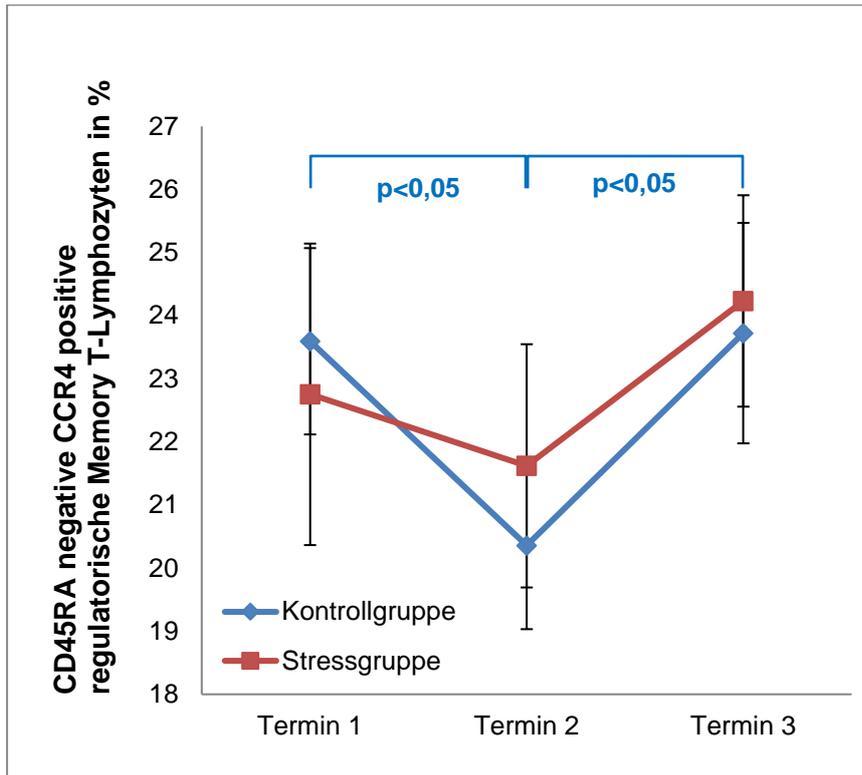


Abbildung 32: CD45RA negative CCR4 positive T-regulatorische Memory-Zellen (CD3+CD4+CD45RA-CCR4+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Unterschiede der Gruppen der CD45 negativen CCR4 positiven T-Helferzellen und somit der regulatorischen Memory-T-Lymphozyten zu den jeweiligen Messzeitpunkten werden insbesondere zu Termin 2 deutlich, dieser Unterschied wird jedoch im paarweisen Vergleich als nicht signifikant ausgewiesen. Der Verlauf der Stressgruppe zeigt zwar einen V-förmigen Verlauf, wird jedoch nicht signifikant. Die Kontrollgruppe hingegen fiel zwischen Zeitpunkt 1 und 2 signifikant ab ($p = 0,005$) und stieg zwischen Zeitpunkt 2 und 3 wiederum an ($p = 0,018$). Diese Entwicklung ist in Abbildung 32 nachvollziehbar. Die beiden Balken oberhalb (blau) markieren den signifikanten Verlauf der Kontrollgruppe zwischen T1 und 2 sowie zwischen T2 und T3.

4.3 Die B-Lymphozyten unter Examensstress

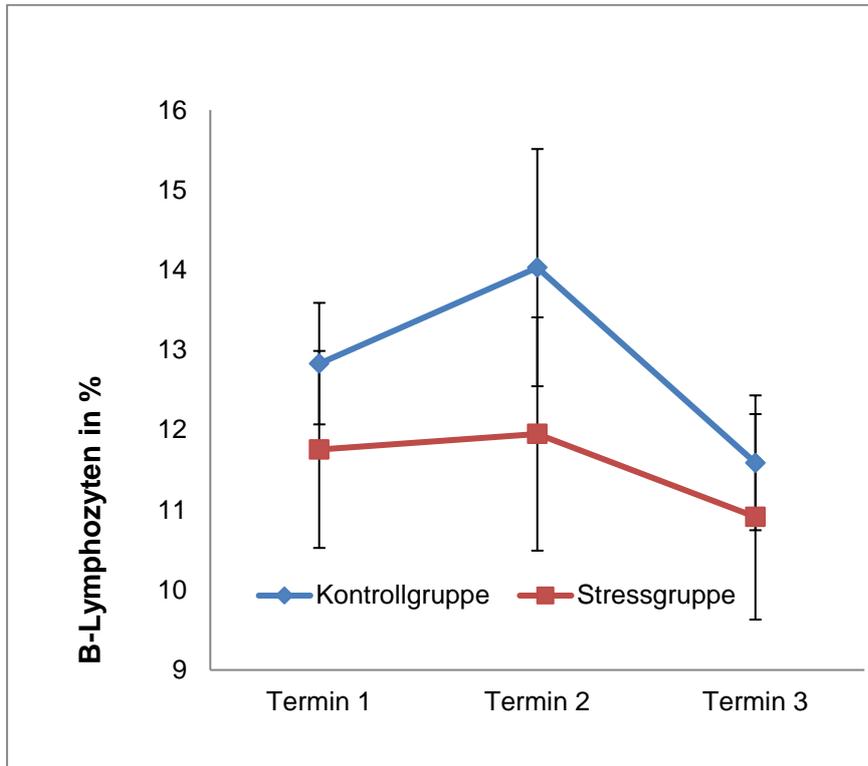


Abbildung 33: B-Lymphozyten (CD19+) in % zu den jeweiligen Terminen

In Abbildung 33 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der B-Zellen dargestellt. Im Paarweisen Vergleich konnte sogar zu Zeitpunkt 2, an dem die Werte der B-Lymphozyten sich maximal unterscheiden, keine Signifikanz bezüglich der Unterschiede in der Entwicklung zwischen den Messzeitpunkten ermittelt werden.

4.4 Ergebnisse der dendritischen Zellen

4.4.1 Plasmazytoide dendritische Zellen, inaktiv und aktiviert

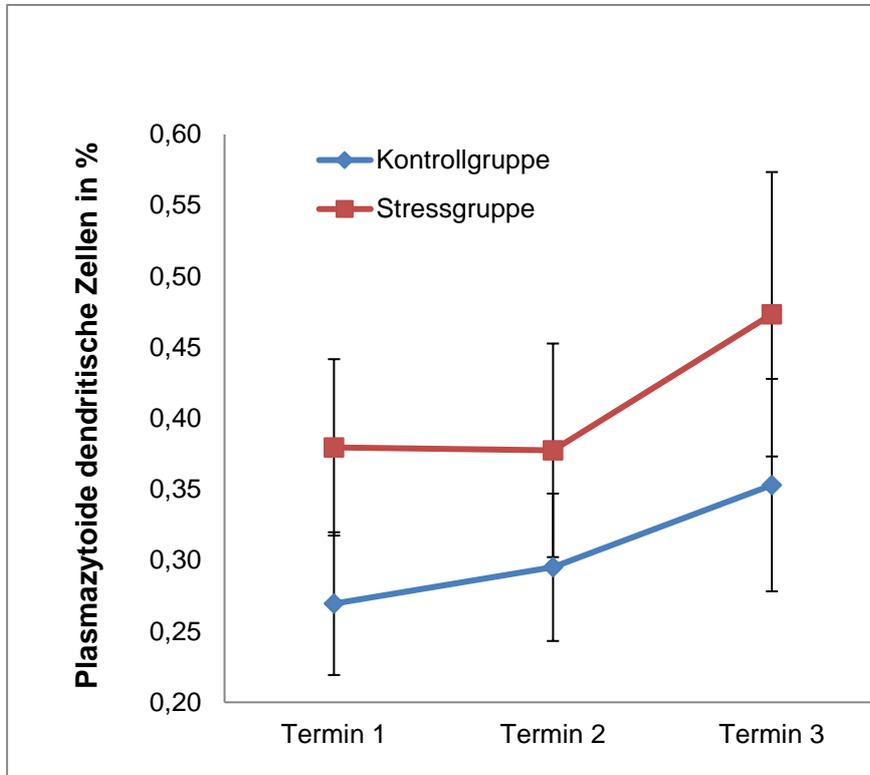


Abbildung 34: Plasmazytoide dendritische Zellen (CD304+CD11c low) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Stressgruppe der plasmazytoiden dendritischen Zellen blieb in der Prüfungsphase auf konstantem Niveau, bevor sie in der Erholungsphase anstieg. Abbildung 34 stellt die Mittelwerte und Standardabweichung graphisch dar. Weder zwischen den Gruppen im paarweisen Vergleich, noch innerhalb einer Gruppe im Verlauf zeigte sich eine signifikante Entwicklung. Die Entwicklung der Gruppen und die Zellzahl zu den drei Messzeitpunkten war über die Zeit hinweg nicht signifikant unterschiedlich.

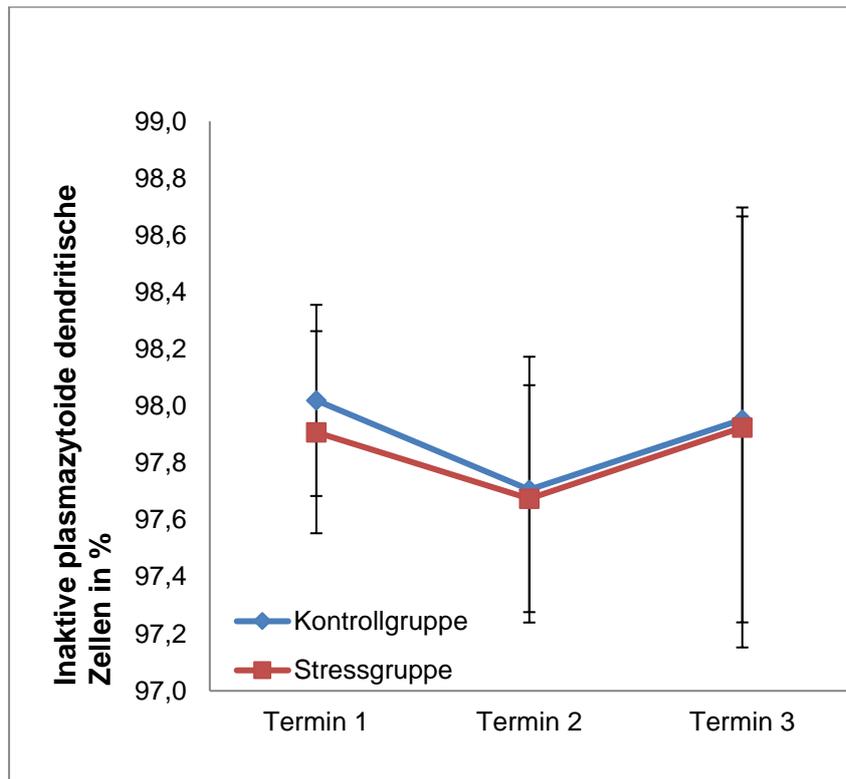


Abbildung 35: Inaktive plasmazytoide dendritische Zellen (CD304+CD1c lowCD86-) in % zu den jeweiligen Terminen

Zu allen drei Zeitpunkten bestand für die inaktiven plasmazytoiden dendritischen Zellen nur ein geringer, nicht-signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Stressgruppe. Auch der Verlauf der Gruppen war trotz Abfall zum Examen nicht signifikant (Abbildung 35, die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt)

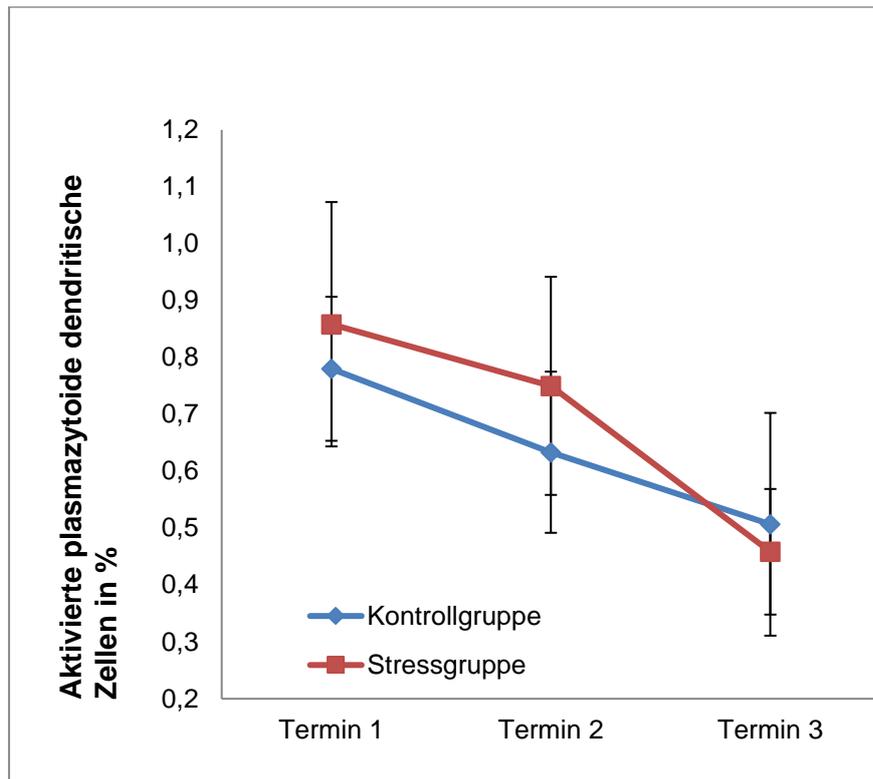


Abbildung 36: Aktivierte plasmazytoide dendritische Zellen (CD304+CD1c lowCD86+) in % zu den jeweiligen Terminen

Bei Betrachtung des Kurvenverlaufes der aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen fällt der deutliche Abwärtstrend beider Gruppen auf (vgl. Abbildung 36). Dieser wird weder in der Stress- noch in der Kontrollgruppe signifikant. Die Werte sind in der oberen Graphik als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

4.4.2 Myeloide dendritische Zellen Typ 1, inaktiv und aktiviert

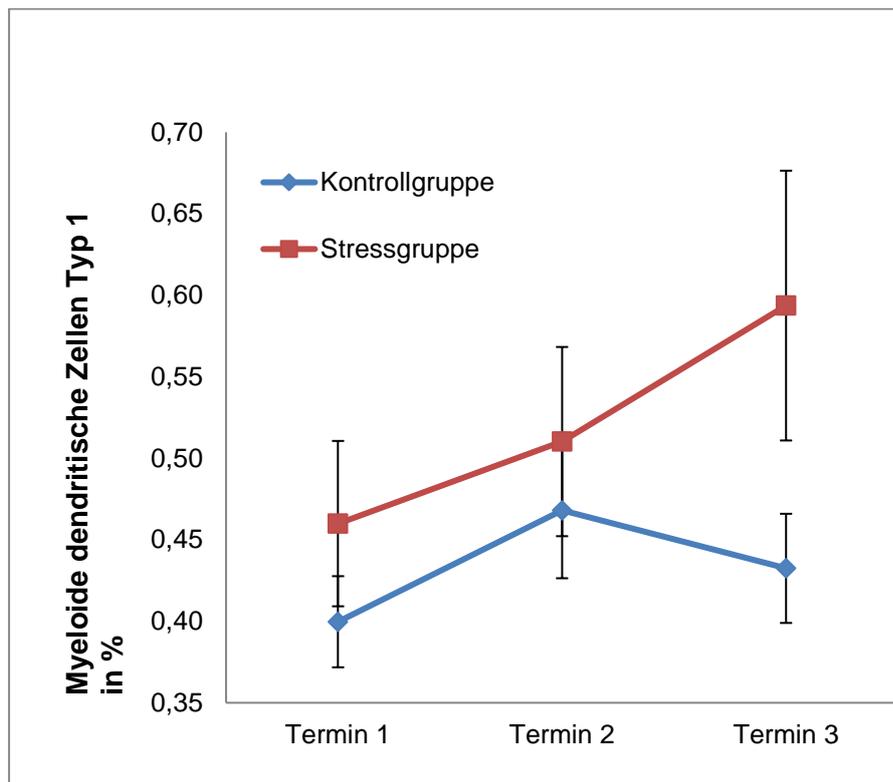


Abbildung 37: Myeloide dendritische Zellen Typ 1 in % zu den jeweiligen Terminen

Die Mittelwerte von Stress- und Kontrollgruppe der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 zeigen zu Zeitpunkt 1 und 2 eine ähnliche Aufwärtstendenz und gleichen sich stark, bis es zu Zeitpunkt 3 zu einem deutlichen Unterschied kommt im Sinne eines deutlichen Anstieges der Stressgruppe (vgl. Abbildung 37, Mittelwerte sind mit Standardabweichung dargestellt). Dieser Maximalwert der Stressgruppe wurde im paarweisen Vergleich jedoch nicht signifikant.

