

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

DISSERTATION

**Auswirkungen von kurzzeitigem Laborstress auf CD4⁺FOXP3⁺
regulatorische T-Zellen im peripheren Blut**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eva Freier

aus Homburg / Saar

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-Chr. Deter
2. Prof. Dr. M. Schedlowski
3. Prof. Dr. C. Scheibenbogen

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Grundlagen	7
2.1	Psychoneuroimmunologie	7
2.2	Der Begriff „Stress“ und Wege psycho-immunologischer Kommunikation ...	8
2.3	T-Zell – Immunologie im Rahmen erworbener Immunfunktionen	10
2.3.1	Vier Subpopulationen von CD4+ und CD8+ T-Zellen	12
2.4	Regulatorische T-Zellen	14
2.4.1	Zentrale und periphere Toleranz.....	14
2.4.2	CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ regulatorische T-Zellen.....	15
2.4.3	Effektormoleküle regulatorischer T-Zellen: CTLA-4, GITR, LAP	20
2.5	Auswirkungen von psychischem Stress auf Immunfunktionen	21
3	Fragestellung und Ziel der Arbeit	24
4	Probanden und Methoden	26
4.1	Probandenkollektiv	26
4.2	Studiendesign	27
4.2.1	Ablauf der Untersuchung.....	27
4.2.2	Psychophysiologischer Belastungstest	31
4.2.3	Physiologische Messparameter.....	33
4.2.4	Psychodiagnostik	34
4.3	Blutprobengewinnung und immunologische Analysen	36
4.3.1	Blutprobengewinnung.....	36
4.3.2	Isolierung mononukleärer Zellen.....	36
4.3.3	Temporäre Kryopreservation, Auftauen der Zellen und Antikörpermarkierung...	37
4.3.4	Durchflusszytometrie.....	39
4.4	Statistik	40
5	Ergebnisse	42
5.1	Allgemeine Probandendaten	42
5.2	Psychologische Aktivierung	42
5.3	Physiologische Aktivierung	44
5.4	Immunologische Parameter	47
5.4.1	Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen sowie auf T– Zell- Subpopulationen	47
5.4.2	Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ regulatorische T–Zellen im peripheren Blut: Ergebnisse zu Hypothese 1.....	50
5.4.3	Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺ , CD4 ⁺ LAP ⁺ und CD4 ⁺ GITR ⁺ T-Zellen: Ergebnisse zu Hypothese 2.....	54

Inhaltsverzeichnis

6	<i>Diskussion</i>	57
6.1	Ergebnisdiskussion: Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen während einer vermuteten Aktivierung der adaptiven Immunität	57
6.1.1	Psychophysiologische Aktivierung	57
6.1.2	Immunologische Parameter	59
6.1.2.1	Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen sowie auf T-Zell-Subpopulationen	60
6.1.2.2	Auswirkungen des Stressexperimentes auf periphere CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ regulatorische T-Zellen: zu Hypothese 1	62
6.1.2.3	Auswirkungen des Stressexperimentes auf Treg-assoziierte Effektormoleküle: zu Hypothese 2	67
6.2	Klinische Bedeutung regulatorischer T-Zellen in Autoimmunität und Tumorummunologie	69
6.3	Diskussion zur Versuchsdurchführung	71
7	<i>Zusammenfassung</i>	73
	<i>Literaturverzeichnis</i>	75
	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	82
	<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	83
	<i>Tabelle T-Zell-Subpopulationen</i>	84
	<i>Fragebogen und Probandeninformation</i>	85
	<i>Lebenslauf</i>	87
	<i>Publikation</i>	88
	<i>Danksagung</i>	89
	<i>Erklärung</i>	90

1 Einleitung

Die Auswirkungen psychischer Belastungen auf Funktionen des Immunsystems sind ein zentraler Bestandteil psychoneuroimmunologischer Forschung (Glaser and Kiecolt-Glaser 2005; Ader 2007; McEwen 2007). Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass akute Stressoren eine Aktivierung der *angeborenen* Immunität bewirken, welche sich am deutlichsten in einer Mobilisierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) äußert (Segerstrom and Miller 2004).

Weniger eindeutig sind Untersuchungen über das Verhalten von T-Zellen in akuten Belastungssituationen. T-Zellen sind essentielle Bestandteile der *erworbenen* Immunität und nehmen eine zentrale Position in der Vermittlung von Immunantworten ein.

Die klinische Relevanz der Interaktion von T-Zell-Immunität und Stress zeigt sich unter anderem in der Beobachtung, dass zahlreiche Autoimmunerkrankungen mit Defekten in der T-Zellfunktion assoziiert sind (Cools, Ponsaerts et al. 2007; Yamanouchi, Rainbow et al. 2007; Anderson and Isaacs 2008). Gleichzeitig ist ein Effekt von psychischem Stress auf den Verlauf einiger Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Asthma bronchiale oder rheumatoide Arthritis nachgewiesen (Sandberg, Paton et al. 2000; Mohr, Hart et al. 2004; Straub, Dhabhar et al. 2005).

In neueren Studien wurde der Fokus verstärkt auf Veränderungen des erworbenen Immunsystems gerichtet, indem die Verteilung von T-Zellsubpopulationen unter dem Einfluss akuter Stressoren analysiert wurde. Dabei konnte eine stressinduzierte Mobilisierung antigenerfahrener T-Effektor-Gedächtniszellen in das periphere Blut beobachtet werden, während naive T-Zellen sowie zentrale T-Gedächtniszellen im peripheren Blut abfielen (Atanackovic, Schnee et al. 2006).

Regulatorische Komponenten T-zellvermittelter Immunität wurden in der Analyse von stressassoziierten Veränderungen bisher wenig berücksichtigt. In dieser Arbeit soll das Verhalten der seit einigen Jahren intensiv erforschten Zellpopulation der regulatorischen T-Zellen (Tregs) unter einer akuten Stressbelastung untersucht werden. Tregs spielen eine Schlüsselrolle in der Homöostase zwischen einerseits notwendigen Effektorfunktionen zum Schutz des Organismus gegen äußere und innere Pathogene und der andererseits unabdingbaren Kontrolle und Unterdrückung von Immunreaktionen, die gegen Selbst-Antigene gerichtet sind.

Einleitung

Tregs sind durch die Expression verschiedener Effektormoleküle sowie intra- und extrazellulärer Marker gekennzeichnet, durch welche sie identifiziert werden können. Sakaguchi et al beschrieben 1995 erstmals $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen, deren Defekt zur Entwicklung schwerer Autoimmunphänomene führte (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Der für die Entwicklung und Funktion von Tregs wichtige Transkriptionsfaktor der forkhead-Familie „FOXP3“ gilt als derzeit spezifischster Marker von Tregs (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003). Folgende Effektormoleküle sind eng mit der immunregulatorischen Funktion von Tregs verknüpft: „Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4“ (CTLA-4), „Glucocorticoid induced TNF family-related gene“ (GITR) und „Latency associated peptide“ (LAP) (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

Defekte in der Funktion von regulatorischen T-Zellen sind mit schwerwiegenden Autoimmunphänomenen assoziiert worden (Yamanouchi, Rainbow et al. 2007; Anderson and Isaacs 2008; Costantino, Baecher-Allan et al. 2008). Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass Tregs im Gewebe unterschiedlicher Malignome sowie in infektiösem Gewebe erhöht sind (Shimizu, Yamazaki et al. 1999; Belkaid and Rouse 2005; Beyer and Schultze 2006; Zou 2006; Curiel 2007), was sie zu einem interessanten Ansatzpunkt für Immuntherapien macht.

Die in vorangegangenen Studien durch Atanackovic et al. beobachtete Mobilisierung und Bereitstellungsreaktion antigenerfahrener T-Effektor-Gedächtniszellen wirft die Frage auf, wie sich regulatorische T-Zellen als immunologische Gegenspieler unter einer akuten Stressbelastung verhalten (Atanackovic, Schnee et al. 2006).

Ziel der vorliegenden Studie war daher eine Analyse der Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf $CD4^+FOXP3^+$ regulatorische T-Zellen sowie die auf $CD4^+$ T-Zellen exprimierten Effektormoleküle CTLA-4, GITR und LAP im peripheren Blut gesunder männlicher Probanden. Darüber hinaus wurden T-Zell-Subpopulationen anhand ihrer CCR7/CD45RA-Expression eingeteilt. Der Anteil der genannten Zellpopulationen wurde vor sowie im Anschluss an eine akute experimentelle Stressbelastung bestimmt.

2 Grundlagen

2.1 Psychoneuroimmunologie

Die Psychoneuroimmunologie beschäftigt sich in unterschiedlichen Ansätzen mit den funktionellen Wechselwirkungen zwischen Immun-, Nerven- und Hormonsystem.

Robert Ader prägte den Begriff ab Mitte der 1970er Jahre, nachdem er in Zusammenarbeit mit Nicholas Cohen in Konditionierungsexperimenten an Mäusen einen direkten Einfluss von psychischer Konditionierung auf Immunfunktionen nachweisen konnte (Ader 1974; Ader and Cohen 1975). Erste Studien wurden bereits in den 1920er Jahren durch Metalnikov und Chorine durchgeführt (Metalnikov 1932). In den letzten drei Jahrzehnten fand eine eindrucksvolle Entwicklung von einem durch unterschiedliche Fachrichtungen verfolgten Forschungsansatz zur eigenständigen wissenschaftlichen Disziplin statt mit nachfolgender Diversifizierung in verschiedene Schwerpunktbereiche (Schedlowski 1996; Ader 2007).

Im Bereich der psychoneuroimmunologischen Stressforschung hat sich die Untersuchung der Auswirkung von Stress auf Immunfunktionen als ein zentraler Arbeitsbereich herausgestellt. Das breite Spektrum der involvierten Systeme sowie die Komplexität der Interaktion erfordern nach wie vor eine interdisziplinäre Ausrichtung. Die Betrachtungsweise sollte dabei weg von einer isolierten Beobachtung von Aspekten des „Immunsystems“ versus „Nervensystems“ hin zu einem Verständnis des Organismus als Gesamtheit eng miteinander agierender und verknüpfter Systeme gehen (Ader 2007). Darüber hinaus geht man heute davon aus, dass die Kommunikation zwischen Immun- und Nervensystem bidirektional verläuft. Es ist bekannt, dass Immunzellen nicht nur Empfänger von Stresssignalen sind, sondern dass sie über Botenstoffe ebenfalls Signale an das zentrale Nervensystem übermitteln können (Besedovsky, del Rey et al. 1986; Besedovsky and del Rey 1996; Wrona 2006).

Zunehmend wird versucht, psychoneuroimmunologische Forschung mit klinischen Aspekten der Pathogenese, Aufrechterhaltung und Prognose von Autoimmunerkrankungen, im Bereich der Tumorummunologie und Psychoonkologie sowie im Feld von Zivilisationskrankheiten in Industrienationen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck zu verknüpfen. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang auch Möglichkeiten der Prävention, Intervention und Therapie (Ader 2007; McEwen 2007).

2.2 Der Begriff „Stress“ und Wege psycho-immunologischer Kommunikation

Als Begründer einer ersten Stresstheorie, noch vor der Einführung des Terminus „Stress“, gilt der Physiologe Walther B. Cannon. Er beschrieb vor dem Hintergrund tierexperimenteller Beobachtungen eine „Notfallreaktion“ des Organismus bei der Konfrontation mit akuten physischen oder psychischen Belastungen. Beobachtet wurde eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems als Bereitstellung von Reserven während einer „fight or flight“-Reaktion des Organismus in Vorbereitung auf eine etwaige Notsituation (Cannon 1914).

Hans Selye entlehnte 1936 den Begriff „Stress“ aus der Physik, „Zug oder Druck auf ein Material“, um eine unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung zu beschreiben. Er erweiterte den Ansatz Cannons um die Exposition des Organismus mit chronischen Stressoren. In diesem Zusammenhang entwickelte er das Modell des „Allgemeinen Adaptations-Syndroms“ (AAS) im Rahmen chronischer Stresssituationen. Unter Stressexposition des Organismus kommt es dabei zunächst zu einer Aktivierung des Sympathikus (Alarmphase) mit einer darauf folgenden Adaptation (Widerstandsphase). Hält der Stress jedoch an, treten irreversible Schädigungen auf (Erschöpfungsphase). Im Rahmen tierexperimenteller Befunde beobachtete er unter anderem eine Vergrößerung der Nebennierenrinden und eine Atrophie lymphatischer Organe (Selye 1998).

Die moderne Stressforschung unterscheidet verschiedene Stressqualitäten, beispielsweise akute versus chronische, psychische versus physische sowie endogene und exogene Stressoren. Diese werden über neuronale, neuroendokrine und immunologische Signalwege unterschiedlich verarbeitet. Stress ist zudem kein fixer Parameter. Jedes Gehirn nimmt stressauslösende Situationen, abhängig von Prägung, Lernmechanismen und Coping - Strategien, anders wahr (Ader 2007).

Das limbische System ist als zentrale Schaltstelle im zentralen Nervensystem identifiziert worden, über welche Stresssignale unterschiedlichster Natur verarbeitet und weitergeleitet werden. Die sogenannte „Stressachse“ umfasst zwei Haupt-Signalwege. Über das limbische System werden zunächst Signale an den Hypothalamus weitergeleitet. Es folgt eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SAM-Achse) beziehungsweise der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) (Wrona 2006).

Die SAM-Achse (sympathetic adreno-medullary axis)

Die schnellste Reaktion auf einen akuten Stressor besteht in der Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der Ausschüttung von Katecholaminen. Daher nimmt die SAM-Achse eine zentrale Rolle in der Wirkung kurzfristiger Stressoren ein. Über zentralnervöse Zentren erfolgt eine Stimulierung des Locus coeruleus im Hirnstamm. Dieser aktiviert das sympathische Nervensystem. Sympathische Nervenfasern transportieren Transmittersubstanzen wie Noradrenalin zu lymphoiden Geweben sowie zu adrenorezeptortragenden Lymphozyten. Konsekutiv wird über das Nebennierenmark Adrenalin und Noradrenalin in die Blutbahn ausgeschüttet. Die Katecholamine bewirken eine Steigerung der Durchblutung von Muskulatur und Gehirn, eine Erhöhung der Atemfrequenz und Herzleistung sowie eine Bronchodilatation. Dies alles sind Mechanismen, welche im Rahmen von „fight or flight“-Reaktionen eine schnelle Bereitstellung von Energie und Leistung ermöglichen.

Die immunstimulatorische Wirkung von Katecholaminen äußert sich beispielsweise in einem Anstieg von NK-Zellen (Schedlowski, Falk et al. 1993). Die Kommunikation erfolgt vorwiegend über β -adrenerge Rezeptoren auf der Zellmembran von Lymphozyten. Auch immunsuppressive Wirkungen konnten nachgewiesen werden (Maestroni and Mazzola 2003; Sternberg 2006). Adrenalektomie konnte in Studien immunmodulatorische Stresseffekte verhindern, was die Bedeutung von Katecholaminen als Stressmediatoren unterstreicht (Dhabhar 2002). Schedlowski et al. konnten beispielsweise zeigen, dass zum Zeitpunkt eines Fallschirmsprungs maximale Adrenalinwerte im peripheren Blut messbar sind (Schedlowski, Jacobs et al. 1993; Schedlowski and Schmidt 1996).

Die HPA-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse)

Ein zweiter, im Vergleich zur SAM-Achse zeitlich verzögerter Weg der Signalvermittlung stellt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse dar. Das „Corticotropin Releasing Hormon“ (CRH) stimuliert die hypophysäre ACTH-Ausschüttung („Adrenocorticotropes Hormon“). ACTH stimuliert die Freisetzung von Glucocorticoiden in Form von Cortisol aus der Nebennierenrinde, welches an zytoplasmatische Glucocorticoidrezeptoren bindet. Über negative Rückkopplungsmechanismen findet eine Feinabstimmung statt. Die Wirkung von Glucocorticoiden ist je nach Einwirkungszeit und Qualität des Stressors unterschiedlich.

Grundlagen

Glucocorticoide verfügen über frühe, die SAM-Achse und Stressreaktionen fördernde „permissive“ Effekte, sowie spätere immunsupprimierende Wirkungen bei chronischen Stresseinwirkungen (Sapolsky, Romero et al. 2000; Elenkov and Chrousos 2002). Glucocorticoide verfügen, gerade bei länger einwirkendem Stress, über eine begrenzende Funktion in der Regulierung der Stressantwort.

Ihre immunsuppressive Wirkung, gerade bei Langzeitstress, betrifft beispielsweise die Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF (Tumornekrosefaktor) und Interleukin-1 β (Elenkov and Chrousos 2002; Sternberg 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) hemmen und die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- β fördern. Stressassoziierte Cortisolwirkungen beinhalten gleichzeitig eine frühe Migrationsförderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe (Dhabhar, Miller et al. 1995).

Es existieren neben der SAM- und der HPA-Achse weitere Stresshormonachsen wie das Arginin-Vasopressin und das Renin-Angiotensin-II-Aldosteron-System. Darüber hinaus fungieren Neuromodulatoren und Transmittersubstanzen wie Prolactin, Substanz P, Wachstumshormone sowie Zytokine als lokale Vermittler von Stresswirkungen auf das Immunsystem (Calabrese, Kling et al. 1987; Volpi, Rabadan-Diehl et al. 2004).

2.3 T-Zell – Immunologie im Rahmen erworbener Immunfunktionen

Das menschliche Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus gegen äußere und innere Angriffe durch potentiell pathogene Mikroorganismen, Tumorzellen und Autoreaktivität zu schützen. Dabei muss das Gleichgewicht zwischen einer effizienten Immunantwort und einer Vermeidung exazerbierender Reaktionen gegen körpereigene Antigene gewahrt werden. Man unterscheidet einen unspezifischen oder angeborenen Teil des Immunsystems von einem Spezifischen oder Erworbenen.

Die unspezifische Immunität umfasst die mechanische Barriere der Epidermis und ihren Säureschutzmantel, das Komplementsystem, auf zellulärer Ebene Phagozyten, Natürliche Killerzellen, dendritische Zellen (DC) sowie Mediatoren wie Zytokine. Charakteristisch ist die rasche Aktivierung einer Immunantwort innerhalb von Stunden.

Grundlagen

Das erworbene oder spezifische, auch als „adaptiv“ bezeichnete Immunsystem umfasst einen zellulären und einen humoralen Anteil. Es reagiert hochspezifisch und individuell auf Pathogene, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung. Den humoralen Anteil stellen aus B-Lymphozyten hervorgegangene Plasmazellen und durch diese produzierte spezifische Antikörper dar.

Die Bildung von „Gedächtniszellen“ garantiert auch nach dem Ende einer Immunreaktion einen bleibenden Pool von Zellen, welche bei einem erneuten Kontakt eine schnellere Reaktion gegen das Antigen gewährleisten.

Die zellgebundene spezifische Immunität wird hauptsächlich durch T-Zellen vermittelt. Deren membranständiger T-Zell-Rezeptor (TCR) bindet an *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle. T-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und durchlaufen im Thymus verschiedene Reifungsstadien. Nach Abschluss ihrer thymischen Entwicklung können sie vereinfacht in CD4⁺ „T-Helfer-Zellen“ und CD8⁺ „zytotoxische T-Zellen“ unterteilt werden.

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen binden an das MHC-I-Molekül, welches auf den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert wird und zellinterne Antigene präsentiert. Hierdurch erfährt der Organismus von infizierten oder entarteten Zellen und kann diese durch Aktivierung zytotoxischer T-Zellen sowie sezernierte Effektorproteine und Chemokine gezielt vernichten.

CD4⁺ T-Helfer-Zellen hingegen erkennen vormals extrazelluläre und anschließend prozessierte Antigene durch MHC-Klasse-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen (APC). Bei antigenpräsentierenden Zellen handelt es sich beispielsweise um dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen. Vorwiegend dendritische Zellen übernehmen das sogenannte „priming“, das heißt die Aktivierung „naiver“, antigen-unerfahrener T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen (Banchereau and Steinman 1998).

Nach Antigenkontakt naiver T-Zellen werden innerhalb weniger Tage zahlreiche T-Effektorzellen durch „klonale Expansion“ gebildet, die mit dem Blutstrom in die Peripherie und in unterschiedliche Gewebe wandern (Lanzavecchia and Sallusto 2000). T-Effektorzellen sind ausdifferenzierte T-Zellen und können daher in entzündlichem Gewebe durch Abtötung infizierter Zellen oder Zytokinsekretion aktiv werden (Austrup, Vestweber et al. 1997). Im Rahmen der Initiierung einer Immunantwort stimulieren T-Helfer-Zellen die zellvermittelte Immunität durch aktivierte zytotoxische T-Zellen und Makrophagen, hierbei handelt es sich vorwiegend um Th1-Effektorzellen. Eine Th2-gerichtete Immunantwort stimuliert den

Grundlagen

humoralen Anteil des Immunsystems in der Antikörperproduktion durch in Plasmazellen proliferierte B-Zellen. Nach erfolgreicher Immunantwort kommt es unter anderem durch Apoptosemechanismen zu einem starken Rückgang der aus naiven T-Zellen hervorgegangenen T-Effektorzellen.

Im Rahmen der Stimulation des Immunsystems kommt es bei der Bildung von T-Effektorzellen zur Produktion von T-Gedächtniszellen. Diese Zellen stehen dem Organismus über lange Zeit zur Verfügung und sind im Falle einer erneuten Exposition gegenüber dem Antigen rasch in der Lage, eine effektive Immunantwort zu initiieren.