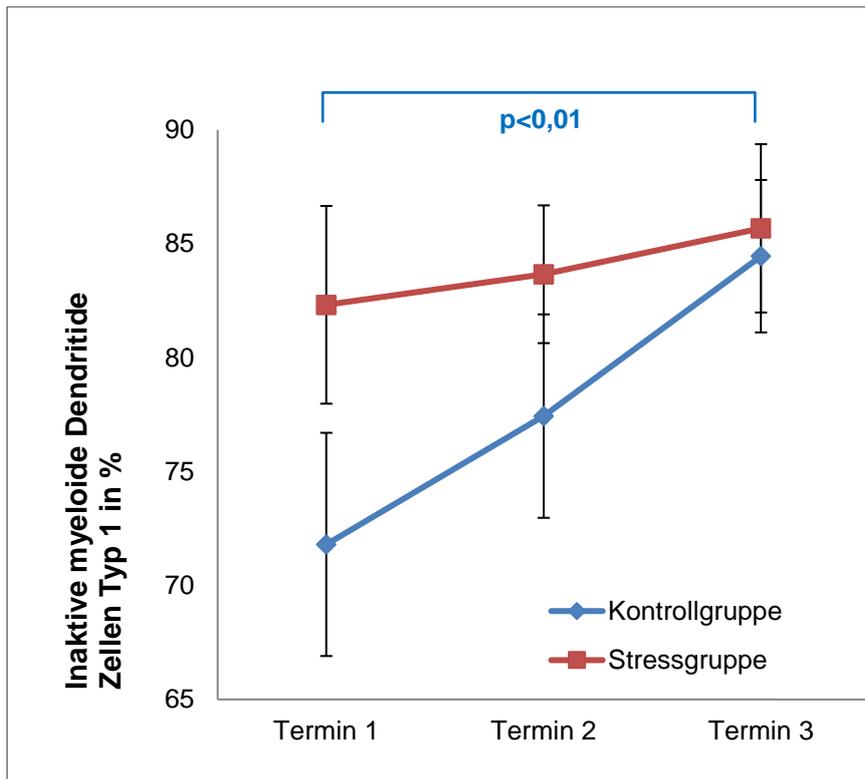


Abbildung 38: Inaktive myeloide dendritische Zellen Typ 1 (CD1c+CD11c+CD86-) in % zu den jeweiligen Terminen

Wie in Abbildung 38 nachvollziehbar ist, stiegen die inaktiven myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 der Stressgruppe über die drei Messzeitpunkte hinweg stetig an, ohne dass der Verlauf signifikant wurde. Die Kontrollgruppe hingegen zeigt einen deutlich steileren Aufwärtstrend, der signifikant wurde ($p = 0,002$). Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Balken oberhalb (blau) markiert den signifikanten Verlauf der Kontrollgruppe von T1 bis T3.

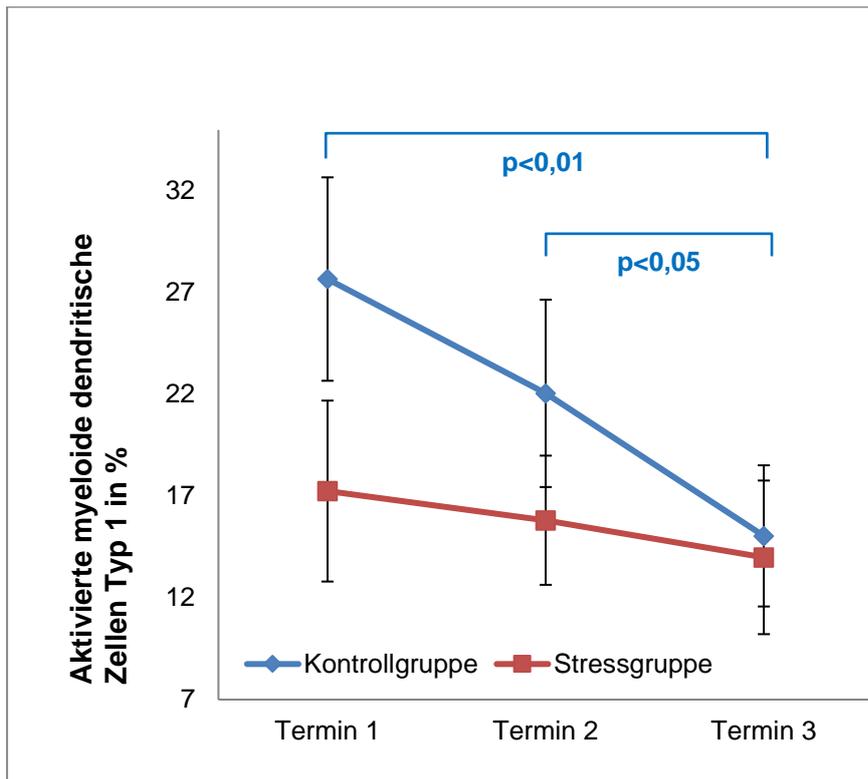


Abbildung 39: Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 1 (CD1c+CD11c+CD86+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Werte der aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 starteten zu Zeitpunkt 1 auf einem sehr unterschiedlichen Niveau, dieser Unterschied ist im paarweisen Vergleich jedoch nicht signifikant. Zu Zeitpunkt 2 und 3 wird der Abstand geringer und die Werte der Gruppen gleichen sich an (vgl. Abbildung 39). Der Verlauf der Stressgruppe entwickelt sich fast konstant und zeigt zwischen keinem der Zeitpunkte eine signifikante Entwicklung. Die Kontrollgruppe jedoch wird im Verlauf über die Zeit signifikant zwischen Zeitpunkt 2 und 3 ($p = 0,044$) und über den gesamten Verlauf des Semesters ($p = 0,001$). Die Werte in Abbildung 39 sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die Balken oberhalb (blau) markieren den signifikanten Verlauf der Kontrollgruppe von T1 bis T3 und von T2 bis T3.

4.4.3 Myeloide dendritische Zellen Typ 2, inaktiv und aktiviert

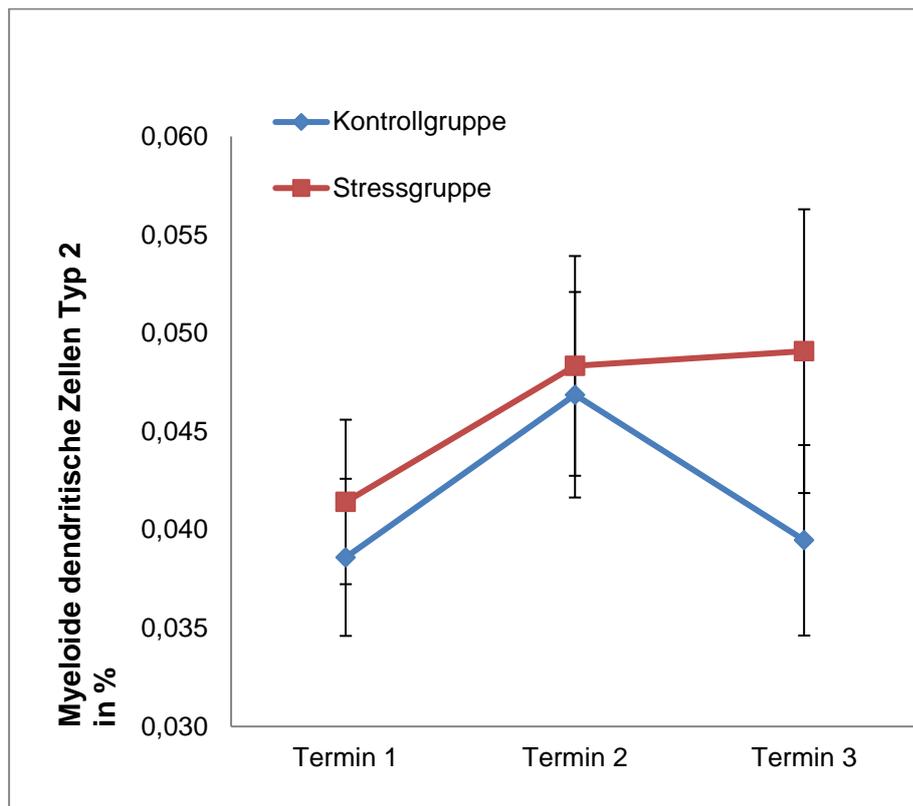


Abbildung 40: Myeloide dendritischen Zellen Typ 2 (CD141+CD11c+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Gruppen der myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 sind sich zu Messzeitpunkt 1 und 2 sehr ähnlich bevor sich die Werte an Zeitpunkt 3 deutlicher voneinander unterscheiden ohne dass diese Differenz signifikant wurde. Abbildung 40 stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung der genannten Zellgruppe dar.

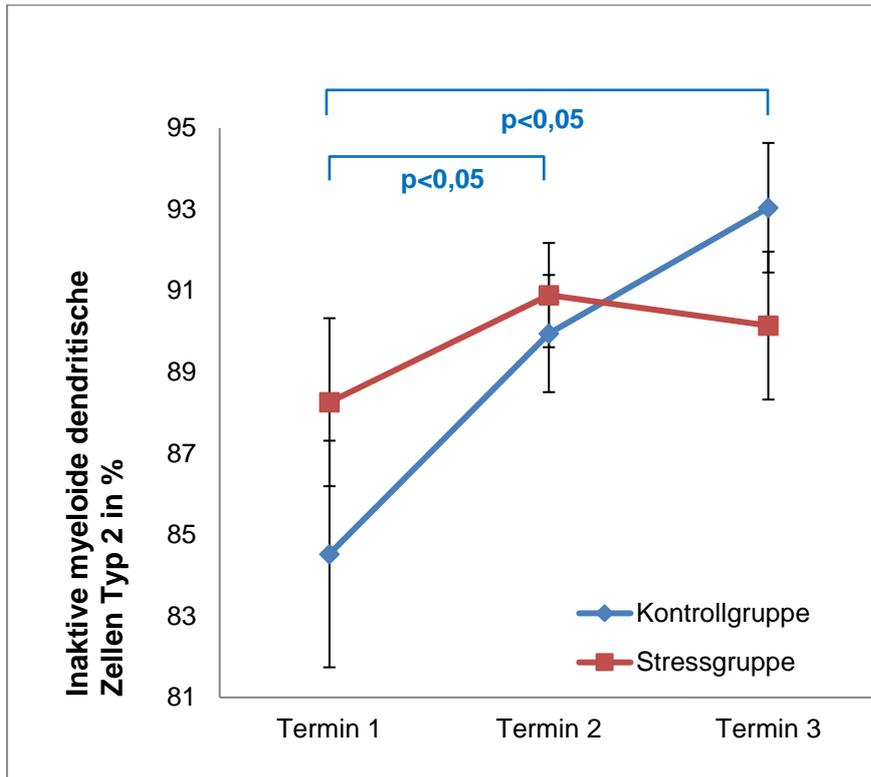


Abbildung 41: Inaktive myeloide dendritische Zellen Typ 2 (CD141+CD11c+CD86-) in % zu den jeweiligen Terminen

Weder der Aufstieg der Stressgruppe der inaktiven mDC2 in den ersten zwölf Wochen vor dem Examen noch der Abstieg in den folgenden zwölf Wochen zeigten eine Signifikanz (vgl. Abbildung 41: Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die Balken oberhalb (blau) markieren den signifikanten Verlauf der Kontrollgruppe von T1 bis T3 und von T1 bis T2.). Die Werte zwischen Kontroll- und Stressgruppe zu den Zeitpunkten 1 und 3 waren sehr unterschiedlich, wobei dieser Unterschied im paarweisen Vergleich als nicht signifikant ausgewiesen wurde. Die Kontrollgruppe steigt insgesamt deutlich an und wurde, wie bei den inaktiven mDC1, signifikant, diesmal im Verlauf zwischen Zeitpunkt 1 und 2 sowie im Gesamtverlauf.

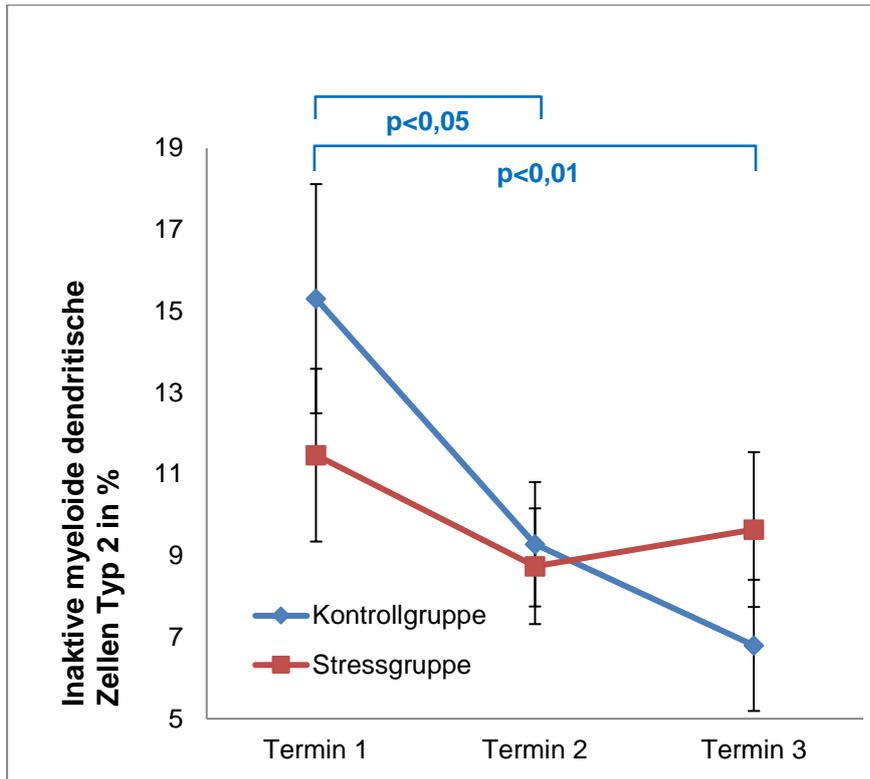


Abbildung 42: Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 2 (CD141+CD11c+CD86+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Zellzahlen der Stressgruppe der aktivierten myeloiden dendritischen Zellen Typ 2 sanken zum Examenszeitpunkt ab, bevor sie nach dem Examen wieder anstiegen ohne dass der Verlauf signifikant wurde. Die Kontrollgruppe hingegen vollzog auch bei dieser Untersuchung eine signifikante Entwicklung. In den 12 Monaten vor dem Examen fielen die Zellzahlen signifikant ab ($p = 0,014$). Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg wurde der Verlauf ebenfalls deutlich ($p = 0,007$). Diese Entwicklung ist in Abbildung 41 nachvollziehbar. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Die Balken oberhalb (blau) markieren den signifikanten Verlauf der Kontrollgruppe von T1 bis T2 und von T1 bis T3.

4.5 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) auf pro- und antiinflammatorischen Zellen

4.5.1 nAChR $\alpha 7$ auf proinflammatorischen Zellen der angeborenen Immunität

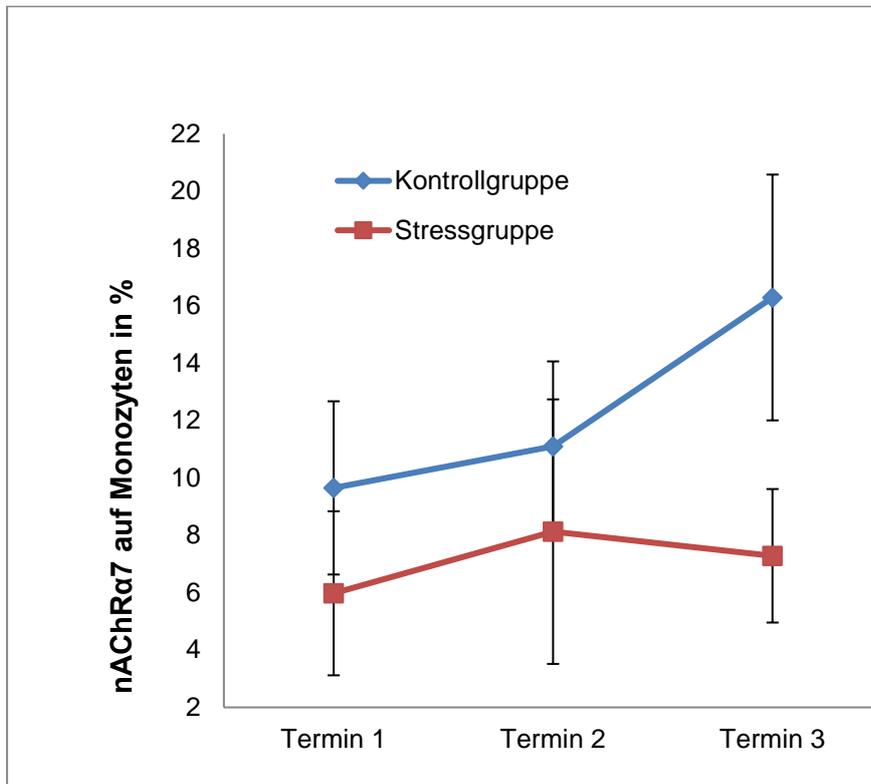


Abbildung 43: nAChR $\alpha 7$ auf Monozyten in % zu den jeweiligen Terminen

In Abbildung 43 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der nikotinischen Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ -tragenden Monozyten dargestellt. Betrachtet man die Werte zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten zeigt sich, dass sich die Werte zu Zeitpunkt 2 ähnlicher wurden, bevor sie zum Messzeitpunkt 3 ihre ausgeprägteste Differenz erreichen. Dieser Unterschied wurde jedoch im paarweisen Vergleich als nicht-signifikant ausgewiesen. Auch in der Entwicklung der Werte zeigte sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der ersten 12 Wochen und innerhalb der letzten 12 Wochen sowie über den Gesamtzeitraum hinweg.

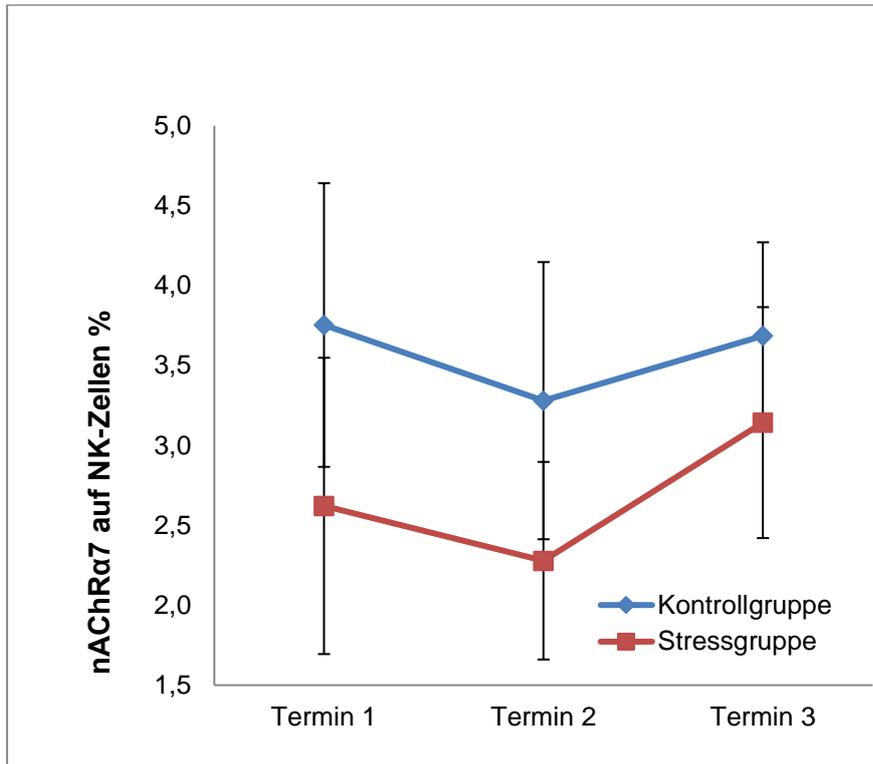


Abbildung 44: nAChR α 7 auf NK-Zellen (CD16+CD56+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Werte des nikotinischen Acetylcholinrezeptoren auf Natürlichen Killerzellen starteten auf einem sehr unterschiedlichen Niveau und näherten sich zu Zeitpunkt 2 und 3 an, ohne zu einem Messzeitpunkt signifikant zu werden. Abbildung 44 zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung.

4.5.2 nAChR $\alpha 7$ auf Zellen der adaptiven Immunität

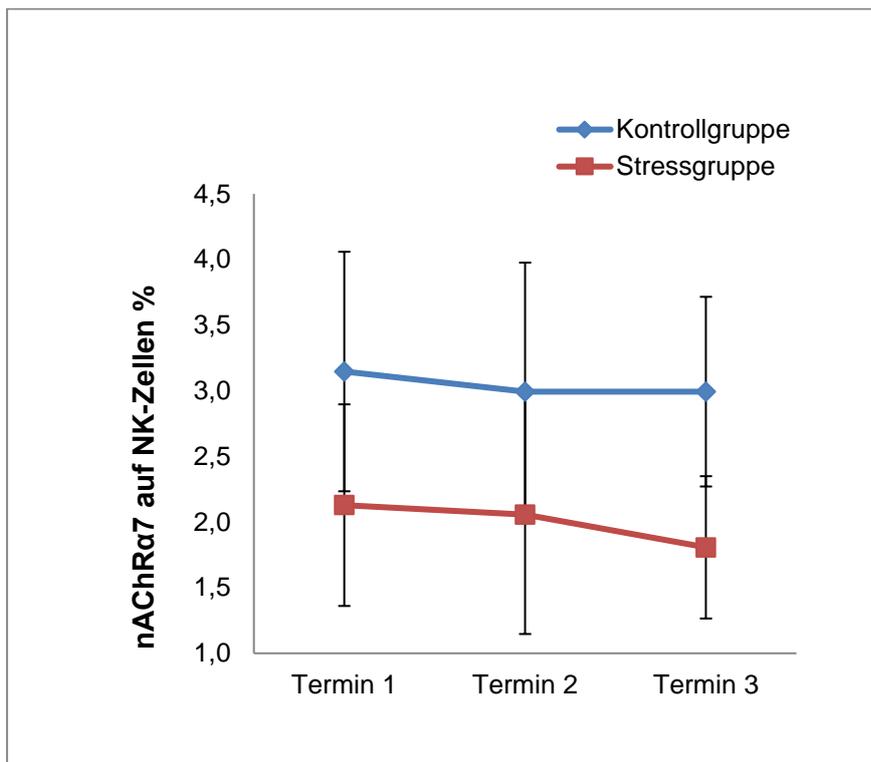


Abbildung 45: nAChR $\alpha 7$ auf T-Lymphozyten ($CD3+CHRNA7+$) in % zu den jeweiligen Terminen

Die Werte des nikotinische Acetylcholinrezeptor auf T-Lymphozyten unterschieden sich zu jedem Zeitpunkt deutlich von den Werten der Kontrollgruppe, jedoch wurde der Unterschied im paarweisen Vergleich als nicht signifikant bewertet (Abbildung 45).

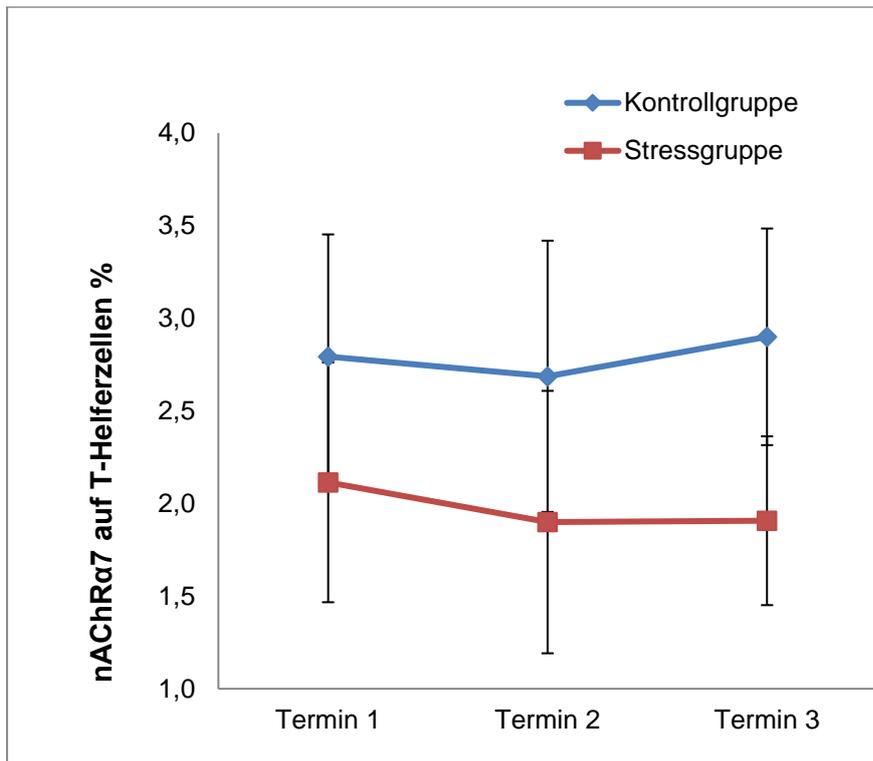


Abbildung 46: nAChRα7 auf T-Helferzellen (CD4+CD3+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen

Der Abstand der Gruppen des Acetylcholinrezeptoren auf T-Helferzellen zwischen den jeweiligen Messzeitpunkten war deutlich und blieb relativ konstant über die Zeit. Zu keinem Zeitpunkt wurde der Abstand im paarweisen Vergleich signifikant (Abbildung 46).

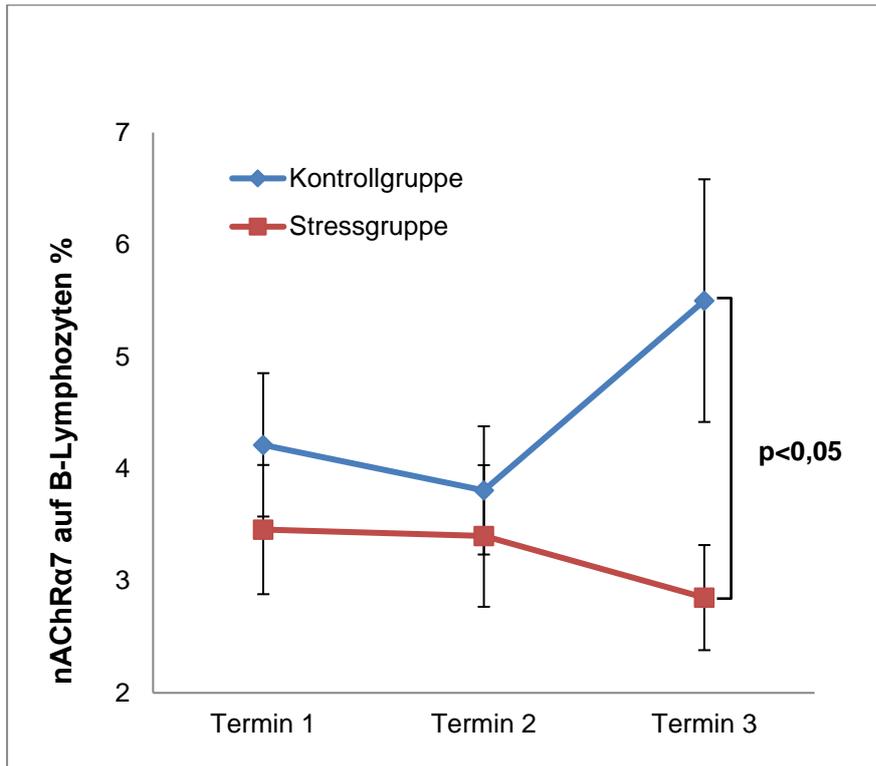


Abbildung 47: nAChRα7 auf B-Lymphozyten (CD19+CHRNA7+) in % zu den jeweiligen Terminen

Abbildung 47 zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung des Acetylcholinrezeptors auf B-Lymphozyten. Die Werte der Gruppen blieben über die ersten beiden Zeitpunkte hinweg ähnlich bevor sie sich zu Zeitpunkt 3 deutlich voneinander entfernten, wobei der Kontrollwert deutlich anstieg und der Stresswert leicht absank. Dieser Unterschied wurde im paarweisen Vergleich als signifikant gewertet ($p=0,039$). Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Balken rechts seitlich der Graphik markiert den im paarweisen Vergleich signifikanten Unterschied der Gruppen zu T3.

5 DISKUSSION

5.1 Kernergebnisse und Hintergrund der Studie

In der umfassenden Untersuchung der vorgestellten Zellgruppen konnten unter Examensstress einige entscheidende Veränderungen festgestellt werden. Zur besseren Übersicht sind die signifikanten Entwicklungen der Stress- und Kontrollgruppe im Folgenden zusammengefasst dargestellt.