2.3.1 Vier Subpopulationen von CD4+ und CD8+ T-Zellen

Sallusto und Mitarbeiter konnten vor wenigen Jahren zeigen, dass die in Antigenerfahrung und Aktivierungszustand unterschiedlichen T-Zellen in vier verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden können (Sallusto, Lenig et al. 1999). Diese sind:

- naive T-Zellen („T_{naive}“),
- zentrale T-Gedächtniszellen („central memory T cells“: T_{CM}),
- T-Effektor-Gedächtniszellen („effector memory T cells“: T_{EM}) sowie
- terminal differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen („terminally differentiated effector memory T cells“: T_{EMRA}).

Diese konventionellen, nicht-regulatorischen T-Zellen nehmen jeweils unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der Immunantwort wahr und unterscheiden sich in ihrer Expression von CD45RA sowie des „Lymphknoten-Homing-Rezeptors“ CCR7 (Sallusto, Geginat et al. 2004).

Das „Leukocyte common antigen“ *CD45RA* ist ein auf T-Zellen in verschiedenen Isoformen exprimiertes Glykoprotein, welches in der Vergangenheit dazu diente, naive T-Zellen von T-Gedächtniszellen zu unterscheiden (Akbar, Terry et al. 1988). Die Expression von *CD45RA* auf der Zelloberfläche ist typisch für naive T-Zellen. Nach Antigenexposition und der Entwicklung in zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) und T-Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) kommt es zu einer Einstellung der Expression von *CD45RA* mit Bildung der Isoform *CD45R0*. Sowohl T_{CM} als

Grundlagen

auch T_{EM} sind damit CD45RA-negativ. Wills und Arlettaz konnten jedoch eine Reexpression von $CD45RA^+$ auf T-Effektor-Gedächtniszellen (T_{EMRA}) beobachten. Daher stellt die alleinige Bestimmung von CD45RA kein ausreichendes Kriterium für eine Unterteilung dar (Wills, Carmichael et al. 1999). Durch parallele Bestimmung des Oberflächenmarkers CCR7 kann eine vervollständigte Typisierung in T-Zell-Subpopulationen vorgenommen werden (Sallusto, Lenig et al. 1999).

Der „Lymphknoten-Homing-Rezeptor“ *CCR7* ist ein auf naiven T-Zellen, dendritischen Zellen sowie, in geringerem Ausmaß, auf zentralen T-Gedächtniszellen exprimierter Chemokinrezeptor und verbindet somit angeborene und erworbene Immunität (Charo and Ransohoff 2006). *CCR7* bindet an seine Liganden ELC („Epstein-Barr-induced-1 ligand chemokine“, auch CCL19 genannt) und SLC („secondary lymphoid tissue chemokine“, auch als CCL21 bezeichnet) und erleichtert dadurch eine Extravasation und Migration in die parakortikalen Lymphknotenregionen. In den sekundär lymphatischen Organen finden naive T-Zellen optimale Bedingungen für eine Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen wie zum Beispiel dendritische Zellen.

T_{naive}: „Naive“, im Thymus herangereifte T-Zellen hatten noch keinen Antigenkontakt und zirkulieren zwischen Blutbahn und lymphatischem Gewebe auf der Suche nach ihrem durch dendritische Zellen präsentierten Antigen. Sie tragen sowohl *CCR7* als auch *CD45RA* auf ihrer Oberfläche. Naive T-Zellen besitzen keine unmittelbaren Effektorfunktionen.

T_{CM}: Auch zentrale T-Gedächtniszellen zirkulieren zwischen peripherem Blut und lymphatischem Gewebe auf der Suche nach ihrem Antigen und exprimieren daher ebenfalls *CCR7* auf ihrer Oberfläche. Sie sind *CD45RA*-negativ und verfügen als „präaktivierte“ T-Zellen bereits über eingeschränkte Effektorfunktionen. Ihre Aktivierung erfolgt deutlich schneller als die naiver T-Zellen und sie benötigen weniger kostimulatorische Signale zur Aktivierung. Sie verfügen über einen rascheren Zellzyklus als naive T-Zellen und stellen somit eine Zwischenform zwischen naiven T-Zellen und T-Effektor-Zellen dar. Ob zentrale T-Gedächtniszellen oder T-Effektor-Gedächtniszellen entstehen scheint unter anderem von der Stärke der Stimulation des T-Zell-Rezeptors abzuhängen. Man geht davon aus, dass eine längere Stimulation die Bildung von T_{EM} fördert während eine kürzere Stimulation die Bildung von T_{CM} unterstützt.

Grundlagen

T_{EM} und T_{EMRA} : T-Effektor-Gedächtniszellen und terminale differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen üben ihre Effektorfunktion beispielsweise in peripherem entzündlichem Gewebe aus und sind nicht mehr auf einen erleichterten Eintritt in lymphatische Gewebe durch CCR7-Expression angewiesen. Sie sind bereits Typ1 oder Typ2 - polarisiert und sezernieren je nach Zelltyp verschiedene antiinflammatorische Zytokine und intrazelluläre Effektormoleküle. T_{EMRA} reexprimieren CD45RA und produzieren rasch große Mengen an IFN- γ und intrazellulären Effektormolekülen (Lanzavecchia and Sallusto 2000). Sie migrieren innerhalb kürzester Zeit in inflammatorisches Zielgewebe (Roman, Miller et al. 2002). Einen Überblick über die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen anhand ihrer CD45RA/CCR7-Expression

	CD45RA	CCR7
T_{naive}	+	+
T_{CM}	-	+
T_{EM}	-	-
T_{EMRA}	+	-

2.4 Regulatorische T-Zellen

Während der Aktivierung einer Immunreaktion ist die rechtzeitige Terminierung der Immunantwort, eine Kontrolle von klonaler Expansion und die Verhinderung von Immunreaktionen gegen Autoantigene, unerlässlich. Daher sind sowohl auf thymischer Ebene als auch in der Peripherie Kontrollmechanismen aktiv. Eine zentrale Stellung nehmen in diesem Zusammenhang CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen ein.

2.4.1 Zentrale und periphere Toleranz

Im Verlauf der T-Zellentwicklung im Thymus kann es durch die enorme Fülle an möglichen Rezeptorspezifitäten neben der Generierung funktionell korrekter T-Zellen zur Bildung von T-Zellen mit autoreaktiver Rezeptorspezifität kommen. Eine Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ ist jedoch außerordentlich wichtig, um ein Gleichgewicht zwischen einer einerseits

Grundlagen

effizienten Immunantwort gegen pathogene Mikroorganismen oder Tumorzellen und einem Schutz des Organismus vor Autoimmunität zu gewährleisten. Zu diesem Zweck verfügt der gesunde Organismus über verschiedene Eliminationsmechanismen in der Selektion autoreaktiver T-Zellen (von Boehmer, Aifantis et al. 2003; Werlen, Hausmann et al. 2003).

Die zentrale, im Thymus lokalisierte T-Zelltoleranz stellt eine Selektion reifender Thymozyten und somit eine erste Schutzlinie dar. Sie umfasst einerseits die sogenannte Positivselektion von korrekt mit MHC-Molekülen interagierenden T-Zell-Rezeptoren. Diese entwickeln sich anschließend in CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen. Andererseits werden zu stark mit Selbst-Peptid-MHC reagierende, autoreaktive T-Zellen durch Negativselektion und nachfolgende Apoptose eliminiert. Auch bei einem zu schwachen Signal kommt es zum programmierten Zelltod der funktionsuntüchtigen T-Zellen und zum „death by neglect“ („Tod durch Ignoranz“).

Man nimmt jedoch an, dass nicht alle Antigene im Thymus exprimiert werden und dass einige autoreaktive T-Zellen ins periphere Blut gelangen (Danke, Koelle et al. 2004).

In der Peripherie können T-Zellen durch Anergie in einem Zustand der Reaktionslosigkeit gehalten werden oder über den „aktivierungsinduzierten Zelltod“ (AICD) beseitigt werden. Weiterhin können sich Selbst-Antigene einer T-Zellexposition durch klonale Ignoranz, das heißt einer Lokalisation in geschützten Kompartimenten, entziehen.

Ein Hauptbestandteil peripherer Toleranz wird jedoch in der immunsuppressiven Funktion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) vermutet. Diese sind in der Lage, autoreaktive und nicht-autoreaktive T-Zellen sowie weitere Immunzellen direkt zu hemmen und Immunantworten zu begrenzen (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

2.4.2 CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen

Bereits seit den 1970er Jahren wurde die Existenz immunregulatorischer Zellen, damals als „Suppressorzellen“ bezeichnet, diskutiert (Gershon and Kondo 1971). Es konnte jedoch keine ausreichende Charakterisierung dieser Zellen vorgenommen werden und die Thematik geriet in den Folgejahren aus dem Fokus immunologischer Forschung.

Grundlagen

Dies änderte sich, als Sakaguchi et al. im Jahre 1995 in dem Oberflächenmolekül CD25, Bestandteil der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, einen Marker für eine $CD4^+CD25^+$ Zellpopulation entdeckten. Deren Depletion durch Thymektomie am 3. Lebenstag hatte bei Mäusen schwere Autoimmunphänomene zur Folge (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). $CD4^+CD25^+$ T-Zellen scheinen über eine wichtige immunregulatorische Funktion zu verfügen und stellen ungefähr 5-10 Prozent aller peripheren $CD4^+$ T-Zellen. Aufgrund ihrer Entwicklung im Thymus wurden sie fortan als „natürliche“ regulatorische T-Zellen bezeichnet. CD25 konnte damit als erster Marker von Tregs identifiziert werden.

In den darauf folgenden Jahren wurden weitere Untergruppen von regulatorischen T-Zellen gefunden (Shevach 2006). Nachfolgend werden die wichtigsten bisher bekannten Zellpopulationen kurz vorgestellt. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Tregs: die oben beschriebenen, am besten untersuchte Treg-Zellpopulation der „natürlichen“, im Thymus generierten $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs, sowie „induzierte“, das heißt in der Peripherie aus $CD4^+CD25^-$ T-Zellen entstandene Tregs (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

Induzierte Tregs sind durch ihre Zytokinexpression, vorwiegend IL-10 und TGF- β gekennzeichnet: T-regulatory-1 (T_{R1})-Zellen sezernieren große Mengen an IL-10. Eine weitere Untergruppe von induzierten Tregs stellen T_H3 -Zellen dar. Sie sezernieren immunsuppressive Zytokine wie TGF- β und IL-4. T_H3 -Zellen sind durch das Phänomen der „oralen Toleranz“, welches einer reduzierten Immunantwort auf mit der Nahrung aufgenommene Antigene entspricht, gekennzeichnet. Beide Zelltypen können *in vitro* aus naiven $CD4^+$ T-Zellen generiert werden. Weiterhin wurden NK-T-Zellen sowie $CD8^+$ T-Zellen mit immunregulatorischem Potential beschrieben.

CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen

Die bisher am besten untersuchte Zellpopulation von $CD4^+$ Tregs stellen natürliche, im Thymus generierte $CD4^+CD25^+$ Tregs dar.

Da CD25 nicht exklusiv auf Tregs, sondern auch auf nicht-regulatorischen, „konventionellen“ aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ist CD25 als alleiniger Treg - Marker ungeeignet (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Als aktuell spezifischster Marker natürlicher Tregs gilt das „Forkhead-box-protein 3“ (FOXP3), ein Transkriptionsfaktor der forkhead-Familie. Dessen

Grundlagen

Expression ist entscheidend für die Entstehung und Funktion natürlicher, im Thymus entstandener regulatorischer T-Zellen. FOXP3 kann auch durch $CD4^+CD25^-$ „konventionelle“ T-Zellen exprimiert werden. Allerdings werden auf mRNA - Ebene sehr viel geringere Werte erreicht im Vergleich zu der durch Tregs erreichten Expression. Die FOXP3-Expression in aktivierten, nicht-regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen war darüber hinaus nur vorübergehend nachweisbar (Wang, Ioan-Facsinay et al. 2007). Daher gilt FOXP3 als derzeit zuverlässigster Marker von Tregs (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003).

$CD4^+FOXP3^+$ T-Zellen können bei Mäusen ab dem dritten Lebenstag festgestellt werden. Thymektomie und damit Eliminierung der Zellpopulation zu diesem Zeitpunkt führte zur Ausbildung schwerer Autoimmunphänomene. Die ersten Lebenstage scheinen daher essentiell für die Entwicklung funktionstüchtiger Tregs zu sein. Ähnlich der beobachteten Autoimmunphänomene bei $CD25$ -depletierten Mäusen kommt es bei Defekten im *Foxp3*/"scurfin" Gen zu schweren Immundefekten, dieser Mausstamm wird auch als „scurfy mice“ bezeichnet (Brunkow, Jeffery et al. 2001).

IPEX

Menschen hingegen entwickeln bei Mutationen im FOXP3-Gen das schwere Immundefektsyndrom IPEX („Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-linked syndrome“), welches erstmals 1982 durch Powell et al. beschrieben wurde (Powell, Buist et al. 1982; Bennett, Christie et al. 2001). Durch die defizitäre oder fehlende „Kontrolle“ und Begrenzung von Immunantworten durch Tregs kommt es zu einer autoaggressiven Dysregulation. Betroffene Patienten leiden unter einer Kombination verschiedener schwerer Autoimmunpathologien. Bereits in den ersten Lebensmonaten treten Symptome auf. Häufig manifestieren sich Dermatitis, Typ 1–Diabetes mellitus, Thyreoiditis sowie Wachstumsstörungen und Mangelerscheinungen aufgrund von Enteropathien. Der Mechanismus einer wahrscheinlich X-chromosomal rezessiven Vererbung wird diskutiert (Wildin, Smyk-Pearson et al. 2002). Die Therapie besteht pharmakologisch in einer Supportivtherapie und Immunsuppression (Bindl, Torgerson et al. 2005). Eine allogene Stammzelltransplantation kann häufig eine Regression der Symptome erreichen, birgt jedoch weitere Komplikationen wie Graft-versus-host disease (GvHD) oder Infektionen (Baud, Goulet et al. 2001). Ohne Behandlung

Grundlagen

verläuft IPEX meist bereits in den ersten zwei Lebensjahren tödlich durch massive Gedeihstörungen oder septische Komplikationen (van der Vliet and Nieuwenhuis 2007).

Mechanismen der Immunregulation durch Tregs

Regulatorische T-Zellen können sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen als auch dendritische Zellen in ihrer *in vitro* Proliferation hemmen und haben so direkten Einfluss auf die Immunantwort. Dies geschieht über eine Aktivierung des T-Zell-Rezeptors. Nach der antigenspezifischen Aktivierung von Tregs scheint die eigentliche Suppression jedoch antigenunspezifisch abzulaufen. (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Viele Einzelheiten der Immunsuppression durch Tregs sind derzeit noch unbekannt und werden derzeit intensiv erforscht.

Effektormoleküle wie CTLA-4 und GITR sind in Zell-Zell-Kontakt-abhängige suppressorische Mechanismen von Tregs eingebunden und werden im nachfolgenden Kapitel vorgestellt. Als gesichert gilt, dass Tregs sowohl über Zell-Zell-Kontakte als auch über eine Zytokinsekretion von TGF-beta und IL-10 andere Immunzellen regulieren. Auch über das Adhäsionsmolekül „Lymphocyte activation gene-3“ (LAG3) und über kompetitiven Interleukin 2-Konsum üben Tregs ihre immunregulatorische Funktion aus (Huang, Workman et al. 2004; von Boehmer 2005). Dabei scheinen die Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismen eine zentrale Rolle zu spielen. Auch die Induktion der „Indoleamine 2,3-dioxygenase“ (IDO) in dendritischen Zellen, angeregt durch eine CTLA-4 - abhängige Interaktion von Tregs und dendritischen Zellen über CD80/CD86, wird aktuell diskutiert (Chen 2006; Puccetti and Grohmann 2007). Eine Regulierung durch eine Granzym/Perforin-vermittelte Lyse ist ein weiterer Kontrollmechanismus von Tregs - es bleiben jedoch nach wie vor offene Fragen hinsichtlich der Suppressionsmechanismen von Tregs *in vivo* (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Neben FOXP3 als derzeit spezifischstem Treg-Marker dienen auch die Effektormoleküle CTLA-4 und GITR der Identifizierung von Tregs. Darüber hinaus werden weitere Marker wie Neuropilin-1, CD 103 und CD127 diskutiert (Lehmann, Huehn et al. 2002; Bruder, Probst-Kepper et al. 2004; Liu, Putnam et al. 2006).

Die Abbildungen 1 und 2 geben einen Überblick über die immunsuppressive Funktion von Tregs und ihren Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung.

Grundlagen

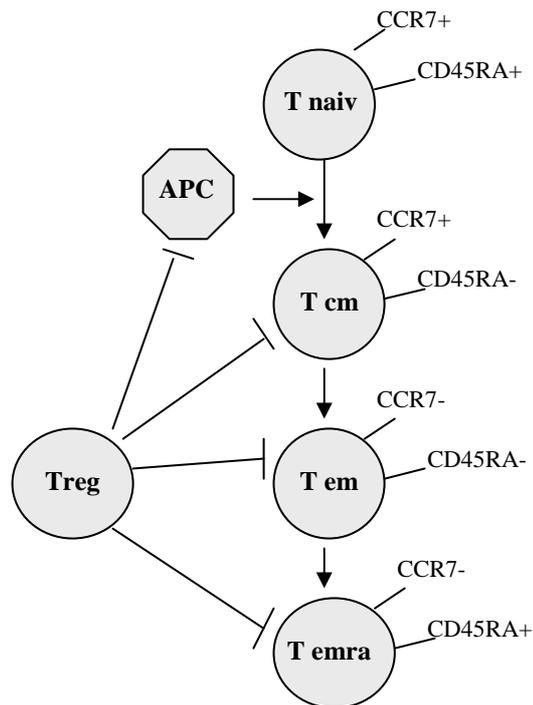


Abbildung 1: Tregs wirken inhibierend auf die T-Zell-Differenzierung von naiven T-Zellen (Tnaive) in zentrale T-Gedächtniszellen (Tcm) und T-Effektor-Gedächtniszellen (Tem und Temra). Die T-Zell-Differenzierung wird durch einen Antigenkontakt über antigenpräsentierende Zellen (APC) stimuliert.

Defekte in der Funktion regulatorischer T-Zellen, sowohl in defizitärer als auch in exzessiver Richtung, sind im Zusammenhang mit der Pathogenese und Erhaltung von Autoimmunerkrankungen, malignen Erkrankungen sowie Infektionen nachgewiesen worden. (Yamanouchi et al, 2007, Wang u Wang, 2007, Belkaid u Rouse, 2005). Einige Beispiele für Erkrankungen mit Defekten in der Treg-Funktion sind Multiple Sklerose, Typ1-Diabetes, Psoriasis oder rheumatoide Arthritis. Weiterhin unterstützen Tregs die Transplantatakzeptanz und scheinen eine protektive Funktion in der Prävention der Graft-versus-host disease zu besitzen (Le and Chao 2007). Darüber hinaus sind immunregulatorische Komponenten wichtig für die Aufrechterhaltung feto-maternaler Toleranz (Blois, Ilarregui et al. 2007; Saito, Shiozaki et al. 2007; Terness, Kallikourdis et al. 2007; Soiffer 2008).

2.4.3 Effektormoleküle regulatorischer T-Zellen: CTLA-4, GITR, LAP

Mit der Funktion regulatorischer T-Zellen sind unterschiedliche Effektormoleküle assoziiert.

CTLA-4 („*Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein-4*“) ist ein auf regulatorischen T-Zellen sowie anderen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiertes Glykoprotein auf der Zelloberfläche und bindet hochaffin an seine Liganden CD80 und CD86. CTLA-4, auch als CD152 bezeichnet, übt einen inhibierenden Effekt auf die T-Zellfunktion und –proliferation aus (Sansom and Walker 2006). Es bindet, ebenso wie das strukturähnliche, in seiner Funktion jedoch unterschiedliche CD28, im Rahmen der Aktivierung naiver T-Zellen an CD80 und CD86. Die Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 wirkt negativ auf die T-Zell-Stimulation und fördert eine Terminierung der T-Zell-Antwort. Das strukturähnliche CD28 wirkt hingegen stimulierend auf die T-Zell-Aktivierung.

Ein weiteres mit der Funktion regulatorischer T-Zellen assoziiertes Effektormolekül stellt der Oberflächenrezeptor **GITR** („*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene*“) dar (McHugh, Whitters et al. 2002; Shimizu, Yamazaki et al. 2002). GITR wirkt als Kostimulator regulatorischer T-Zellen. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass GITR die immunsuppressive Wirkung regulatorischer T-Zellen kontrolliert und so ein Andauern der Immunantwort durch Effektorzellen fördern kann (Stephens, McHugh et al. 2004). Anfangs postulierten Maus-Modelle die alleinige Expression auf regulatorischen T-Zellen. Es ist mittlerweile jedoch erwiesen, dass auch andere aktivierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen GITR exprimieren (McHugh, Whitters et al. 2002).

Das „*Latency associated peptide*“ (**LAP**) ist eng mit der Funktion regulatorischer T-Zellen verknüpft (Nakamura, Kitani et al. 2004). Es bildet einen Komplex mit TGF-β1, welches neben IL-10 eines der bedeutendsten Zytokine in der Funktion regulatorischer T-Zellen darstellt. TGF-β1 Mangel konnte mit einem Verlust der immunregulatorischen Aktivität und reduzierten Zellzahlen CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen assoziiert werden (Bommireddy, Babcock et al. 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LAP auch über TGF-β1-unabhängige *in vivo* und *in vitro* chemotaktische Immuneffekte verfügt (Ali, Gaughan et al. 2008).

Grundlagen

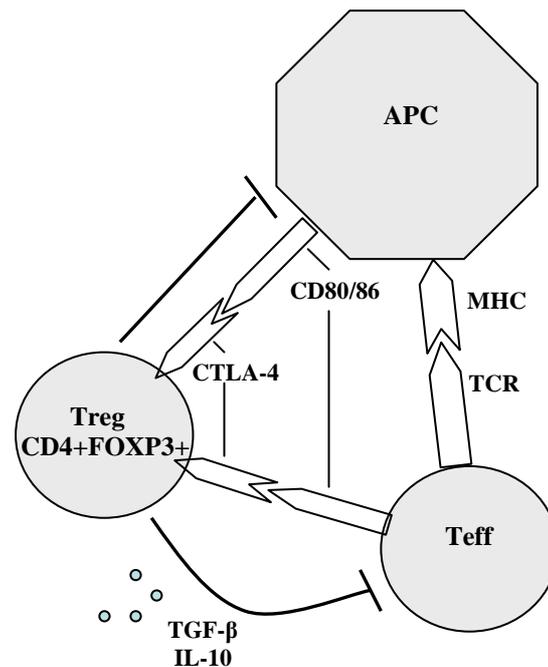


Abbildung 2: Die Immunregulation durch regulatorische T-Zellen (Treg) über Inhibierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und Effektorzellen (hier Teff) erfolgt unter anderem über Zell-Zell-Kontakte, beispielsweise CTLA-4-vermittelt, welches an seine Liganden CD80/86 bindet, sowie durch immunregulatorische Zytokine wie TGF- β oder Interleukin-10. TCR: T-Zell-Rezeptor; MHC: Major histocompatibility complex

2.5 Auswirkungen von psychischem Stress auf Immunfunktionen

Hans Selye entwickelte im Jahre 1975 in Folge seiner Beobachtungen einer stressinduzierten Thymusinvolutions ein Modell, welches Stress als generell immunsuppressiv charakterisiert. Psychoneuroimmunologische Studien der letzten dreißig Jahre zeigen jedoch, dass die Auswirkungen von Stress auf verschiedene Ebenen des Immunsystems komplex sind und je nach Expositionsdauer sowohl immunstimulierend als auch immunsuppressiv wirken können (Seegerstrom and Miller 2004).

Als akuten beziehungsweise kurzzeitigen Stress bezeichnet man Belastungen in einem Zeitraum von Minuten bis wenigen Stunden, chronischer Stress hingegen beschreibt über Monate bis Jahre andauernde psychische Belastungssituationen.

Die Wirkung *chronischen Stresses*, wie er beispielsweise bei Verlust oder langjähriger Pflege eines Angehörigen auftreten kann, äußert sich in einer Immunsuppression. Diese kann in einer verminderten NK-Zell-Aktivität, einer reduzierten Proliferationskapazität von Lymphozyten

Grundlagen

sowie einer abgeschwächten Antikörperproduktion nach Impfungen dargestellt werden (Kiecolt-Glaser, Glaser et al. 1998; Vedhara, Cox et al. 1999; Glaser, Sheridan et al. 2000; Glaser and Kiecolt-Glaser 2005).

Akute Stressoren ermöglichen durch ihre kurze Expositionsdauer eine reproduzierbare Analyse unter Laborbedingungen und einen Vergleich mit Kontrolldaten. Mentaler oder emotionaler Stress wird beispielsweise durch das Lösen arithmetischer Tests unter Zeitdruck oder das Halten einer öffentlichen Rede provoziert. Als zuverlässiger Parameter zur Quantifizierung einer Stressantwort hat sich die kardiovaskuläre Reaktion in einer Erhöhung von Herzfrequenz und Blutdruck herausgestellt (Larson, Ader et al. 2001), welche bei kurzfristigen Stimuli in erster Linie als Ausdruck einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems gewertet wird. Benschop et al konnten zeigen, dass eine Katecholaminausschüttung positiv mit einer NK-Zellaktivierung korrelierte (Benschop, Rodriguez-Feuerhahn et al. 1996). Diese Effekte werden hauptsächlich durch β 2-adrenerge Rezeptoren vermittelt (Schedlowski, Hosch et al. 1996).

Eine im Jahre 2004 veröffentlichte Metaanalyse durch Segerstrom und Miller bestätigte den Anstieg Natürlicher Killerzellen im peripheren Blut und deren Zytotoxizität als deutlichen Effekt von akutem Stress auf die *angeborene* Immunität (Cacioppo, Berntson et al. 1998; Segerstrom and Miller 2004). Ein klassisches Beispiel findet sich in der Beobachtung eines signifikanten Anstieges der NK-Zellzahlen und der NK-Aktivität unmittelbar nach einem Fallschirmsprung (Schedlowski, Jacobs et al. 1993). Diese Beobachtungen trugen zur Entwicklung eines Stressmodells bei, nach welchem akuter Stress eine optimale Bereitstellung schnell verfügbarer Ressourcen bewirkt. Eine Aktivierung angeborener Immunität wird damit als sinnvolle Verteidigungsstrategie gegen eventuelle Gefahrensituationen gesehen.

Die Analysen akuten Stresses im Hinblick auf das *erworbene* oder *adaptive* Immunsystem kamen zu weniger eindeutigen Ergebnissen. $CD4^+$ T-Helferzellen zeigten nur geringe Veränderungen oder sogar Zellzahlabfälle, während für $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen ein leichter Anstieg der Zellzahlen im peripheren Blut mit einer Abnahme des $CD4^+/CD8^+$ Quotienten beobachtet werden konnte (Bachen, Manuck et al. 1992; Benschop, Rodriguez-Feuerhahn et al. 1996). Diese Ergebnisse wurden dahingehend diskutiert, dass akuter Stress möglicherweise nur das *angeborene*, nicht aber das *erworbene* Immunsystem stimuliert (Fleshner, Nguyen et al. 1998; Segerstrom and Miller 2004).

Grundlagen

Andere Autoren konnten hingegen eine Involvierung und Aktivierung von erworbener zellgebundener Immunität unter akutem Stress beobachten. Dhabhar und McEwen fanden eine stressinduzierte Umverteilung von T-Zellen in die Haut, einer häufigen „Angriffsfläche“ für Pathogene. Darüber hinaus konnte in einem murinen Modell eine verbesserte Immunantwort auf Impfungen durch akuten Stress zum Zeitpunkt der Impfung erreicht werden (Dhabhar and McEwen 1997; Dhabhar and Viswanathan 2005). Bosch et al. zeigten eine Zunahme sekretorischer Immunglobuline vom Typ IgA im Speichel (Bosch, Ring et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen eine Verstärkung auch von erworbenen Immunfunktionen unter akutem Stress vermuten.

In der Folge dieser Beobachtungen wurde ein biphasisches Stressmodell entwickelt, nach welchem akuter Stress im Rahmen einer „fight or flight“-Reaktion immunstimulierend sowohl auf das angeborene als auch auf das erworbene Immunsystem wirkt, chronischer Stress hingegen Immunfunktionen schwächt (Dhabhar and McEwen 1997; Ader 2007). Evolutionsbiologisch bedeutet eine Aktivierung *aller* zur Verfügung stehender immunologischer Ressourcen, sowohl angeborener als erworbener, eine Optimierung der Verteidigung in akuten Gefahrensituationen.

Die kürzlich von Atanackovic et al. vorgestellten Ergebnisse der Beobachtung einer stressinduzierten Umverteilung des peripher zirkulierenden T-Zellpools stützen das durch Dhabhar und McEwen vorgestellte biphasische Stressmodell (Atanackovic, Schnee et al. 2006). Es konnte eine periphere Mobilisierung antigenerfahrener T-Effektorzellen gezeigt werden, während naive und zentrale T-Gedächtniszellen im peripheren Blut abfielen. Diese Erkenntnisse unterstützen somit das Stressmodell, nach welchem chronischer Stress immunsupprimierend wirkt, während akuter Stress im Sinne einer optimalen Bereitstellung von Ressourcen in „fight or flight“-Reaktionen sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität stärkt.

Anstiege, Abfälle beziehungsweise Veränderungen in der Relation der Immunzellen im peripheren Blut müssen stets vor dem Hintergrund der möglichen Umverteilung in verschiedene Kompartimente betrachtet werden. Ein Abfall von Lymphozyten im peripheren Blut wird heute nicht als „Zelldestruktion“ angesehen, sondern als Umverteilung und Folge von Migrationsvorgängen: Zellen migrieren in jenes Kompartiment, in welchem sie ihre Immunfunktion am besten ausüben können (Ader 2007).

3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass es unter akutem Stress zu einer Mobilisierung von T-Effektorzellen kommt, während weniger differenzierte naive T-Zellen und zentrale T-Gedächtniszellen im peripheren Blut abfallen (Atanackovic, Schnee et al. 2006). Diese Ergebnisse unterstützen die These einer stressinduzierten Umverteilung von T-Zellen in die jeweilig sinnvollsten Kompartimente. Aktivierte T-Effektorzellen werden zur Migration in periphere Gewebe in die Blutbahn freigesetzt, um dort rasch an Infektionsherde oder verletztes Gewebe zu gelangen. Naive T-Zellen und zentrale T-Gedächtniszellen fallen im peripheren Blut ab. Diese Zellen unterliegen möglicherweise einer Migration in lymphatisches Gewebe, dem geeigneten Ort der Antigenpräsentation. Jede T-Zell-Subpopulation scheint die Immunantwort durch ein passendes Migrationsverhalten in unterschiedliche Kompartimente zu unterstützen.

Die Beobachtung der Aktivierung von T-Effektorzellen und Bereitstellung von adaptiven Immunressourcen während akuter psychischer Belastungen lässt die Frage aufkommen, wie sich regulatorische, „immunsuppressive“ Komponenten der adaptiven Immunität verhalten.

Eine zentrale Stellung in der Begrenzung von Immunantworten nehmen regulatorische T-Zellen (Tregs) ein. Tregs sind eine erst seit Mitte der 1990er Jahre intensiv erforschte Zellpopulation. Sie sind essentiell für die Erhaltung der immunologischen Homöostase zwischen erforderlichen Effektorfunktionen und der Kontrolle von Immunreaktionen gegen Autoantigene. Es handelt sich um eine CD4⁺-Zellpopulation, als deren spezifischster Marker der Transkriptionsfaktor FOXP3 gilt (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003). Defekte in der Funktion von Tregs sind mit Autoimmunerkrankungen assoziiert worden (Costantino, Baecher-Allan et al. 2008). Im Tumorgewebe unterschiedlicher Neoplasien sind Tregs in erhöhter Anzahl nachgewiesen worden (Wolf, Wolf et al. 2003; Zou 2006). Tregs scheinen Infektionen durch eine inhibierte Immunantwort zu begünstigen (Belkaid and Rouse 2005).