Übersicht der Entwicklung der einzelnen Zellpopulationen im Verlauf

Zellpopulationen	Marker	Gruppen	T1-T2 / zu T1	T2-T3 / zu T2	T1-T3 / zu T3
Proinflammatorische Zellen					
Monozyten gesamt	CD14+ CD16+	Stress	-	↑ T2-T3	-
		Kontrolle	-	-	-
Klassische Monozyten	CD14++ CD16-	Stress	-	↑ T2-T3	-
		Kontrolle	-	-	-
Intermediäre Monozyten	CD14++ CD16+	Stress	↑ zu T1	-	↑ zu T3
		Kontrolle	-	-	-
TNFα positive Monozyten	TNF α + CD16+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	↓ T1-T2	-	-
TNFα positive Zellen	TNF α +	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Natürliche Killerzellen	CD16+ CD56+	Stress	↓ T1-T2	-	-
		Kontrolle	-	-	-
T-Lymphozyten	CD3+	Stress	-	↓ T2-T3	↓↓ T1-T3
		Kontrolle	-	-	-
IFN-γ positive T-Lymphozyten	CD3+ IFN- γ +	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
IL-17 positive T-Lymphozyten	CD3+ IL-17+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
TNF-α positive T-Lymphozyten	CD3+ TNF- α +	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-

Zellpopulationen	Marker	Gruppen	T1-T2 / zu T1	T2-T3 / zu T2	T1-T3 / zu T3
Zytotoxische T-Lymphozyten	CD3+ CD8+	Stress	-	↓ T2-T3	-
		Kontrolle	-	-	-
Gesamtzahl der T-Helferzellen	CD3+ CD4+	Stress	-	-	↓↓ T1-T3
		Kontrolle	-	-	-
Aktivierte T-Helferzellen	CD3+CD4+ CD25+	Stress	↓ T1-T2	↑ T2-T3	-
		Kontrolle	↓ T1-T2	↑ T2-T3	-
T-Helferzellen Typ 1	CD3+CD4+ IFN-γ+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
IFN-γ positive Zellen	IFN-γ+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
T-Helferzellen Typ 17	CD3+CD4+ IL-17+	Stress	-	↑ T2-T3	↑ T1-T3
		Kontrolle	-	-	-
IL-17 positive Zellen	IL-17+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
TNF-α positive T-Helferzellen	CD3+CD4+ TNF-α+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Antiinflammatorische Zellen					
Nicht-klassische Monozyten	CD14+ CD16++	Stress	↑ zu T1 ↓ T1-T2	-	-
		Kontrolle	-	-	-
T-Helferzellen Typ 2	CD3+CD4+ IL-4+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
IL-4 positive Zellen	IL-4+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
IL-4 positive T-Lymphozyten	CD3+IL-4+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Regulatorische T-Lymphozyten (Treg)	CD3+CD4+ CD25+ CD127low	Stress	-	↑ T2-T3	↑ T1-T3
		Kontrolle	-	-	-
FoxP3-positive Treg	CD3+CD4+ CD25+FoxP3+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
CCR4 negative Treg	CD3+CD4+CD25+ CD127low CCR4-	Stress	-	↓ zu T2	-
		Kontrolle	-	-	-

Zellpopulationen	Marker	Gruppen	T1-T2 / zu T1	T2-T3 / zu T2	T1-T3 / zu T3
CD45RA positive Treg	CD3+CD4+CD25+CD127low CD45RA+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
CD45RA pos CCR4 neg naive Treg	CD3+CD4+ CD45RA+CCR4-	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
CCR4 positive Memory Treg	CD3+CD4+CD25+CD127low CCR4+	Stress	-	↑ zu T2	-
		Kontrolle	-	-	-
CD45RA negative Memory Treg	CD3+CD4+CD25+CD127low CD45RA-	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
CD45RA neg CCR4 pos Treg	CD3+CD4+ CD45RA- CCR4+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
B-Lymphozyten					
B-Lymphozyten	CD19+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Dendritische Zellen					
plasmazytoide dendritische Zellen (pDC)	CD304+CD11c low	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Inaktive pDC	CD304+CD11c low CD86-	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Aktivierte pDC	CD304+CD11c low CD86+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Myeloide DC Typ 1 (mDC1)	CD11c+CD11c+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
Inaktive mDC1	CD11c+CD11c+ CD86-	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	↑ T1-T3
Aktivierte mDC1	CD11c+CD11c+ CD86+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	↑ T2-T3	↑ T1-T3
Myeloide DC Typ 2 (mDC2)	CD141+ CD11c+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	↓ T1-T2	-	↓ T1-T3
Inaktive mDC2	CD141+CD11c+ CD86-	Stress	-	-	-
		Kontrolle	↑ T1-T2	-	↑ T1-T3
Aktivierte mDC2	CD141+CD11c+ CD86+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	↓ T1-T2	-	↓ T1-T3

Zellpopulationen	Marker	Gruppen	T1-T2 / zu T1	T2-T3 / zu T2	T1-T3 / zu T3
Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$					
AChRα-7 auf Monozyten	CD14+CD16+ CHRNA7+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
AChRα-7 auf NK-Zellen	CD16+CD56+ CHRNA7+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
AChRα-7 auf T-Lymphozyten	CD3+ CHRNA7+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
AChRα-7 auf T-Helferzellen	CD4+CD3+ CHRNA7+	Stress	-	-	-
		Kontrolle	-	-	-
AChRα-7 auf B-Lymphozyten	CD19+ CHRNA7+	Stress	-	-	↓ zuT3
		Kontrolle	-	-	-

Tabelle 15: Übersicht der Entwicklung der einzelnen Zellpopulationen im Verlauf

Tabelle 15 gibt eine Übersicht über die Entwicklung der einzelnen Zellpopulationen im Verlauf zwischen (T1-T2, T2-T3 und T1-T3) sowie zu den Messzeitpunkten (zu T1, zu T2 und zu T3) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein signifikanter Anstieg ist durch \uparrow und ein signifikanter Abfall durch \downarrow gekennzeichnet. Ist der Gesamtverlauf im Gruppenvergleich signifikant, sind die Symbole doppelt angeführt.

Zur Beantwortung der ersten Frage, ob die proinflammatorischen Zellen unter Lern- und Examenstress supprimiert werden, kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die untersuchten Zellen der angeborenen Immunität, also Monozyten und Natürliche Killerzellen, unter Examenstress – wie bereits in vergleichenden Untersuchungen belegt – eine unterschiedliche Entwicklung vollzogen. Während die Anzahl der mengenmäßig überlegenen, naiven, proinflammatorischen Monozyten in der Erholungsphase anstieg, wurden die in der Zielzelle Apoptose auslösenden Natürlichen Killerzellen unter Stress supprimiert. Die proinflammatorischen Zellen der erworbenen Immunität, also T-Lymphozyten als größte Vertreter mit ihren Untergruppen zytotoxische T-Lymphozyten und die Gesamtzahl der T-Helferzellen zeigten einen Abwärtsentwicklung im Sinne einer deutlichen Immunsuppression. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass diese Veränderung hauptsächlich in der Erholungsphase, sprich nach dem Hammerexamen, stattfand. Überraschenderweise fielen im Gegensatz

dazu die proinflammatorischen T-Helferzellen Typ 17 aus diesem Schema, indem sie einen deutlichen Anstieg zeigten. Auch dies geschah in der Erholungsphase.

Auch die zur Beantwortung der zweiten Frage, nämlich ob antiinflammatorische Zellen unter Examensstress proliferieren, untersuchten Zellen zeigten unterschiedliche Entwicklungen. Die Vertreter der antiinflammatorischen Zellen der angeborenen Immunität, also die nicht-klassischen Monozyten, die als Untergruppe der Monozyten einen höheren Reifegrad haben, waren unter dem chronischen Stress der Lernphase signifikant rückläufig. Diese Entwicklung war gegenläufig zu der der anderen Untergruppen, sodass man schlussfolgern kann, dass in einer Stressreaktion zunehmend naive, proinflammatorische Monozyten proliferieren. Dies geschieht zu Lasten der antiinflammatorischen nicht-klassischen Monozyten. Das Verhältnis der T-Helferzellen Typ 2 als antiinflammatorische Vertreter der adaptiven Immunität im Vergleich zu den proinflammatorischen T-Helferzellen Typ 1 verschob sich bei Betrachtung des Kurvenverlaufes zugunsten der T-Helferzellen Typ 2, ohne dass das Ergebnis signifikant wurde. Die auf die Immunantwort hemmend wirkenden T-regulatorischen Helferzellen zeigten einen erhöhten Aktivitätsgrad, sodass hier von einer zunehmenden Hemmung des Immunsystems unter Examensstress gesprochen werden kann.

Aufgrund der Tatsache, dass die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen mit ihren Unterformen weder in Anzahl noch Aktivierungsstufe eine signifikante Entwicklung unter Examensstress zeigten, kann geschlussfolgert werden, dass die Antigenpräsentation unter Stress somit nicht aktiviert ist, und somit die dritte Hypothese nicht bestätigt werden kann.

Da die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten keine signifikante Veränderung unter Examensstress zeigten, wurde die Hypothese einer verminderten Expression der Zellgruppe nicht bestätigt. Jedoch war der antiinflammatorisch wirksame Acetylcholinrezeptor alpha-7 auf B-Lymphozyten zum dritten Messzeitpunkt signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier ist demzufolge eine antiinflammatorische Immunmodulation unter Stress anzunehmen, sodass die letzte Hypothese bestätigt wurde.

5.2 Die proinflammatorischen Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität unter Examensstress

5.2.1 Entwicklung der Monozyten und des TNF- α auf Monozyten unter Examensstress

Die Monozyten zeigten in der vorliegenden Studie je nach Untergruppe eine unterschiedliche Entwicklung unter kombiniertem akutem und chronischem Stress. In der Studie von Maydych et al aus dem Jahr 2017 wurde eine Suppression der Monozyten unter Examensstress beschrieben. Hier war keine Aufteilung in Subtypen erfolgt und der zweite und letzte Messzeitpunkt fand eine Woche nach dem Examen statt (82). Diese Entwicklung im Sinne einer Reduktion der Monozyten unter dem Stress der Lernphase kann in der vorliegenden Studie als Abwärtstrend aus dem Kurvenverlauf innerhalb der 12 Wochen vor dem Examen abgelesen werden, ohne dass diese signifikant wird. Auch bei Mäusen, die einem chronischen, unberechenbarem Stress (engl. *Chronic unpredictable stress*, CUS) ausgesetzt waren, fand eine Reduktion der Monozytenzahlen statt. In dieser Studie wurde CUS durch ein 10-tägiges Protokoll hervorgerufen, das unter anderem rasch aufeinanderfolgende Beleuchtungswechsel, Positionswechsel des Käfigs, Konfrontation mit Urin eines Fressfeindes und Entzug von Nahrungsmitteln vorsieht (78).

Bei Probanden, die einen Trier Sozial Stress Test (engl. *Trier social stress test*, TSST) absolvieren mussten, kam es zu einer Verschiebung zugunsten der naiven, proinflammatorischen, klassischen Monozyten (83). Der TSST ist ein 1993 entwickeltes Verfahren, das mit einem standardisierten, 15-minütigen Stressprotokoll, bestehend aus einem Bewerbungsgespräch und Rechenübungen, akuten Stress hervorruft (84). Es ist also in der genannten Studie ein Anstieg der Monozyten unter akutem Stress zu verzeichnen. Somit wäre aufgrund der Studienlage ein erhöhter Nachweis der Gesamtzahl der Monozyten unter akutem und eine erniedrigte Zellzahl unter chronischem Stress zu erwarten gewesen. Der signifikante Anstieg der Monozyten in der Erholungsphase in der vorliegenden Studie könnte somit einem Wiederanstieg nach Suppression gleichkommen.

Interessanterweise wurde gezeigt, dass Monozyten in das Gehirn migrieren können, wo sie unter chronischer Stressbelastung psychologische Effekte auf Stimmung und Verhalten, und sogar Angstzustände auslösen können (85, 86). Gemeinsam mit den Th17-Zellen könnten diese somit verantwortlich für die längerfristigen psychologischen Auswirkungen von Stress auf den Menschen sein.

Der stark proinflammatorisch wirksame Tumornekrosefaktor- α wies in der vorliegenden Studie auf Monozyten unter Stress keine entscheidende Veränderung im Gegensatz zur Kontrollgruppe auf. Eine Reduktion unter chronischem Stress wäre aufgrund der Studienlage zu erwarten gewesen (87). Eine detaillierte Untersuchung der Makrophagen und deren Sekretionsverhaltens des stark proinflammatorischen Zytokins TNF- α unter Stress könnte somit als Gegenstand weiterführender Studien interessant sein.

5.2.2 Die Natürlichen Killerzellen unter Stress

Ein signifikanter Abfall der Natürlichen Killerzellen zeigte sich in der Phase des chronischen Stresses vor dem Examen. Diese Entwicklung ist im Konsens mit aktuellen und mit der weiter zurückliegenden, bereits erwähnten Studie von Kiecolt-Glaser et al. zu sehen, die unter vergleichbaren Konditionen ebenfalls eine Reduktion der NK-Zellen des peripheren Blutes beobachteten (71, 82).

Bei der Reaktion auf akuten Stress wird jedoch eine relevante Erhöhung der NK-Zell-Konzentration im peripheren Blut beschrieben. Es wird angenommen, dass dies geschieht, da die Immunzellen zu den Orten im Körper transportiert werden, wo sie am meisten gebraucht werden. Unter Fallschirmspringern wurden die NK-Zellen unmittelbar nach dem Sprung analog zu den Katecholaminen erhöht gemessen, bevor sie eine Stunde später stark bis unter den Ausgangswert abfielen (88). Demnach scheinen die Natürlichen Killerzellen sensible Indikatoren der akuten und chronischen Stressreaktion zu sein.

5.2.3 Die T-Lymphozyten in der Gesamtzahl und deren zugehörige proinflammatorischen Zytokine

Bei der Untersuchung der T-Lymphozyten in der Gesamtheit als größter Vertreter der erworbenen Immunität wurde eine signifikante Entwicklung über den gesamten Messzeitraum im Sinne einer deutlichen Reduktion nachgewiesen. Laut der Metaanalyse durch Segerstrom et al. führte chronischer Stress zu einer Immunsuppression (67), die sich am Beispiel der T-Lymphozyten in der vorliegenden Studie bestätigte.

Akuter Examensstress führte in dem vergleichbaren Modell der Studie von Gloger et al. zu einer Verminderung der T-Lymphozyten-Proliferation unter ansteigendem Cortisolspiegel. Diese Entwicklung bezog sich auf den Zeitraum vor dem Examen (89). Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Studie eine deutliche Reduktion in der Erholungsphase.

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass unter R-SDS T-Zellen im Blut, Thymus, Lymphknoten und Milz entscheidend vermindert wurden. Die Zellzahl wurde auch im Knochenmark verringert, außerdem gingen T-Zellen mutmaßlich durch die erhöhte Glukokortikoidkonzentration in Apoptose (90). Auch in der bereits zuvor zitierten Studie konnte unter CUS im Mausmodell eine Reduktion der Lymphozytenzahl festgestellt werden (78).

Möglicherweise zeigt sich das Ausmaß des Rückganges der T-Zellen in der Kombination des chronischen Stresses vor dem Examen und des akuten naturalistischen Stresses während des Examens erst mit ein paar Wochen Verzögerung. Ob und wie zeitig die Zellzahlen der T-Lymphozyten nach der Erholungsphase wieder Normalwerte erreichen, konnte mit dieser Studie nicht erfasst werden. Um die Entwicklung der Zellpopulation nach dem dritten Messzeitpunkt zu untersuchen, wäre eine weitere Studie mit einem vierten Zeitpunkt interessant.