Regulatorische T-Zellen sind, auch durch die Aktualität ihrer Entdeckung, bisher unzureichend in den Kontext psychoneuroimmunologischer Forschung eingebunden worden. Angesichts der zentralen Bedeutung von Tregs für die Immunhomöostase, ihrer Rolle in unterschiedlichsten Pathologien und des therapeutischen Potentials von Tregs besteht der Bedarf einer Integration dieser neueren immunologischen Erkenntnisse in die psychoneuroimmunologische Stressforschung.

Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die beobachtete Mobilisierung antigenerfahrener T-Effektorzellen bestärkt die Annahme, dass Anteile erworbener Immunität unter Stress aktiviert werden und es somit zu einer Bereitstellung aller verfügbaren Ressourcen kommt. Das Verhalten von Tregs als immunologische Gegenspieler von T-Effektorzellen blieb bislang unberücksichtigt, ist für eine weiterreichende Darstellung eines modernen Stressmodells jedoch notwendig. Die beobachtete Bereitstellungsreaktion von T-Effektorzellen unter akutem Stress lässt eine Herabregulation immunregulatorischer Komponenten vermuten. In einem Rückgang ihrer immunsuppressiven Aktivität würden Tregs die Aktivierung der Immunantwort begünstigen und eine effektive Bekämpfung von Angriffen durch Pathogene in „fight or flight“-Situationen zulassen. Ein Rückzug des immunsuppressiven Arms, durch Tregs repräsentiert, erlaubt eine effizientere Verteidigung und Immunabwehr. Eine Analyse der Auswirkungen akuten psychischen Laborstresses auf Tregs ist bisher nicht vorgenommen worden. Etwaige Forschungsergebnisse könnten jedoch einen wichtigen Beitrag zu einer Komplettierung aktueller Stressmodelle leisten.

Ziel der vorliegenden Studie ist eine Analyse der Auswirkungen akuten mentalen Stresses auf das Verhalten verschiedener T-Zell-Subpopulationen. Im Zentrum der Untersuchung stehen erstmals regulatorische T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit werden natürliche $CD4^+FOXP3^+$ regulatorische T-Zellen und mit deren Funktion assoziierte Effektormoleküle unter dem Einfluss eines kurzfristigen Laborstresses untersucht.

Zu diesem Zweck werden folgende Hypothesen überprüft:

Hypothese 1: Unter akuter mentaler Stresseinwirkung kommt es zu einer Abnahme des Anteils $CD4^+FOXP3^+$ regulatorischer T-Zellen am Gesamtlymphozytenpool und zu einer Umverteilung zugunsten zytotoxischer T-Effektorzellen im peripheren Blut gesunder, männlicher Probanden.

Hypothese 2: Im Rahmen der vermuteten stressinduzierten Abnahme des Anteils $CD4^+FOXP3^+$ regulatorischer T-Zellen wird eine gleichgerichtete Änderung der Expression der Treg-assoziierten Effektormoleküle CTLA-4, GITR und LAP auf $CD4^+$ T-Zellen des peripheren Blutes beobachtet.

4 Probanden und Methoden

4.1 Probandenkollektiv

Die Untersuchungen fanden im psychophysiologischen Labor der Abteilung für Psychosomatik und Psychotherapie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, statt. Die Studie umfasst eine Stichprobe von 31 Probanden. Jeder Teilnehmer erschien an zwei Untersuchungstagen, an einem Termin war der mentale Belastungstest zu absolvieren, der andere Tag diente der Erhebung von Kontrolldaten. Vor Studienbeginn fanden Probeuntersuchungen mit zwei Versuchspersonen statt. Die Studienteilnehmer wurden durch öffentliche Aushänge und Informationszettel auf die Studie aufmerksam gemacht. Anhand eines Fragebogens wurden die Ausschlusskriterien überprüft.

Einschlusskriterien:

- männliches Geschlecht

Ausschlusskriterien:

- Nikotin- oder Drogenkonsum
- Medikamenteneinnahme
- chronische Erkrankungen
- psychische Erkrankungen
- vorangegangene Operationen
- Leistungssport
- Vorliegen einer Nadelphobie

Handelte es sich um nichtrauchende, gesunde Männer, bei denen keines der weiteren Ausschlusskriterien vorlag, wurde der Zeitpunkt für beide Versuchstage festgelegt. Insgesamt wurden 34 Probanden untersucht. In einem Fall musste die Untersuchung wegen Unwohlseins des Probanden nach Legen der Venenverweilkanüle abgebrochen werden. Die Daten von zwei Teilnehmern konnten aufgrund technischer Probleme nicht analysiert werden, so dass die Ergebnisse von 31 Probanden in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. In die Analyse

des Kontrolltages wurden die Daten von zehn Probanden integriert. Die Teilnehmer befanden sich in einem Altersrange von 21 bis 41 Jahren mit einem Median von 26,1 Jahren.

Die Probanden wurden im Rahmen des telefonischen Auswahlgesprächs gebeten, ab dem Vorabend der Untersuchung keinen Kaffee oder schwarzen Tee sowie am Versuchstag ein ausreichendes Frühstück einzunehmen. Am ersten Untersuchungstag wurden die Teilnehmer zunächst über den Ablauf und die wissenschaftlichen Ziele der Studie mündlich sowie anhand einer Probandeninformationsschrift informiert. Im Anschluss gaben alle Versuchspersonen ihr schriftliches Einverständnis. Die Probandeninformation sowie der Fragebogen zur Überprüfung der Ausschlusskriterien befinden sich im Anhang. Die Entscheidung, nur männliche Versuchsteilnehmer zu testen, wurde zum Zwecke einer möglichst homogenen Probandengruppe getroffen. Zyklusbedingte hormonelle Schwankungen mit einem etwaigen Einfluss auf immunologische Parameter sollten in der vorliegenden Untersuchung vermieden werden.

Alle Studienteilnehmer, welche beide Termine absolviert hatten, erhielten eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 50 Euro. Der Ablauf der Studie im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeiten im psychophysiologischen Labor lag der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, vor und war akzeptiert worden.

4.2 Studiendesign

4.2.1 Ablauf der Untersuchung

Das Stressexperiment wurde im psychophysiologischen Labor der Abteilung für Psychosomatik und Psychotherapie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, durchgeführt und fand von Frühjahr bis Herbst 2005 statt.

Das Labor befindet sich in schallarmer Umgebung, Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden protokolliert. Die Raumtemperatur variierte zwischen 20,0 bis 25,7 Grad Celsius, die Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 40% und 75%. Der Laborbereich bestand aus zwei Räumen. Der Proband befand sich während des Experiments alleine im Untersuchungsraum, während über den benachbarten Technikraum die Geräte zur Erfassung und Aufzeichnung der

Probanden und Methoden

kardiovaskulären Parameter überwacht und gesteuert wurden. Beide Laborbereiche waren über eine Gegensprechanlage und Videokamera miteinander verbunden.

Die Untersuchung setzte sich aus zwei Terminen zusammen. An einem der beiden Versuchstage wurde der Proband mit Hilfe eines standardisierten mentalen Belastungstests einem akuten psychischen Stress ausgesetzt. Der Test wurde entweder am ersten oder am zweiten Untersuchungstag durchgeführt, im Folgenden handelt es sich hierbei um den „Stresstag“ respektive „Kontrolltag“. Durch dieses Crossover-Design konnten Vergleichsdaten von zehn Probanden ohne Konfrontation mit dem Stressor analysiert werden. Der übrige Untersuchungsablauf am Kontrolltag war identisch. Stress- und Kontrolltag wurden per Losverfahren auf den ersten und zweiten Termin randomisiert. Die Hälfte der Probanden absolvierte den Test während des ersten Termins, 16 Teilnehmer wurden erst während des zweiten und letzten Untersuchungstages mit dem Stressor konfrontiert.

Um tageszeitliche homöostatische Schwankungen zu vermeiden fanden die Analysen vormittags in der Zeit von 9 Uhr bis 13 Uhr statt. Pro Vormittag wurden zwei Probanden mit Beginn um 9 Uhr beziehungsweise 11 Uhr untersucht. Zur Vermeidung chronobiologischer Variationen wurde die Uhrzeit für jeden Probanden bei beiden Terminen, Stress und Kontrolle, beibehalten. Um zusätzlich möglichst ähnliche Voraussetzungen zwischen Stress- und Kontrolltag zu erreichen lag bei der Mehrzahl der Probanden ($n = 24$) zwischen beiden Untersuchungstagen ein Zeitabstand von nur einem Tag, der maximale Zeitabstand betrug 17 Tage.

Der Proband wurde zunächst in den Untersuchungsraum begleitet und gebeten, Mobiltelefone auszuschalten, um eine möglichst stimulusarme Situation zu erzeugen. Mitgebrachte Gegenstände wie Taschen wurden für die Versuchsperson nicht erreichbar aufbewahrt.

Nach einer kurzen Erläuterung zum Ablauf des Versuches nahm der Proband auf dem Untersuchungsstuhl Platz und füllte einen Fragebogen aus, auf dem die Ausschlusskriterien nochmals überprüft wurden. Anhand des Versuchsprotokolls wurden Besonderheiten zum aktuellen Gemütszustand, Schlafverhalten während der vergangenen Nacht, eventuellem Alkoholkonsum in der letzten Woche sowie der exakte Untersuchungsbeginn festgehalten. Im Anschluss wurde die Probandeninformationsschrift vorgelegt und der Studienteilnehmer füllte die Einverständniserklärung aus.

Versuchsbeginn:

Zunächst wurde dem Versuchsteilnehmer ein 18-G-Venenverweilkatheter in eine Vene des rechten Unterarms gelegt und mit einem Dreiwegehahn verschlossen. Im Anschluss wurde der Proband über die Videoaufzeichnung und -übertragung in den Nachbarraum und die sprachliche Verbindung mittels eines neben dem Probanden positionierten Mikrophons informiert.

Für die folgenden 25 Minuten wurde der Teilnehmer gebeten, sich zu entspannen, erreicht werden sollte eine maximale Assimilation an die Umgebung und Entspannung. Der Versuchsteilnehmer war bis auf die Blutentnahmen und während des Manometertests alleine im Untersuchungsraum, als Lektüre standen Comichefte für Kinder zur Verfügung. Am Anfang der 25-minütigen Ruhephase füllte der Proband den ersten standardisierten psychologischen Fragebogen aus.

Die Ruhephase wurde durch die erste Blutentnahme beendet, welche die Baseline - Werte darstellt (nachfolgend als „prä“ bezeichnet). Insgesamt erfolgten zu drei Zeitpunkten Blutentnahmen aus dem Venenverweilkatheter.