5.2.4 Die zytotoxischen T-Lymphozyten unter Examensstress

Die zytotoxischen, CD8-positiven T-Lymphozyten wiesen in der hier diskutierten Studie eine signifikante Reduktion innerhalb der Erholungsphase nach dem Examen auf. Dass kombinierter akuter und chronischer Stress eine Reduktion der CTL verursacht, steht im

Zusammenhang mit der bereits zuvor zitierten globalen Immunsuppression unter chronischem Stress (91). Sommershof et al. bestätigten dies am Mausmodell, in dem sechs Tage anhaltender chronischer sozialer Stress die Konzentration der zytotoxischen T-Lymphozyten signifikant reduzierten. Zudem wurde die Fähigkeit der Migration dieser Zellgruppe beeinträchtigt (92).

Auch im Mausmodell konnte unter sowohl psychologischen als auch physiologischem Stress, dem die Mäuse für eine Woche ausgesetzt waren, eine Reduktion der Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden (93). Auch tumor-spezifische CD8-positive T-Lymphozyten waren unter chronischem sozialem Stress bei Mäusen supprimiert nachweisbar. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass tumorspezifische Immuntherapien durch chronischen Stress negativ beeinflussbar sein könnten (94).

5.2.5 Die T-Helferzellen Typ 1 und Typ 17 sowie deren zugeordnete Zytokine IFN- γ , IL-17 und TNF- α unter Examensstress

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine eindeutig signifikante Entwicklung der Gesamtzahl der CD4-positiven T-Helferzellen im Sinne einer Reduktion der Stressgruppe über den Messzeitraum von 24 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch im Mausmodell fand sich eine deutliche Reduktion der naiven CD4-positiven T-Helferzellen bei chronischem physischem und psychischem Stress (95). Hierbei konnte zwar eine verminderte Zellzahl nachgewiesen werden, es kam jedoch zu einer gesteigerten Differenzierung der Helferzellen zu Th1, Th2 und Th17-Zellen (96, 97). Dies geschieht über die vermehrte Freisetzung der korrespondierenden Zytokine: das zu den T-Helferzellen Typ 1 gehörige IFN- γ , das unter anderem von Monozyten produzierte TNF- α und die den T-Helferzellen Typ 2 zugeordneten Zytokine IL-4 und IL-10 sowie das den T-Helferzellen zugeordnete IL-17 (98).

Bei Menschen wurden in mehreren Studien bei kurzem, naturalistischen Stress einer akademischen Prüfung ein sogenannter „Th1-Th2-Shift“, also eine Verschiebung der Zellverhältnisse der adaptiven Immunität von zellulär zu humoral beschrieben, wobei es nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Zellzahlen kam, sondern lediglich zu einer Verschiebung der zugehörigen Zytokine. Dabei konnte die Herabregulierung des proinflammatorischen IFN- γ und die vermehrte Expression des antiinflammatorischen

IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden (67, 99). Auch Arrej M. Assaf et al. fanden in ihrer Studie von 2017 bei Medizinstudenten unter Examensstress eine entsprechende Entwicklung der Verhältnisse der Th1- und Th2-Zytokine und vermuteten eine erhöhte Empfindlichkeit der Studenten bezüglich einer Infektionserkrankung während der Lernphase (100). In der vorliegenden Studie war zwar die Entwicklung der Th1- und Th2-Zellen nicht signifikant, jedoch deutete sich der Th1-Th2-Shift als Trend an.

Auch die untersuchten Zytokine zeigten zwar keine signifikante Entwicklung, jedoch eine angedeutete Verschiebung zugunsten des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 und ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigtes Niveau des proinflammatorischen TNF- α . Eine weiterführende Untersuchung der Entwicklung der pro- und antiinflammatorischen Zytokine unter Examensstress könnte sicherlich spannende Erkenntnisse bringen, da mehrere Studien vermuten, dass auch die Zytokine in der durch Glukokortikoide und Katecholamine vermittelten Stressreaktion die Produktion der proinflammatorischen Zytokine hemmen und die der antiinflammatorischen fördern (101, 102).

Der Verlauf der T-Helferzellen Typ 17 wurde in dieser Studie signifikant, wobei die Zellen insbesondere in der Erholungsphase deutlich anstiegen. Diese Entwicklung passt zu einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2019, die eine Zunahme der Th17-Zellen unter chronischem R-SDS im Mausmodell nachweisen konnten (103).

Interessant ist außerdem, dass der Anstieg der Th17-Zellen äquivalent zum Anstieg der Monozyten nach dem Examen war. Da die Monozyten nicht nur in der Aktivierung, sondern auch der Proliferation der Th-17 Zellen eine Rolle spielen, könnte ein Zusammenhang in der parallelen Entwicklung bestehen. Zudem fiel möglicherweise der inhibitorische Einfluss durch die TH1-Zellen unter Stress weg, sodass die Th17-Zellen auch nach dem Examen noch anstiegen. Welche Rolle die TH17-Zellen unter akutem und chronischem Stress spielen, sollte sicherlich noch Gegenstand weiterer Forschungstätigkeit sein. Unter Anderem vermutet die o.g. Studie in den Th17-Zellen einen Einflussfaktor bei der Entstehung einer Depression unter Stress.

Betrachtet man die aktivierten T-Helferzellen isoliert, fällt das starke Absinken der Kurve vor dem Examen und der anschließende Anstieg in der Erholungsphase auf. Dieser

Verlauf zeigte sich zwar signifikant, jedoch verlief die Kontrollgruppe annähernd parallel zu dieser Kurve und war ebenfalls signifikant.

Diese Entwicklung ist vergleichbar mit dem Verlauf der T-Helferzellen Typ 1 und könnte durch jahreszeitliche Einflussfaktoren bedingt sein, der die Kontrollgruppe ebenfalls ausgesetzt ist. Ein Beispiel hierfür sind Allergien und ihre Entstehung durch Wechselwirkungen der T-Helferzellen und T-regulatorischen Zellen (104, 105).

5.3 Die antiinflammatorischen Zellen und Zytokine der angeborenen und erworbenen Immunität

5.3.1 Die nicht-klassischen Monozyten

Die nicht-klassischen Monozyten, die einen höheren Reifegrad besitzen und antiinflammatorisch wirksam werden, starteten nicht nur von einem signifikant höheren Niveau als die Kontrollgruppe, sondern zeigten einen deutlichen Abwärtstrend in der Lernphase. Wie bereits zuvor erwähnt, kommt es unter einer akuten Stressreaktion zu einer Reduktion der nicht-klassischen Monozyten zugunsten der klassischen Monozyten, die in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte (83).

5.3.2 Die T-Helferzellen Typ 2 und das antiinflammatorische Zytokin IL-4

Durch Stress-induzierte Glukokortikoid-Ausschüttung kommt es durch die Suppression der T-regulatorischen Zellaktivität zu einer verstärkten Th-2-Immunantwort. Auch hier wäre aus der Literatur also ein Th1-Th2-Shift zu erwarten gewesen, der sich in der vorliegenden Studie durch leicht erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe andeutet. Miyasaka et al. vermuten eine Th-2 und Th-17 assoziierte und durch die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 vermittelte Stressreaktion, allergisches Asthma bei Menschen und Nagetieren hervorrufen kann (106). Hier wäre die Fokussierung auf die Interaktion der Zellgruppen und Zytokine auf der Suche nach dem Zusammenhang zwischen Stress und der Entstehung autoimmuner Erkrankungen in weiteren Studien wegweisend.

5.3.3 Die naiven und Memory T-regulatorischen Lymphozyten und der intrazelluläre FoxP3-Transkriptionsfaktor

Die T-regulatorischen Zellen stiegen in der hier diskutierten Arbeit im Zeitraum nach dem Examen an. Dabei unterschieden sie sich jedoch nicht signifikant von der Kontrollgruppe, die ebenfalls eine signifikante Entwicklung vollzog und nach dem Examen vermehrte T-regulatorische Zellen messbar waren. Auch hier sind möglicherweise wie bei den aktivierten T-Helferzellen jahreszeitlichen Einflussgrößen wie Allergene oder virale Infektionen verantwortlich. Auf genetischer Ebene ist keine Veränderung nachweisbar, denn der FoxP3-Transkriptionsfaktor zeigte keine signifikante Veränderung über den Untersuchungszeitraum.

Aufgrund der aktuellen Studienlage wäre eine Reduktion der Zellpopulation unter akutem Stress zu erwarten gewesen. Dies war das Ergebnis einer vergleichenden Studie, die bei männlichen Medizinstudenten einen 12-minütigen, standardisierten, psychologischen Stresstest durchführten (107). Chronischer Stress hingegen führte zu einer Hemmung des Immunsystems durch den Anstieg der stark antiinflammatorisch wirkenden T-regulatorischen Zellen. Dies wurde in einer Studie von 2018 unter virtuellen sozialen Stressoren in Kombination mit erhöhten Th-17- und erniedrigten NK-Zellzahlen nachgewiesen (108).

In einer Studie an Kriegsveteranen mit einer posttraumatischen Belastungsstörung wurde hingegen eine vermehrte Expression einer Untergruppe der Tregs, die eine geringere Hemmung des Immunsystems auszulösen scheint, nachgewiesen. Dies wird in Zusammenhang mit einer vermehrten Prävalenz von Autoimmunerkrankungen gebracht (109). Diese Erkenntnisse sollten zu weiterführenden Studien am Menschen ermutigen, die eine weitere Differenzierung dieser Zellgruppe und deren Reaktion unter akuten und chronischen Stressoren beleuchten, da es offenbar zu unterschiedlichen Entwicklungen kommt.

Am Mausmodell wurde eine ähnliche Kinetik unter chronischem Stress im Sinne einer Hochregulierung der T-regulatorischen Zellen nachgewiesen. Hier kam es bei Mäusen, die drei Wochen in einer beengten Behausung zubrachten, zu einem signifikanten Anstieg der Tregs und passend dazu zu einer verminderten Funktionalität der APC und T-Zellen (110). In der bereits weiter oben erwähnten Studie an Mäusen unter

chronischem R-SDS kam es im Zusammenhang mit dem Anstieg der Th17-Zellen zu einer Reduktion der T-regulatorischen Zellen (103). Auch bei der bei Mäusen durch chronischen, unberechenbarem milden Stress (engl. *Chronic unpredictable mild stress*, CUMS) ausgelöste Depression wird in Zusammenhang mit einer Th2/Th17-Dysbalance assoziiert (111). Eine gezielte Untersuchung der Wechselwirkung von T-regulatorischen und Th17-Zellen unter Stress und deren Einfluss auf die Entstehung von Depressionen könnte somit das Thema einer interessanten, weiterführenden Studie sein.

Auch wenn keine signifikante Entwicklung der T-regulatorischen T-Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe in der vorliegenden Studie bewiesen werden konnte, zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied im Aktivierungsgrad dieser Zellgruppe. Das Verhältnis verschob sich, betrachtet man isoliert den Marker CCR4, in der Stressgruppe zum Examenszeitpunkt signifikant zugunsten der T-regulatorischen Memory-Zellen. Die naiven, CCR4-negativen, T-regulatorischen Zellen sind dazu antiproportional vermindert nachweisbar. Dies deutet auf eine gesteigerte Aktivierung durch Reifung der T-regulatorischen Zellen unter akutem Stress hin und ist möglicherweise neben anderen immunregulatorischen Mechanismen für die Hemmung der Aktivität der CD8-positiven T-Lymphozyten verantwortlich.

In einer japanischen Studie aus dem Jahr 2000 wurde die Entwicklung der Tregs unter Arbeitsstress untersucht. Dabei wurden die naiven T-Lymphozyten, die durch den Marker CD45RA identifiziert wurden, deutlich supprimiert (112). Warum in der vorliegenden Studie lediglich die Aktivierungsstufe, die durch den CCR4-Rezeptor im Gegensatz zum CD45RA-Rezeptor charakterisiert wird, signifikant wurde, ist unklar und könnte als Fragestellung Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung der Aktivierungsstufen T-regulatorischer Lymphozyten unter Stress sein.

5.4 Aktivierte und nicht-aktivierte plasmazytoide und myeloide Dendritische Zellen Typ 1 und 2

Dendritische Zellen reagieren als Aktivatoren der adaptiven Immunantwort nicht nur sehr sensibel auf physischen, sondern auch auf psychischen Stress. Es kommt zu einer Aktivierung der Zellgruppe (113). In der vorliegenden Studie deutet die Verteilung der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) mit insgesamt erhöhten Werten sowie der

Anstieg der myeloiden dendritischen Zellen Typ 1 (mDC1) und Typ 2 (mDC2) über den Messzeitraum zwar eine steigende Tendenz an, die jedoch nicht evident wird. Unter psychologischem Stress wurde sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen bei einer Kontakt-Hypersensitivierung der Haut oder einer Impfung festgestellt, dass es zu einer erhöhten DC-Migration zu den naheliegenden Lymphknoten kam und somit zu einer verstärkten CD8+ T-Zell-Antwort, ohne dass eine Zellzahlvermehrung beschrieben wurde (114, 115). Vergleichende Studien am Menschen beschreiben zwar eine Steigerung der DC-Zahl unter Stress, diese manifestiert sich jedoch nur unter physischer Belastung, beispielsweise während einer chirurgischer Behandlung oder einer körperlichen Betätigung auf dem Laufband (116).

Es wird ein Zusammenhang zwischen der bereits weiter oben beschriebenen Suppression der CD8-positiven T-Lymphozyten unter chronischem Stress und der Aktivierungsform der dendritischen Zellen vermutet (94). Ob dieser Effekt über die Hemmung oder Förderung der Zellreifung der dendritischen Zellen vermittelt wird, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein. Da eine korrekte Messung der DC und deren Differenzierung in die Reifestadien aufgrund der sehr geringen Zellzahlen problematisch ist, wäre eine erneute Untersuchung mithilfe größerer Zellzahlen hier zielführend.

Überraschenderweise kam es in der Kontrollgruppe der mDC1 und mDC2 zu einer Verschiebung hin zur aktivierten Form, ohne dass die Stressgruppe signifikant wurde. Unter jahreszeitlichen Einflüssen wie der Influenza-Infektion kommt es zur DC-Zell-Reifung, sodass aus den vorliegenden Daten interpretiert werden könnte, dass es unter Stress zu einer Hemmung der Aktivierung der mDC gekommen sein könnte (117).

5.5 Verlauf der B-Lymphozyten unter Examensstress

Examensstress unter Studenten führte laut einer Studie aus dem Jahr 2016 zu einem signifikanten Abfall der Zellzahlen antipropotional zum Anstieg des Cortisollevels (118). Eine Entwicklung, die sich bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der vorliegenden Untersuchung andeutet, ohne dass diese evident wurde.

Im Mausmodell in der 2001 veröffentlichten Studie von Domínguez-Gerpe und Rey-Méndez wurde bereits statuiert, dass durch chronischen Stress bei Mäusen eine signifikante Änderung der T-Lymphozyten stattfindet, es jedoch lediglich zu einem leichten Abfall der B-Lymphozyten kommt (119). In der chronischen Stressreaktion scheint es vielmehr zu einer Umverteilung der Zellen zu kommen. In einer Studie von Engler et al. aus dem Jahr 2004 wird im Mausmodell beschrieben, dass wiederholter sozialer Stress (R-SDS), eine Reduktion der B-Lymphozyten im Knochenmark und Blut und ein Anstieg dieser Zellgruppe in der Milz verursacht (90). Doch nicht nur die Verteilung der Zellen in den verschiedenen immunaktiven Kompartimenten des Körpers, sondern auch das Reifestadium scheint sich unter Stress zu verschieben. In eine Studie von 2017 wurde bei mittels CUMS gestressten Mäusen ein Anstieg der naiven und Verminderung der gereiften B-Lymphozyten nachgewiesen (120).