Vor dem Probanden befand sich auf Augenhöhe ein PC-Bildschirm, der nun, vor Beginn der Testphase, eingeschaltet wurde. Zur Messung der kardiovaskulären Parameter wurden EKG-Elektroden und eine Finapres-Fingerblutdruckmanschette am linken Mittelfinger angelegt. Der Studienteilnehmer wurde gebeten, in den folgenden 20 Minuten die Instruktionen des Computers zu befolgen, nicht zu reden und sich insgesamt möglichst wenig zu bewegen. Zur Rechten des Probanden wurde der Trackball positioniert. Dessen zwei Tasten, „Richtig“ und „Falsch“, im Aufbau den Tasten einer Computermaus entsprechend, stellten das Steuerungsinstrument zur Lösung des Manometertests dar.

Eine Erläuterung der nachfolgenden Testphase befindet sich in Kapitel 4.2.2.

Der Testphase schloss sich eine 25-minütige Entspannungsphase an. Darauf folgte eine letzte Aufzeichnungsphase der kardiovaskulären Parameter („end“). Nach der dritten und letzten Blutentnahme wurde die Venenverweilkanüle entfernt. Die damit gewonnenen immunologischen Daten werden im Folgenden als „post“-Werte bezeichnet.

Zu insgesamt drei Zeitpunkten, in der Ruhephase, nach der Testphase sowie zum Ende des Experiments, waren standardisierte psychologische Fragebögen auszufüllen.

Einen Gesamtüberblick über den Ablauf der Untersuchung nach der Vorbereitungsphase mit Aufklärung des Probanden und Legen der Venenverweilkanüle gibt Abbildung 3. Das Versuchsdesign des Kontrolltages entsprach ebenfalls dem nachfolgend skizzierten Untersuchungsablauf, die Testphase verlief lediglich ohne Exposition des Probanden mit dem Stressor („Stress“). Hier wurde an Stelle des Stresstests eine Messphase der kardiovaskulären Parameter analog der vor- und nachgeschalteten Phasen „prä“ und „post“ erhoben. Der Laborstressor wurde durch die einfache Aufforderung „ruhig und entspannt zu sitzen“, ersetzt.

Ablauf der Untersuchung

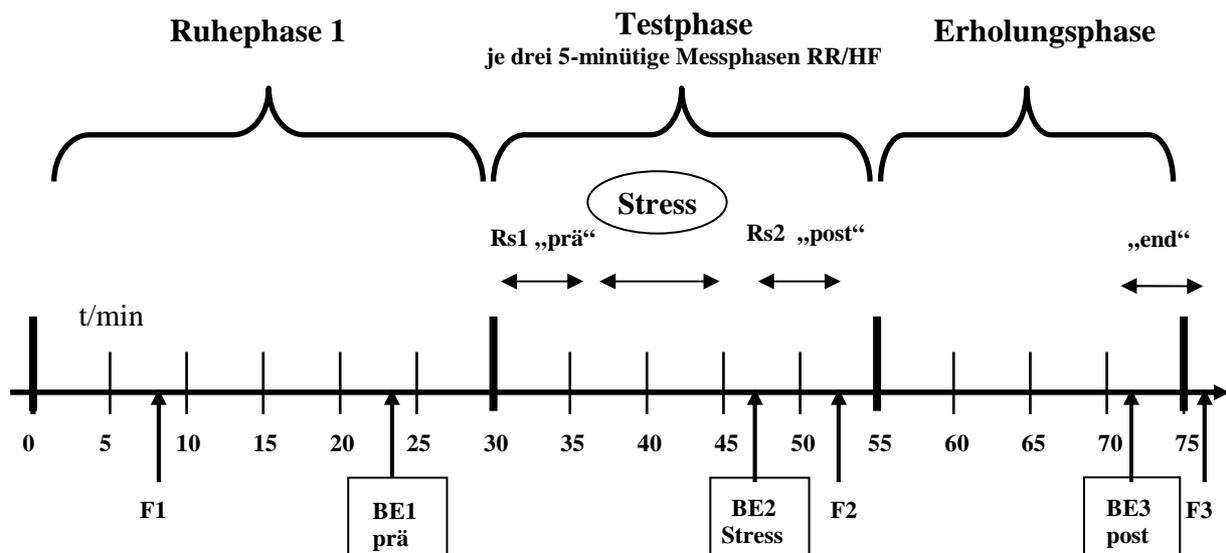


Abbildung 3: Die Abbildung gibt einen Überblick über den Versuchsablauf über alle drei Testphasen nach Abschluss der Vorbereitungsphase. Der Versuch inklusive Vorbereitung erstreckte sich über 90 Minuten.

BE = Blutentnahme mit jeweiliger Bezeichnung „prä“, „Stress“, „post“

F = standardisierte psychologische Fragebögen zu 3 Zeitpunkten (F1, F2, F3)

Während der Testphase erfolgten zu drei Zeitpunkten („prä“, „Stress“, „post“) sowie am Ende des Experimentes („end“) je fünfminütige Messphasen mit Erhebung der kardiovaskulären Parameter Blutdruck und Herzfrequenz.

4.2.2 Psychophysiologischer Belastungstest

Zur Erzeugung einer akuten psychischen Stresssituation absolvierten die Versuchsteilnehmer einen mentalen Belastungstest („MANOMETER“-Test“). Der Test ist Teil des STIMULUS-PROGRAMMS (Johannes B. 1990; Johannes B. 1995), ein standardisiertes Computerprogramm, welches zum Zwecke der psychischen Stressbelastung entwickelt wurde.

Die Testphase besteht aus drei Abschnitten. Der erste und dritte Teil dient der Entspannung des Probanden, dazwischen findet der Manometertest statt. Vor Beginn der Testphase wurde der Testablauf grob erklärt. Alle Instruktionen waren ab nun dem Computerbildschirm zu entnehmen. Nur bei bleibenden Unklarheiten sollte über das Mikrophon gesprochen werden. Die Probanden wurden angewiesen, sich ruhig und konzentriert zu verhalten.

Im Rahmen der nun folgenden Testphase wurde in jeder der drei Teilphasen („rs1“, „Stress“, „rs2“) die fünfminütige kontinuierliche Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter Blutdruck und Herzfrequenz mit Hilfe der Finapres-Fingerblutdruckmanschette aktiviert. Nach der Aufforderung durch den Computer, fünf Minuten „ruhig und entspannt“ zu sitzen (Phase „rs1“), begann der Manometertest. Sofort nach Ende der mentalen Belastung erfolgte die zweite Blutentnahme, das gewonnene Material repräsentiert die Daten unter Einwirkung der psychischen Belastung, im Folgenden als „Stress“ bezeichnet. Auf dem Bildschirm erschien daraufhin erneut die Aufforderung, ruhig und entspannt zu sitzen. In dieser Phase („rs2“) wurden erneut Blutdruck und Herzfrequenz aufgezeichnet („post“).

Im Folgenden wird der Ablauf der Testphase beschrieben.

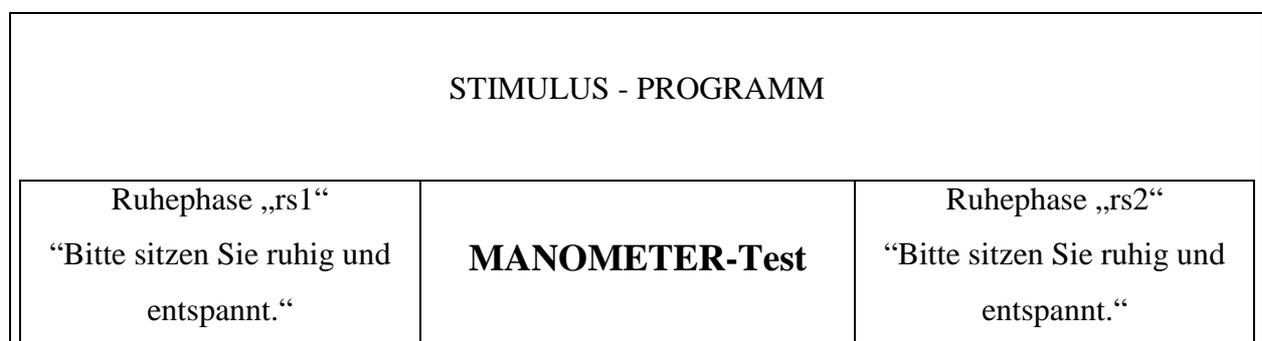


Abbildung 4: Ablauf der Testphase

Probanden und Methoden

- *Ruhephase „rs1“*: Dauer: 5 Minuten

Der PC-Monitor zeigte für 5 Minuten das Standbild: „Bitte sitzen Sie ruhig und entspannt.“; Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter Herzfrequenz und Blutdruck („prä“)

- *Manometer - Test*

Nach einer kurzen Anleitungs- und Übungsphase begann der Test mit 1 bis 11 auf dem Bildschirm erscheinenden Manometeruhren, welche in verschiedene Richtungen weisende Zeiger enthalten. Am oberen Bildschirmrand ist ein Leitzeiger positioniert. Alle weiteren dargestellten Manometeruhren sollen mit diesem Leitzeiger verglichen werden. Eine grafische Darstellung bietet Abbildung 5. Weicht ein Zeiger um mehr als 90° vom Leitzeiger ab, soll mit Hilfe des Trackballs die Antwort „Falsch“, also die rechte Maustaste, gewählt werden. Weicht hingegen nach Ansicht des Teilnehmers keiner der Zeiger um mehr als 90° ab, ist die zu wählende Antwort „Richtig“, entsprechend der linken Taste des Trackballs („information processing task“ nach (Steptoe and Vogele 1991)).

Die Präsentationszeit der einzelnen Bilder nimmt mit jeder gelösten Aufgabe um 30 % ab, das heißt, die Bilder werden immer schneller präsentiert und die Bearbeitungs- und Entscheidungszeit wird kürzer. Akustische Signaltöne markierten jede Falschantwort. Erreicht der Versuchsteilnehmer eine bestimmte Fehlerquote, verlängert sich die Präsentationszeit wieder („time pressure task“ nach (Steptoe and Vogele 1991)). Durch den individuellen Schwierigkeitsgrad wird jeder Versuchsteilnehmer an seiner Leistungsgrenze gehalten, um die Stressbelastung konstant hoch zu halten. Zur Erhöhung der Konzentration und psychischen Aktivität stand die Versuchsleiterin während des Tests mit einer Stoppuhr hinter dem Probanden und hielt ihn zu höherem Engagement an. Während einer fünfminütigen Messphase wurden die kardiovaskulären Parameter Herzfrequenz und Blutdruck erhoben („Stress“). Der Test hat eine Dauer von ungefähr zehn Minuten und endete mit einigen standardisierten Feedback-Fragen zum persönlichen Erleben der Testphase.

Während des Kontrolltages erschien nach Beginn der Testphase auf dem Bildschirm weiterhin lediglich das Standbild „Bitte sitzen Sie ruhig und entspannt.“

- *Ruhephase „r2“*: Dauer: 5 Minuten

Analog zur ersten Ruhephase erschien das Standbild: „Bitte sitzen Sie ruhig und entspannt.“, wiederum wurden die kardiovaskulären Parameter über eine fünfminütige Messphase aufgezeichnet („post“).