5.6 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor alpha-7 auf T- und B-Lymphozyten, T-Helferzellen, NK-Zellen und Monozyten

Bei der Untersuchung des antiinflammatorisch wirksamen **Acetylcholinrezeptors alpha-7 auf B-Lymphozyten** zeigte sich eine signifikant erniedrigte Expression des Rezeptors zum dritten Messzeitpunkt, das heißt in der Erholungsphase nach dem Examen. Diese Phase ließe also durch den verminderten Einfluss des antiinflammatorischen Rezeptors eine Proliferation und Zunahme der Antikörperproduktion der B-Lymphozyten zu.

Im Mausmodell konnte unter Stress hingegen eine Hochregulierung des AChR α 7 nachgewiesen werden. Diese Entwicklung hatte wiederum eine verminderte Expression der pro- und eine erhöhte Expression der antiinflammatorischen Zytokine zur Folge, sodass der Rezeptor im Rahmen der Immunantwort unter Stress eine immunsuppressive Rolle zu übernehmen schien (64, 121). Die erhöhten Acetylcholinrezeptorspiegel unter Stress zeigten im Mausmodell auch zentral seine Wirkung. Dieser Effekt steht im Zusammenhang mit der Entwicklung einer depressiven Symptomatik (122).

Da sich bislang nur wenige Studien mit der Reaktion des Acetylcholinrezeptors auf Immunzellen unter Stress befasst haben, wären weiterführende Untersuchungen aufschlussreich, um ein besseres Verständnis dieser Immunregulation zu erlangen.

5.7 Einschränkung der Studie

Für die Auswertung der vorliegenden Studie ist es unverzichtbar, die zeitliche Abfolge der Blutentnahmen zu berücksichtigen. Wir setzten bei Festlegung der Zeitpunkte voraus, dass die Probenentnahme am zweiten Zeitpunkt, also in den beiden Wochen nach dem schriftlichen Examen und vor der mündlichen Prüfung, sowohl die chronische Stressreaktion der vorangegangenen Wochen im Vergleich zum ersten Zeitpunkt einerseits als auch die akute Stressreaktion kurz nach der schriftlichen Prüfung, also dem Maximum der Stressreaktion widerspiegelt.

Innerhalb von Minuten kommt es unter akutem Stress zu einer Mobilisation der Lymphozyten in das Blut, bevor diese nach Stunden wiederum in die Kompartimente des Körpers, hauptsächlich in die Haut, die Lunge und die lymphatischen Organe, umverteilt werden, wo die Zellen ihrer Funktion nachgehen können. Insofern ist bei der Vergleichbarkeit mit anderen Studien entscheidend, zu welchem Zeitpunkt die Messung stattgefunden hat. Eine frühe Messung wird am ehesten den Anstieg, eine späte Messung eher den Abfall der Zellen dokumentieren. Dies erklärt die Unterschiede in den Studien sowohl am Menschen, als auch bei Nagetieren (74).

Die dendritischen Zellen sind physiologischerweise mit geringen Prozentzahlen im peripheren Blut nachweisbar und bewegen sich in der vorliegenden Studie im Bereich unter einem Prozent. Es ist nachvollziehbar, dass diese Messungen weniger genau ausfallen als beispielsweise bei der Bestimmung der CD3+ Lymphozyten. Erschwerend kommt hinzu, dass für die DC-Messung aus bereits oben erwähnten Gründen weniger Proben zur Verfügung standen.

Bei der Beurteilung der TH-Zellen Typ 1, 2 und 17 sowie FoxP3 ist zu beachten, dass die Färbung intrazellulär stattfand. Durch den komplexen Färbemechanismus mit Permeabilisierung der Zellen und langwierigen Arbeitsschritten ist gegebenenfalls ein

höherer Zellverlust zu beachten, der sich wiederum in der Messgenauigkeit widerspiegelt.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte Veränderungen in der Verteilung der Immunzellpopulationen, deren Subtypen und Aktivierungsstufen unter kombiniertem chronischem und akutem Stress beweisen. Eine Unterdrückung der proinflammatorischen zellulären Immunantwort unter der kombinierten Stressbelastung wurde an dem signifikanten Abfall der Gesamtzahl der T-Lymphozyten, zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und der NK-Zellen deutlich. Ein interessantes Ergebnis ist der signifikante Anstieg der bisher wenig unter Stresseinfluss untersuchten, proinflammatorischen T-Helferzellen Typ 17. Diese Entwicklung zeigte sich in der Erholungsphase nach dem Examen und fand analog zu der Entwicklung der proinflammatorischen klassischen Monozyten, die in funktionellem Zusammenhang mit den Th17-Zellen stehen, statt. Diese Entdeckung erhärtet die Annahme, dass diese Zellgruppe einen entscheidenden Trigger für unterschiedliche stress-assoziierte Erkrankungen verantwortlich sein könnte, zumindest aber eine entscheidende Rolle in der Stressreaktion spielt.

Die antiinflammatorisch wirksamen T-regulatorischen Zellen wurden zum Examenszeitpunkt aktiviert. Demzufolge üben sie unter dem kombinierten chronischen und akuten Stress einer Examensprüfung eine immunmodulatorische Wirkung aus. Dies zeigt sich an der Suppression der o.g. proinflammatorischen Zellen.

Der antiinflammatorische Einfluss des Acetylcholinrezeptors auf die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten nimmt in der Erholungsphase ab, ohne dass sich die Zellzahlen der B-Zellen über den Messzeitraum verändern. Es ist folglich eine antiinflammatorische Immunmodulation der humoralen Immunreaktion durch den Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ unter Stress anzunehmen.

Die Alteration des Immunsystems durch Stress kann schwere gesundheitliche Folgen mit sich bringen (123) und spielt in Zeiten des sogenannten „Burn-outs“ nicht nur in den westlichen Industrienationen eine übergeordnete Rolle. Das frühzeitige Erkennen der

Symptome und der seelische Ausgleich durch Hypnose oder Yoga-Praxis kann eine positive Auswirkung auf die immunologische Dysregulation haben (124, 125) und sollte in Therapien und Prävention in Zukunft einen größeren Stellenwert am Arbeitsplatz, in der Schule oder im Gesundheitssystem einnehmen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass chronischer Stress, im Sinne der Lernphase in Vorbereitung auf die Teilnahme am sogenannten Hammerexamen, kombiniert mit akutem Stress, also der Examensprüfung, bei Medizinstudentinnen bedeutende Veränderungen in der Verteilung der Immunzellpopulationen, deren Subtypen und Aktivierungsstufen hervorruft.

Gewählt wurden für die vorliegende Studie sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zellpopulationen mitsamt Zytokinen und einem ausgewählten Rezeptor, der sich an der Oberfläche einer Handvoll Immunzellen findet und dort immunmodulatorische Aufgaben übernimmt. Diese Variablen wurden nun bei Medizinstudentinnen mit vergleichbarem sozioökonomischem Status unter Examensstress über einen Zeitraum von 24 Wochen untersucht.

Die vorliegende Studie bestätigt die aktuelle Studienlage, dass kombinierter chronischer und akuter Stress zu einer Unterdrückung der proinflammatorischen zellulären Immunantwort führt. Dies ist verdeutlicht an dem signifikanten Abfall der CD3-positiven T-Lymphozyten, zytotoxischen T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen. Die Gesamtzahl der T-Helferzellen scheint ebenfalls der globalen Immunsuppression unter chronischem Stress zu unterliegen.

Als interessantes Ergebnis konnten wir herausarbeiten, dass die proinflammatorischen Th17-Zellen unter dem kombinierten akuten und chronischen Stress insgesamt anstiegen. Dies geschah in der Erholungsphase nach dem Examen und äquivalent zu dem Anstieg der klassischen, proinflammatorischen Monozyten, die mitunter für die Aktivierung dieser Zellgruppe zuständig sind. Inwiefern diese Zellgruppe einen Einflussfaktor beispielsweise bei der Entstehung einer Depression unter Stress darstellt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die antiinflammatorisch wirksamen T-regulatorischen Zellen wurden unter akutem Stress vermehrt in ihre aktivierte Form der Memory T-regulatorischen Zellen überführt, ohne dass sie proliferierten oder der FoxP3-Transkriptionsfaktor vermehrt exprimiert wurde. Diese Ergebnisse suggerieren, dass antiinflammatorische Mechanismen durch

die aktivierten T-regulatorischen Memory-Zellen, unter akutem Stress vermehrt zu Einsatz kommen und in Zusammenhang stehen mit einer Hemmung der bereits oben genannten, proinflammatorischen Zellen.

Der antiinflammatorisch wirksame Acetylcholinrezeptor alpha-7 zeigte auf B-Lymphozyten als Vertreter der humoralen Immunantwort zum Ende der Prüfungsphase eine deutlich erniedrigte Expression, ohne dass sich die Zellzahlen der B-Zellen veränderten. Dieser Mechanismus, also der Wegfall der antiinflammatorischen Effekte des Rezeptors, könnte mitunter dafür verantwortlich sein, eine Antikörperproduktion der B-Lymphozyten in der Phase nach einer Stressreaktion möglich zu machen. Dieser Zusammenhang könnte in weiteren Studien untersucht werden.

Bei der Untersuchung der Zytokine Interferon gamma, Interleukin-4 und -17 sowie TNF- α konnte keine signifikante Entwicklung im Sinne eines in der Literatur beschriebenen Anstieges der antiinflammatorischen und Abfall der proinflammatorischen Zytokine unter Stress verzeichnet werden. Auch die plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen wurden unter kombiniertem chronischem und akutem Stress weder vermehrt noch vermindert aktiviert. Hierbei war möglicherweise die geringe Stichprobenanzahl für ungenaue Messungen verantwortlich. Eine größere Teilnehmerzahl könnte einen hier wahrscheinlich stattgefundenen Zellverlust während der intrazellulären Färbung kompensieren und wäre für weitere Studien ratsam.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science; ©2012.
2. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963):291–5.
3. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(11):2563–82.
4. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S3-23.
5. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsí V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Ugucioni M, Warren H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 2005; 106(9):3123–6.
6. Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd ed. Boston; 1990.
7. CHAFFEY N. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell*. 4th edn. *Annals of Botany* 2003; 91(3):401.
8. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126(1):32–41.
9. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol* 2019; 234(6):8509–21.
10. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003; 19(5):641–4.
11. Oriss TB, McCarthy SA, Morel BF, Campana MA, Morel PA. Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *J. Immunol.* 1997; 158(8):3666–72.
12. Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84(4):973–80.
13. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:925135.
14. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008; 180(9):5771–7.
15. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res* 2014; 58(2-3):193–210.
16. Sundrud MS, Trivigno C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin. Immunol.* 2013; 25(4):263–72.
17. Beurel E, Harrington LE, Jope RS. Inflammatory T helper 17 cells promote depression-like behavior in mice. *Biol Psychiatry* 2013; 73(7):622–30.
18. Curotto de Lafaille, Maria A., Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 2009; 30(5):626–35. Available from: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476130900199X>.
19. Li MO, Rudensky AY. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16(4):220–33.

20. Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, Ziegelbauer J, Yassai M, Li S-H, Relland LM, Wise PM, Chen A, Zheng Y-Q, Simpson PM, Gorski J, Salzman NH, Hessner MJ, Chatila TA, Williams CB. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 2011; 35(1):109–22.
21. Buckner JH, Ziegler SF. Functional analysis of FOXP3. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1143:151–69.
22. Li X, Zheng Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends in Immunology* 2015; 36(6):344–53.
23. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, Li M, Leng X, Li X. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation* 2012; 35(6):1773–80.
24. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(7):490–500.
25. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci* 2018; 19(3).
26. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(12):849–59.
27. Campbell DJ. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *J. Immunol.* 2015; 195(6):2507–13.
28. Molinaro R, Pecli C, Guilherme RF, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Canetti C, Kunkel SL, Bozza MT, Benjamim CF. CCR4 Controls the Suppressive Effects of Regulatory T Cells on Early and Late Events during Severe Sepsis. *PLoS ONE* 2015; 10(7):e0133227.
29. Baatar D, Olkhanud P, Sumitomo K, Taub D, Gress R, Biragyn A. Human Peripheral Blood T Regulatory Cells (Tregs), Functionally Primed CCR4+ Tregs and Unprimed CCR4- Tregs, Regulate Effector T Cells Using FasL. *The Journal of Immunology* 2007; 178(8):4891–900.
30. Asokan R, Banda NK, Szakonyi G, Chen XS, Holers VM. Human complement receptor 2 (CR2/CD21) as a receptor for DNA: implications for its roles in the immune response and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Mol Immunol* 2013; 53(1-2):99–110.
31. Niiri H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2(12):945–56.
32. Bishop GA. B cell-T cell interaction: antigen bridge to antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16(8):467.
33. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11(1):137–54.
34. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends in Immunology* 2013; 34(12):573–82.
35. Beziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadiere B, Debre P, Vieillard V. CD56brightCD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 2011; 186(12):6753–61.
36. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 2001; 22(11):633–40.
37. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; 331(6013):44–9.
38. Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J, Jacobs N. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 152(2):219–26.

39. Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends in Immunology* 2005; 26(12):668–75.
40. Watzl C. How to trigger a killer: Modulation of natural killer cell reactivity on many levels. *Adv Immunol* 2014; 124:137–70.
41. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990; 11(7):237–44.
42. Freeman AJ, Vervoort SJ, Ramsbottom KM, Kelly MJ, Michie J, Pijpers L, Johnstone RW, Kearney CJ, Oliaro J. Natural Killer Cells Suppress T Cell-Associated Tumor Immune Evasion. *Cell Rep* 2019; 28(11):2784-2794.e5.
43. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells In Vivo. *Immunity* 1999; 11(6):753–61.
44. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 1985; 135(3):2069–73.
45. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 2014; 5:491.
46. Sohlberg E, Saghafian-Hedengren S, Bremme K, Sverremark-Ekström E. Cord blood monocyte subsets are similar to adult and show potent peptidoglycan-stimulated cytokine responses. *Immunology* 2011; 133(1):41–50.
47. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen, Pieter J M, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116(16):e74-80.
48. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 81(3):584–92.
49. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol* 2018; 9:1726.
50. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2019; 37:439–56.
51. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973; 137(5):1142–62.
52. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673):245–52.
53. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21:685–711.
54. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J. Immunother.* 2008; 31(9):793–805.
55. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:767–811.
56. Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 2004; 5(12):1219–26.
57. Deng B, Lin Y, Chen Y, Ma S, Cai Q, Wang W, Li B, Liu T, Zhou P, He R, Ding F. Plasmacytoid dendritic cells promote acute kidney injury by producing interferon- α . *Cell Mol Immunol* 2020.

58. Chistiakov DA, Orekhov AN, Sobenin IA, Bobryshev YV. Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front Physiol* 2014; 5:279.
59. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; 140(1):22–30.
60. Lichtenegger FS, Mueller K, Otte B, Beck B, Hiddemann W, Schendel DJ, Subklewe M. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells. *PLoS ONE* 2012; 7(9):e44266.
61. Zdanowski R, Krzyzowska M, Ujazdowska D, Lewicka A, Lewicki S. Role of alpha7 nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. *Cent Eur J Immunol* 2015; 40(3):373–9.
62. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on alpha7 nAChRs. *Int Immunopharmacol* 2015; 29(1):127–34.
63. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol* 2017; 8:1085.
64. Koval LM, Yu Lykhmus O, Omelchenko DM, Komisarenko SV, Skok MV. The role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation. *Ukr Biokhim Zh* (1999) 2009; 81(4):5–11.
65. Koval L, Lykhmus O, Zhmak M, Khruschov A, Tsetlin V, Magrini E, Viola A, Chernyavsky A, Qian J, Grando S. Differential involvement of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011; 43(4):516–24.
66. Elliott GR, Eisdorfer C. Stress and human health: Analysis and implications of research : a study. New York: Springer Pub. Co.; ©1982. (Springer series on psychiatry; vol 1).
67. Segerstrom SC, Miller GE. Segerstrom - Psychological Stress and the Human Immune System A Meta-analytic study of 39 years of inquiry // Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychological Bulletin* 2004; 130(4):601–30.
68. Santha P, Veszelka S, Hoyk Z, Meszaros M, Walter FR, Toth AE, Kiss L, Kincses A, Olah Z, Seprenyi G, Rakhely G, Der A, Pakaski M, Kalman J, Kittel A, Deli MA. Restraint Stress-Induced Morphological Changes at the Blood-Brain Barrier in Adult Rats. *Front Mol Neurosci* 2015; 8:88.
69. Hollis F, Kabbaj M. Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J* 2014; 55(2):221–32.
70. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998; 10(2):230–1.
71. Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosomatic Medicine* 1984; 46(1):7–14.
72. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93(7):3043–7.
73. Cohen S, Miller GE, Rabin BS. Psychological stress and antibody response to immunization: a critical review of the human literature. *Psychosomatic Medicine* 2001; 63(1):7–18.
74. Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones – Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 2012 [cited 2014 Jan 22]; 37(9):1345–68.
75. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011; 334(6052):98–101.

76. Baez-Pagan CA, Delgado-Velez M, Lasalde-Dominicci JA. Activation of the Macrophage alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 2015; 10(3):468–76.
77. Hoover DB. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacol Ther* 2017; 179:1–16.
78. McDonald LT, Lopez MF, Helke KL, McCrackin MA, Cray JJ, Becker HC, LaRue AC. Early Blood Profile of C57BL/6 Mice Exposed to Chronic Unpredictable Stress. *Front Psychiatry* 2019; 10:230.
79. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Coll Dent* 2014; 81(3):14–8.
80. Peters EMJ, Müller Y, Snaga W, Fliege H, Reißhauer A, Schmidt-Rose T, Max H, Schweiger D, Rose M, Kruse J. Hair and stress: A pilot study of hair and cytokine balance alteration in healthy young women under major exam stress. *PLoS ONE* 2017; 12(4):e0175904.
81. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. (Experimentator).
82. Maydych V, Claus M, Dychus N, Ebel M, Damaschke J, Diestel S, Wolf OT, Kleinsorge T, Watzl C. Impact of chronic and acute academic stress on lymphocyte subsets and monocyte function. *PLoS ONE* 2017; 12(11):e0188108.
83. Schwaiger M, Grinberg M, Moser D, Zang JCS, Heinrichs M, Hengstler JG, Rahnenführer J, Cole S, Kumsta R. Altered Stress-Induced Regulation of Genes in Monocytes in Adults with a History of Childhood Adversity. *Neuropsychopharmacology* 2016; 41(10):2530–40.
84. Kirschbaum C, Pirke KM, Hellhammer DH. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* 1993; 28(1-2):76–81.
85. Wohleb ES, McKim DB, Sheridan JF, Godbout JP. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: A novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front Neurosci* 2014; 8:447.
86. Wohleb ES, Delpech J-C. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017; 79(Pt A):40–8.
87. Chandrashekara S, Jayashree K, Veeranna HB, Vadiraj HS, Ramesh MN, Shobha A, Sarvanan Y, Vikram YK. Effects of anxiety on TNF-alpha levels during psychological stress. *J Psychosom Res* 2007; 63(1):65–9.
88. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity* 1997; 11(4):286–306.
89. Gloger S, Puente J, Arias P, Fischman P, Caldumbide I, Gonzalez R, Quiroz J, Echavarri O, Ramirez C. Respuesta inmune disminuida por estres academico intenso: cambios de la proliferacion linfocitaria en estudiantes de medicina. *Rev Med Chil* 1997; 125(6):665–70.
90. Engler H, Bailey MT, Engler A, Sheridan JF. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *Journal of Neuroimmunology* 2004; 148(1-2):106–15.
91. Evans DL, Leserman J, Perkins DO, Stern RA, Murphy C, Tamul K, Liao D, van der Horst CM, Hall CD, Folds JD. Stress-associated reductions of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells in asymptomatic HIV infection. *Am J Psychiatry* 1995; 152(4):543–50.
92. Sommershof A, Basler M, Riether C, Engler H, Groettrup M. Attenuation of the cytotoxic T lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus in mice subjected to chronic social stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 2011; 25(2):340–8.

93. Li Q, Liang Z, Nakadai A, Kawada T. Effect of electric foot shock and psychological stress on activities of murine splenic natural killer and lymphokine-activated killer cells, cytotoxic T lymphocytes, natural killer receptors and mRNA transcripts for granzymes and perforin. *Stress* 2005; 8(2):107–16.
94. Sommershof A, Scheuermann L, Koerner J, Groettrup M. Chronic stress suppresses anti-tumor TCD8+ responses and tumor regression following cancer immunotherapy in a mouse model of melanoma. *Brain, Behavior, and Immunity* 2017; 65:140–9.
95. Guan S-z, Liu J-w, Fang EF, Ng TB, Lian Y-l, Ge H. Chronic unpredictable mild stress impairs erythrocyte immune function and changes T-lymphocyte subsets in a rat model of stress-induced depression. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37(1):414–22.
96. Werbner M, Barsheshet Y, Werbner N, Zigdon M, Averbuch I, Ziv O, Brant B, Elliot E, Gelberg S, Titelbaum M, Koren O, Avni O. Social-Stress-Responsive Microbiota Induces Stimulation of Self-Reactive Effector T Helper Cells. *mSystems* 2019; 4(4).
97. Frick LR, Barreiro Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, Genaro AM, Cremaschi GA. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress* 2009; 12(2):134–43.
98. Zhao J, Liu J, Denney J, Li C, Li F, Chang F, Chen M, Yin D. TLR2 Involved in Naive CD4+ T Cells Rescues Stress-Induced Immune Suppression by Regulating Th1/Th2 and Th17. *Neuroimmunomodulation* 2015; 22(5):328–36.
99. Kang D-H, Fox C. Th1 and Th2 cytokine responses to academic stress. *Res. Nurs. Health* 2001; 24(4):245–57.
100. Assaf AM, Al-Abbassi R, Al-Binni M. Academic stress-induced changes in Th1- and Th2-cytokine response. *Saudi Pharm J* 2017; 25(8):1237–47.
101. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 966:290–303.
102. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 966:290–303.
103. Ambrée O, Ruland C, Zwanzger P, Klotz L, Baune BT, Arolt V, Scheu S, Alferink J. Social Defeat Modulates T Helper Cell Percentages in Stress Susceptible and Resilient Mice. *Int J Mol Sci* 2019; 20(14).
104. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 2004; 199(11):1567–75.
105. Grindebacke H, Wing K, Andersson A-C, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(9):1364–72.
106. Miyasaka T, Dobashi-Okuyama K, Takahashi T, Takayanagi M, Ohno I. The interplay between neuroendocrine activity and psychological stress-induced exacerbation of allergic asthma. *Allergol Int* 2018; 67(1):32–42.
107. Freier E, Weber CS, Nowottné U, Horn C, Bartels K, Meyer S, Hildebrandt Y, Luetkens T, Cao Y, Pabst C, Muzzolini J, Schnee B, Brunner-Weinzierl MC, Marangolo M, Bokemeyer C, Deter H-C, Atanackovic D. Decrease of CD4(+)FOXP3(+) T regulatory cells in the peripheral blood of human subjects undergoing a mental stressor. *Psychoneuroendocrinology* 2010; 35(5):663–73.

108. Counotte J, Drexhage HA, Wijkhuijs JM, Pot-Kolder R, Bergink V, Hoek HW, Veling W. Th17/T regulator cell balance and NK cell numbers in relation to psychosis liability and social stress reactivity. *Brain, Behavior, and Immunity* 2018; 69:408–17.
109. Jergovic M, Bendelja K, Vidovic A, Savic A, Vojvoda V, Aberle N, Rabatic S, Jovanovic T, Sabioncello A. Patients with posttraumatic stress disorder exhibit an altered phenotype of regulatory T cells. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014; 10(1):43.
110. Kim H-R, Moon S, Lee HK, Kang JL, Oh S, Seoh J-Y. Immune dysregulation in chronic stress: a quantitative and functional assessment of regulatory T cells. *Neuroimmunomodulation* 2012; 19(3):187–94.
111. Hong M, Zheng J, Ding Z-y, Chen J-h, Yu L, Niu Y, Hua Y-q, Wang L-l. Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice. *Neuroimmunomodulation* 2013; 20(1):39–50.
112. Nakata A, Araki S, Tanigawa T, Miki A, Sakurai S, Kawakami N, Yokoyama K, Yokoyama M. Decrease of suppressor-inducer (CD4+ CD45RA) T lymphocytes and increase of serum immunoglobulin G due to perceived job stress in Japanese nuclear electric power plant workers. *J Occup Environ Med* 2000; 42(2):143–50.
113. Pulendran B. The varieties of immunological experience: Of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2015; 33:563–606.
114. Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S, Ionescu M, Peyron E, Kaiserlian D, Nicolas J-F, Bérard F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J. Immunol.* 2003; 171(8):4073–80.
115. Dhabhar FS. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin. *Clinics in Dermatology* 2013; 31(1):18–30.
116. Ho, C. S. K. Surgical and physical stress increases circulating blood dendritic cell counts independently of monocyte counts. *Blood* 2001; 98(1):140–5.
117. Hartmann BM, Albrecht RA, Zaslavsky E, Nudelman G, Pincas H, Marjanovic N, Schotsaert M, Martínez-Romero C, Fenutria R, Ingram JP, Ramos I, Fernandez-Sesma A, Balachandran S, García-Sastre A, Sealfon SC. Pandemic H1N1 influenza A viruses suppress immunogenic RIPK3-driven dendritic cell death. *Nat Commun* 2017; 8(1):1931.
118. McGregor BA, Murphy KM, Albano DL, Ceballos RM. Stress, cortisol, and B lymphocytes: a novel approach to understanding academic stress and immune function. *Stress* 2016; 19(2):185–91.
119. Dominguez-Gerpe L, Rey-Mendez M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunol* 2001; 2:7.
120. Gurfein BT, Hasdemir B, Milush JM, Touma C, Palme R, Nixon DF, Darcel N, Hecht FM, Bhargava A. Enriched environment and stress exposure influence splenic B lymphocyte composition. *PLoS ONE* 2017; 12(7):e0180771.
121. Peters E, Rommel FR, Ivanovas L, Kummer W, Gieler U. Abstract # 1815 Stress and the cholinergic system: The cholinergic pathway in allergic inflammation aggravated by psychosocial stress exposure is not anti-inflammatory. *Brain, Behavior, and Immunity* 2016; 57:e31.
122. Mineur YS, Mose TN, Blakeman S, Picciotto MR. Hippocampal $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors contribute to modulation of depression-like behaviour in C57BL/6J mice. *British Journal of Pharmacology* 2018; 175(11):1903–14.
123. Marshall GD, Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain, Behavior, and Immunity* 1998; 12(4):297–307.

124. Gopal A, Mondal S, Gandhi A, Arora S, Bhattacharjee J. Effect of integrated yoga practices on immune responses in examination stress - A preliminary study. *Int J Yoga* 2011; 4(1):26–32.

125. Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Atkinson C, Glaser R. Hypnosis as a modulator of cellular immune dysregulation during acute stress. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 2001; 69(4):674–82.

ERGEBNISSE IN TABELLENFORM

Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) sowie Median der jeweiligen Zellpopulation

Zellpopulation			Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
Gesamtzahl der T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	52,31 ± 13,16	51,51 ± 11,04	51,76 ± 15,55
		Median	53,80	54,05	56,95
	Stress	Mittelwert ± SD	51,79 ± 15,49	50,75 ± 15,05	44,42 ± 16,30
		Median	51,63	51,93	45,28
Zytotoxische T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	18,05 ± 6,48	17,48 ± 5,87	15,12 ± 4,46
		Median	18,00	17,80	14,50
	Stress	Mittelwert ± SD	19,73 ± 6,36	19,46 ± 6,52	16,47 ± 7,04
		Median	18,15	17,60	16,50
Gesamtzahl der T-Helferzellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	29,66 ± 9,79	28,42 ± 6,63	31,34 ± 11,81
		Median	29,45	29,05	32,35
	Stress	Mittelwert ± SD	28,72 ± 9,13	26,57 ± 9,47	24,06 ± 9,30
		Median	28,55	26,25	24,63
T-Helferzellen Typ 1 in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	12,82 ± 9,2	9,75 ± 8,82	14,02 ± 9,82
		Median	9,1	7,8	11,2
	Stress	Mittelwert ± SD	11,0 ± 7,34	8,53 ± 6,47	13,23 ± 7,82
		Median	10,15	6,9	14,2
T-Helferzellen Typ 2 in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	0,43 ± 0,3	0,7 ± 0,55	0,56 ± 0,38
		Median	0,3	0,6	0,5
	Stress	Mittelwert ± SD	0,63 ± 0,49	0,83 ± 1,3	0,83 ± 1,05
		Median	0,5	0,35	0,45
T-Helferzellen Typ 17 in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	1,46 ± 1,03	1,17 ± 0,73	1,76 ± 1,1
		Median	1,1	1	1,5
	Stress	Mittelwert ± SD	1,48 ± 0,82	1,37 ± 0,8	2,14 ± 1,14
		Median	1,3	1,25	2,55
Aktivierte T Helferzellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	16,54 ± 4,42	14,05 ± 3,22	18,22 ± 5,01
		Median	15,5	13,8	19,1
	Stress	Mittelwert ± SD	15,94 ± 3,8	14,20 ± 3,54	16,81 ± 4,29
		Median	15,15	13,15	16,35
Regulatorische T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	6,11 ± 2,13	5,59 ± 1,57	6,51 ± 1,9
		Median	6,3	5,7	6,7
	Stress	Mittelwert ± SD	6,48 ± 2,17	6,32 ± 1,73	7,38 ± 1,97
		Median	5,8	5,85	6,7
FoxP3 positive regulatorische T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	1,36 ± 1,12	1,72 ± 1,49	1,12 ± 0,97
		Median	0,9	1,2	0,7
	Stress	Mittelwert ± SD	2,3 ± 2,05	1,81 ± 1,34	1,66 ± 1,07
		Median	1,45	1,65	1,45
CD45RA positive naive regulatorische T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	33,11 ± 9,33	32,18 ± 7,66	31,27 ± 9,4
		Median	31,5	32,4	33,6
	Stress	Mittelwert ± SD	34,61 ± 17,18	37,31 ± 21,1	34,76 ± 16,74
		Median	32,7	29,7	30,5

Zellpopulation			Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
CCR4 negative naive regulatorische T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	34,14 ± 10,73	35,45 ± 7,7	33,26 ± 9,45
		Median	31,3	33,2	31,2
	Stress	Mittelwert ± SD	28,56 ± 8,48	29,59 ± 8,81	28,41 ± 9,09
		Median	26,4	28,1	27,9
CD45 positive CCR4 negative naive regulatorische T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	42,2 ± 12,07	45,03 ± 9,25	41,06 ± 13,07
		Median	43,4	45	40,5
	Stress	Mittelwert ± SD	40,22 ± 14,65	42,37 ± 12,19	38,07 ± 9,13
		Median	36,6	40,3	37,6
CD45RA negative regulatorische Memory-T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	67,3 ± 9,32	68,2 ± 7,54	68,78 ± 9,89
		Median	69,3	68	67,2
	Stress	Mittelwert ± SD	62,31 ± 23,01	63,23 ± 21,02	66,47 ± 17,38
		Median	68	70,8	70,1
CCR4 positive regulatorische Memory-T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	64,68 ± 10,96	62,38 ± 8,88	65,36 ± 9,69
		Median	67,4	63,6	68,2
	Stress	Mittelwert ± SD	70,33 ± 8,93	69,31 ± 9,81	70,5 ± 9,53
		Median	72,5	71,4	70,65
CD45 negative CCR4 positive regulatorische Memory T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	23,59 ± 6,09	20,36 ± 5,47	23,72 ± 7,2
		Median	22,3	19	23,4
	Stress	Mittelwert ± SD	22,75 ± 9,25	21,62 ± 7,46	24,23 ± 6,49
		Median	23,6	23,3	25
B-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	12,83 ± 2,94	14,03 ± 5,74	11,59 ± 3,26
		Median	12,00	12,50	11,50
	Stress	Mittelwert ± SD	11,76 ± 4,61	11,95 ± 5,46	10,91 ± 4,81
		Median	11,50	11,45	9,35
Natürliche Killerzellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	9,06 ± 4,44	8,18 ± 4,22	7,48 ± 4,07
		Median	9	7,5	7,2
	Stress	Mittelwert ± SD	10,64 ± 3,96	8,3 ± 3,52	9,49 ± 4,15
		Median	10,85	8,05	8,6
Gesamtzahl der Monozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	8,61 ± 3,17	9,90 ± 4,58	11,20 ± 2,73
		Median	8,63	9,81	10,92
	Stress	Mittelwert ± SD	9,76 ± 4,61	8,93 ± 4,89	13,12 ± 5,53
		Median	8,85	8,03	13,44
Klassische Monozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	38,72 ± 12,93	37,96 ± 13,22	43,12 ± 15,54
		Median	37,4	41	48
	Stress	Mittelwert ± SD	42,39 ± 12,22	34,86 ± 16,0	46,76 ± 15,01
		Median	40,95	34	49,6
Intermediäre Monozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	2,28 ± 0,84	2,81 ± 1,39	2,43 ± 1,47
		Median	2,2	2,3	2
	Stress	Mittelwert ± SD	3,62 ± 1,84	3,33 ± 2,34	3,41 ± 0,96
		Median	4,05	2,75	3,65
Nicht-klassische Monozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	2,1 ± 1,16	1,8 ± 0,88	1,7 ± 1,32
		Median	2,3	1,7	1,3
	Stress	Mittelwert ± SD	3,46 ± 2,09	2,52 ± 1,39	2,59 ± 1,27
		Median	3,2	2,3	2,5

Zellpopulation			Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
Tumornekrosefaktor- α positive Monozyten in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	16,0 \pm 24,23	10,73 \pm 24,97	12,75 \pm 22,32
		Median	8,6	2,8	5
	Stress	Mittelwert \pm SD	6,08 \pm 5,32	3,71 \pm 3,53	4,74 \pm 2,94
		Median	4,9	2,45	3,6
Plasmazytoide dendritische Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	0,27 \pm 0,19	0,3 \pm 0,2	0,35 \pm 0,29
		Median	0,22	0,23	0,24
	Stress	Mittelwert \pm SD	0,38 \pm 0,22	0,38 \pm 0,26	0,47 \pm 0,35
		Median	0,35	0,31	0,38
Aktivierte Plasmazytoide dendritische Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	0,78 \pm 0,49	0,63 \pm 0,55	0,51 \pm 0,76
		Median	0,7	0,5	0,4
	Stress	Mittelwert \pm SD	0,86 \pm 0,74	0,75 \pm 0,66	0,46 \pm 0,38
		Median	0,7	0,5	0,35
Nicht-aktivierte Plasmazytoide dendritische Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	98,02 \pm 1,3	97,71 \pm 1,81	97,95 \pm 2,76
		Median	98,3	98,2	98,9
	Stress	Mittelwert \pm SD	97,91 \pm 1,23	97,68 \pm 1,38	97,93 \pm 2,68
		Median	98,35	98,15	98,7
Myeloide dendritische Zellen Typ 1 in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	0,4 \pm 0,11	0,47 \pm 0,16	0,43 \pm 0,13
		Median	0,37	0,44	0,46
	Stress	Mittelwert \pm SD	0,46 \pm 0,18	0,51 \pm 0,2	0,59 \pm 0,29
		Median	0,42	0,5	0,51
Aktivierte Myeloide dendritische Zellen Typ 1 in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	27,67 \pm 19,37	22,05 \pm 17,83	15,05 \pm 13,44
		Median	28,8	17,4	13,1
	Stress	Mittelwert \pm SD	17,25 \pm 15,41	15,82 \pm 11,0	13,99 \pm 13,08
		Median	9	14,65	7,6
Nicht-aktivierte Myeloide dendritische Zellen Typ 1 in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	71,81 \pm 18,98	77,44 \pm 17,29	84,46 \pm 12,96
		Median	68	82,2	86,9
	Stress	Mittelwert \pm SD	82,33 \pm 15,04	83,67 \pm 10,47	85,68 \pm 12,8
		Median	90,95	85,15	92,25
Myeloide dendritische Zellen Typ 2 in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	0,04 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02
		Median	0,04	0,04	0,04
	Stress	Mittelwert \pm SD	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02
		Median	0,04	0,05	0,04
Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 2 in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	15,31 \pm 10,89	9,28 \pm 5,91	6,8 \pm 6,23
		Median	12,6	8,9	6,3
	Stress	Mittelwert \pm SD	11,47 \pm 7,34	8,74 \pm 4,92	9,64 \pm 6,58
		Median	8,25	7,45	7,65
Nicht-aktivierte Myeloide dendritische Zellen Typ 2	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	84,53 \pm 10,79	89,95 \pm 5,58	93,04 \pm 6,17
		Median	87,4	91,1	93,7
	Stress	Mittelwert \pm SD	88,26 \pm 7,15	90,89 \pm 4,44	90,14 \pm 6,3
		Median	91,55	92,5	92,35
Interferon-gamma positive lebende Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	11,25 \pm 8,53	9,08 \pm 7,45	9,94 \pm 6,63
		Median	7,8	6,3	10,3
	Stress	Mittelwert \pm SD	11,28 \pm 6,39	9,89 \pm 7,61	11,36 \pm 5,05
		Median	10,85	8,45	11,75

Zellpopulation			Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
Interferon-gamma positive T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	17,55 ± 9,76	13,16 ± 9,67	14,81 ± 8,28
		Median	12,6	10,7	15,7
	Stress	Mittelwert ± SD	15,53 ± 8,68	13,06 ± 8,87	15,78 ± 6,24
		Median	15,35	11,75	16,05
Interleukin-4 positive lebende Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	0,86 ± 0,54	0,89 ± 0,66	1,28 ± 1,01
		Median	0,9	1,1	1,1
	Stress	Mittelwert ± SD	1,05 ± 1,17	1,51 ± 3,09	1,23 ± 1,26
		Median	0,7	0,7	0,75
Interleukin-4 positive T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	0,58 ± 0,31	0,74 ± 0,59	0,74 ± 0,58
		Median	0,7	0,6	0,6
	Stress	Mittelwert ± SD	0,76 ± 0,81	1,11 ± 2,34	0,81 ± 0,91
		Median	0,55	0,5	0,5
Interleukin-17 positive lebende Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	0,65 ± 0,37	0,48 ± 0,17	0,71 ± 0,49
		Median	0,6	0,4	0,6
	Stress	Mittelwert ± SD	0,69 ± 0,6	0,64 ± 0,51	0,77 ± 0,46
		Median	0,45	0,35	0,7
Interleukin-17 positive lebende T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	1,16 ± 0,63	0,87 ± 0,35	1,16 ± 0,7
		Median	0,9	0,9	1,1
	Stress	Mittelwert ± SD	1,11 ± 0,7	1,09 ± 0,73	1,32 ± 0,61
		Median	0,9	0,9	1,6
Tumornekrosefaktor-α positive lebende Zellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	18,57 ± 11,73	15,17 ± 12,37	19,51 ± 10,88
		Median	14,5	9,9	17,5
	Stress	Mittelwert ± SD	15,45 ± 7,64	12,35 ± 8,17	17,79 ± 7,64
		Median	18,1	11,05	17,1
Tumornekrosefaktor-α positive lebende T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	29,63 ± 11,52	22,35 ± 14,43	27,85 ± 12,62
		Median	26,5	18	26,5
	Stress	Mittelwert ± SD	23,73 ± 10,38	19,72 ± 9,6	26,8 ± 10,19
		Median	28	19,35	28,05
Tumornekrosefaktor-α positive lebende T-Helferzellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	23,16 ± 13,54	16,49 ± 14,37	25,63 ± 14,62
		Median	21,6	12,6	22
	Stress	Mittelwert ± SD	20,12 ± 13,01	14,79 ± 10,82	25,54 ± 16,2
		Median	21,75	15,65	26,35
nAChRa7 auf T-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	3,15 ± 3,53	2,99 ± 3,81	2,99 ± 2,8
		Median	1,5	1	1,9
	Stress	Mittelwert ± SD	2,13 ± 2,87	2,06 ± 3,41	1,81 ± 2,03
		Median	1,1	1,1	1,15
nAChRa7 auf B-Lymphozyten in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	4,21 ± 2,48	3,81 ± 2,22	5,5 ± 4,19
		Median	3,3	3,9	4,7
	Stress	Mittelwert ± SD	3,46 ± 2,16	3,4 ± 2,36	2,85 ± 1,75
		Median	2,8	2,4	2,4
nAChRa7 auf T-Helferzellen in %	Kontrolle	Mittelwert ± SD	2,79 ± 2,55	2,69 ± 2,84	2,9 ± 2,26
		Median	1,6	1,6	2,1
	Stress	Mittelwert ± SD	2,11 ± 2,42	1,9 ± 2,65	1,91 ± 1,7
		Median	1,2	1,4	1,45

Zellpopulation			Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
nAChR α 7 auf Natürlichen Killerzellen in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	3,75 \pm 3,44	3,28 \pm 3,36	3,69 \pm 2,26
		Median	2,7	2,6	3,1
	Stress	Mittelwert \pm SD	2,62 \pm 3,47	2,28 \pm 2,31	3,14 \pm 2,7
		Median	1,3	1,8	2,35
nAChR α 7 auf Monozyten in %	Kontrolle	Mittelwert \pm SD	9,65 \pm 11,7	11,1 \pm 11,48	16,29 \pm 16,6
		Median	4,1	10	9,3
	Stress	Mittelwert \pm SD	5,98 \pm 10,7	8,13 \pm 17,26	7,29 \pm 8,71
		Median	2	3,05	2,15

Tabelle 16: Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) sowie Median der jeweiligen Zellpopulation bzw Rezeptoren auf Zellen in % zum jeweiligen Messzeitpunkt.

P-Werte der jeweiligen Zellpopulation

Zellpopulation	p-Werte
Gesamtzahl der T-Lymphozyten	0,05 (0,04995)
Zytotoxische T-Lymphozyten	0,875
Gesamtzahl der T-Helferzellen	0,034
T-Helferzellen Typ 1	0,945
T-Helferzellen Typ 2	0,536
T-Helferzellen Typ 17	0,643
Aktivierte T-Helferzellen	0,318
Regulatorische T-Lymphozyten	0,533
FoxP3 positive regulatorische T-Lymphozyten	0,279
CD45RA positive naive regulatorische T-Lymphozyten	0,695
CCR4 negative naive regulatorische T-Lymphozyten	0,921
CD45 positive CCR4 negative naive regulatorische T- Lymphozyten	0,899
CD45RA negative regulatorische Memory-T-Lymphozyten	0,715
CCR4 positive regulatorische Memory-T-Lymphozyten	0,809
CD45 negative CCR4 positive regulatorische Memory T-Lymphozyten	0,462
B-Lymphozyten	0,576
Natürliche Killerzellen	0,308
Gesamtzahl der Monozyten	0,362
Klassische Monozyten	0,326
Intermediäre Monozyten	0,332
Nicht-klassische Monozyten	0,54
Tumornekrosefaktor- α positive Monozyten	0,507
Plasmazytoide dendritische Zellen	0,824
Aktivierte plasmazytoide dendritische Zellen	0,064

Zellpopulation	p-Werte
Nicht-aktivierte plasmazytoide dendritische Zellen	0,965
Myeloide dendritische Zellen Typ 1	0,217
Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 1	0,197
Nicht-aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 1	0,1
Myeloide dendritische Zellen Typ 2	0,573
Aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 2	0,13
Nicht-aktivierte myeloide dendritische Zellen Typ 2	0,16
Interferon-gamma positive lebende Zellen	0,825
Interferon-gamma positive T-Lymphozyten	0,622
Interleukin-4 positive lebende Zellen	0,823
Interleukin-4 positive T-Lymphozyten	0,013
Interleukin-17 positive lebenden Zellen	0,701
Interleukin-17 positive T-Lymphozyten	0,525
Tumornekrosefaktor- α positive lebende Zellen	0,909
Tumornekrosefaktor- α positive T-Lymphozyten	0,568
Tumornekrosefaktor- α positive T-Helferzellen	0,783
nAChRa7 auf T-Lymphozyten	0,653
nAChRa7 auf B-Lymphozyten	0,123
nAChRa7 auf T-Helferzellen	0,852
nAChRa7 auf NK-Zellen	0,76
nAChRa7 auf Monozyten	0,635

Tabelle 17: P-Werte der jeweiligen Zellpopulation. Es wurde die unterschiedliche Entwicklung der Stress- im Vergleich zur Kontrollgruppe über den Gesamtzeitraum der Studie in Hinblick auf ihre Signifikanz untersucht

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Carla Luise Grünenwald, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Subtypisierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Medizinstudentinnen im Hammerexamen/Subtyping of PBMCs in medical students during final exam“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

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

LEBENS LAUF

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

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. Eva Peters möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas, die freundliche Betreuung und intensive Unterstützung des Projektes danken. Großer Dank geht auch an die MTAs Susanne Tumala und Sandra Laux, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatten.

Mein Dank geht außerdem an Herrn Prof. Dr. Hackstein für die Bereitstellung des Labors des biomedizinischen Forschungszentrums am Seltersberg in Gießen und insbesondere an die Laborassistentin Gabriela Michel, ohne deren Einsatz und Positivität meine Forschungsarbeit undenkbar gewesen wäre.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden und besonders meiner Familie für den liebevollen Beistand und die unermüdliche Motivation danken.