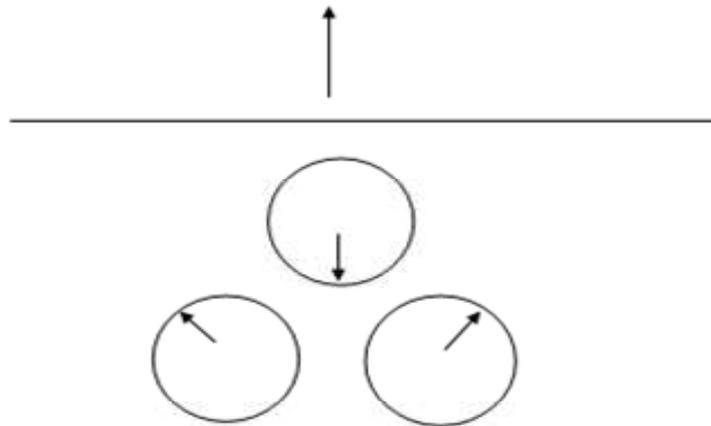


Abbildung 5: Manometertest mit der Präsentation des am oberen Bildrand positionierten Leitzeigers und der Manometeruhren

4.2.3 Physiologische Messparameter

Die Erhebung und Auswertung der kardiovaskulären Parameter Herzfrequenz und systolischer sowie diastolischer Blutdruck diente in vorliegender Studie der Ermittlung und Kontrolle einer psychophysiologischen Aktivierung. Die Messungen erfolgten über 5-Minuten-Intervalle innerhalb der Testphase vor („prä“), während („Stress“), nach („post“) dem Manometertest sowie am Ende der Erholungsphase in einer letzten kontinuierlichen Aufzeichnung ungefähr 30 Minuten nach der Testphase („end“). Der Blutdruck wurde nicht-invasiv mittels eines „FINAPRES“ BP-Monitor Fingerblutdruckgerätes (Ohmeda 2300) erhoben. Die Manschette wurde nach Herstellerangaben angepasst und angelegt. Zusätzlich wurden vier EKG-Elektroden am Oberkörper des Probanden aufgeklebt und die Schlag-zu-Schlag Herzfrequenz mittels EKG-Ableitung nach Goldberger bestimmt.

Vor der statistischen Analyse der Daten erfolgte eine Aufbereitung mit dem Programm ALYS/FAST2-Analyse (Schächinger, Curio & Sudhop 1992/2005). Für jede Aufzeichnungsphase wurde ein Mittelwert für die drei Parameter Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Blutdruck ermittelt. Extremwerte wurden durch Interpolation korrigiert.

4.2.4 Psychodiagnostik

Als Messinstrumente hinsichtlich der Ausprägung des aktuellen Ärgers und der aktuellen Angst dienen in der vorliegenden Untersuchung die state-Fragebögen des State-Trait-Ärgerausdrucksinventars (STAXI) sowie des State-Trait-Angstinventars (STAI-G). Subjektiv empfundene Angst und Ärger als negative Emotionen dienen in der psychoneuroimmunologischen Stressforschung als Parameter zur Messung mentaler Belastungen.

State-Trait-Ärgerausdrucksinventar (STAXI)

Das State-Trait-Ärgerausdrucksinventar (Schwenkmezger 1992) stellt die deutsche Bearbeitung des von Spielberger et al. entwickelten State-Trait-Anger-Expression-Inventory dar. Die in den achtziger Jahren entwickelte deutsche Version des amerikanischen Originals berücksichtigt die Angleichung der ursprünglichen Items an den deutschen Sprachgebrauch und wird in der Erfassung von Ärger und Ärgerausdruck im Rahmen persönlichkeitspsychologischer, allgemein- und sozialpsychologischer Fragestellungen sowie in der Untersuchung psychosomatischer Zusammenhänge bestimmter Erkrankungen wie beispielsweise der essentiellen Hypertonie oder der koronaren Herzerkrankung angewendet. Die Emotion Ärger wird dabei in drei Ärgerausdrucksskalen eingeteilt, den nach außen gerichteten Ärgerausdruck (Anger-out), die Unterdrückung von Ärgerreaktionen (Anger-in) sowie die Ärger – Kontrolle (Anger Control).

Das STAXI-Modell ermöglicht sowohl die Erfassung eines Ärgerzustands (state-anger) sowie der Ärgerdisposition (trait-anger). Unter Ärgerdisposition versteht man die Tendenz einer Person, ein breites Spektrum von Situationen als frustrierend oder störend wahrzunehmen und darauf durch einen erhöhten Ärgerzustand zu reagieren (Schwenkmezger 1992). Ärger als

emotionaler Zustand hingegen entsteht aus Gefühlen der Spannung, Störung, Irritation oder Wut und ist mit einer Aktivierung des autonomen Nervensystems verbunden.

In dem hier präsentierten Experiment interessierte vor allem der momentane Zustandsärger, weshalb wir uns auf den ersten Teil der state – Skalen konzentrierten. Zu Beginn der ersten Ruhephase, nach Abschluss der Testphase sowie am Versuchsende wurden dem Versuchsteilnehmer zehn Items vorgelegt, die sich auf seinen momentanen Ärger bezogen und die er mit den vier Antwortmöglichkeiten „überhaupt nicht“, „ein wenig“, „ziemlich“ oder „sehr“ zu bewerten hatte. Der durch einfache Summation entstehende Punktwert wurde in die statistische Analyse eingebracht. Ein hoher Punktwert wird proportional zu erhöhtem Zustandsärger gewertet.

State-Trait-Angstinventar (STAI-G)

Das State-Trait-Angstinventar (STAI-G) (Laux 1981; Spielberger CD. 1996) stellt die deutsche Adaptation des von Spielberger et al. entwickelten State-Trait-Anxiety-Inventory (STAI) dar und findet sowohl im klinischen Bereich als auch in der Angst- und Stressforschung Anwendung. Es wird zwischen Angst als vorübergehendem emotionalem Zustand (State-Angst) und Ängstlichkeit als Eigenschaft und Persönlichkeitsmerkmal (Trait-Angst) unterschieden (Laux 1981).

In der vorliegenden Studie war vor allem die momentane Zustandsangst im Zusammenhang mit dem mentalen Belastungstest von Bedeutung (state-Skala). Diese ist gekennzeichnet durch Nervosität, innere Unruhe, Anspannung, Besorgtheit, Furcht und einer begleitenden erhöhten Aktivität des autonomen Nervensystems.

Es existieren vier Antwortmöglichkeiten von „überhaupt nicht“ bis „sehr“. Zehn Items gehen in Richtung Angstfreiheit. Um Verneinungs- oder Bejahungstendenzen zu vermeiden, gehen weitere zehn Antwortitems in Richtung Ängstlichkeit. Für die Bildung eines Rohwertes müssen jene Feststellungen invertiert werden, welche in Richtung Angstfreiheit formuliert sind. Der Rohwert nimmt Werte zwischen 20 und 80 an, wobei 20 dem Nichtvorhandensein, 80 einer maximalen Ausprägung der Angst entspricht.

Für das Ausfüllen der verwendeten Skalen wurden jeweils etwa fünf bis acht Minuten benötigt. Die Rohwerte beider Skalen, STAXI und STAI-G, wurden statistisch mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon - Tests für verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede analysiert.

4.3 Blutprobengewinnung und immunologische Analysen

4.3.1 Blutprobengewinnung

Aus dem 30 Minuten vor Beginn der Testphase gelegten Venenverweilkatheter erfolgten zu drei definierten Zeitpunkten Blutentnahmen. Die erste Entnahme fand am Ende der ersten Ruhephase statt. Diese gewonnenen Daten dienten als Ausgangswerte (prä). Das Blutmaterial, welches die immunologischen Parameter unter Stress repräsentierte, erfolgte während der Testphase direkt im Anschluss an den mentalen Belastungstest (Stress). Zur Beurteilung der immunologischen Veränderungen im kurzzeitigen Verlauf diente die letzte Blutentnahme (post) 25 Minuten nach Ende des Stressors gegen Ende der Erholungsphase. Zu jedem Zeitpunkt wurden 3 mal 10 ml Blut in Heparin-Vacutainer entnommen. Die gewonnenen Blutproben wurden im Anschluss an die Probandenuntersuchungen im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin aufbereitet sowie kryokonserviert und im tumorimmunologischen Labor des Onkologischen Zentrums der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf ausgewertet.

4.3.2 Isolierung mononukleärer Zellen

Die Blutproben wurden nach der Entnahme bei Raumtemperatur einige Male bewegt, um eine Vermischung mit dem Antikoagulant zu gewährleisten. Zunächst wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus dem heparinisierten Vollblut isoliert. PBMC beinhalten vor allem B- und T - Lymphozyten, NK-Zellen sowie Monozyten und können mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Zuhilfenahme von Zellseparationsmedien von den übrigen zellulären Blutbestandteilen isoliert werden. In der vorliegenden Studie wurde zu diesem Zweck eine Ficoll - Hypaque - Lösung verwendet. Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren. Für die Blutzell-Fraktionierung wird eine Ficoll - Hypaque - Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml verwendet. Damit besitzt

die Lösung eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Erythrozyten sowie Granulozyten pelletieren bei Zentrifugation am Gefäßboden, da sie die Lösung aufgrund ihrer höheren Dichte passieren. Monozyten und Lymphozyten hingegen sammeln sich aufgrund ihres geringeren spezifischen Gewichts an der Plasma-Gradientenphase. So können sie in einer Interphase zwischen Medium und Plasma als so genannte „MNC-Schicht“ („mononuclear cells“) angereichert werden. Thrombozyten verbleiben aufgrund ihres geringen Zellvolumens zum größten Teil in der obenliegenden Plasmaschicht.

Alle Arbeitsschritte fanden unter einer sterilen Bank und zum Teil auf Eis statt. Zunächst wurden je 15 ml heparinisiertes Vollblut, entsprechend der Hälfte der gewonnenen 30 ml – Blutproben, in einem 50 ml Falcon®-Tube steril mit Phosphate buffered saline (PBS) im Verhältnis 1:2 verdünnt. In einem zweiten Falcon-Tube wurden anschließend 30 ml des Blutgemisches auf 15ml Ficoll – Hypaque-Lösung unter Vermeidung von Wirbelbildung aufgeschichtet und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 2300 Umdrehungen pro Minute (rpm) entsprechend 1100 g ohne Bremse zentrifugiert.

Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig abpipettiert, wobei 1 cm Überstand über dem Lymphozytenring belassen wurde. Nun wurde die als milchige Interphase zwischen Plasma und Ficoll - Hypaque imponierende MNC – Schicht vorsichtig und unter Vermeidung einer gleichzeitigen Überführung der Ficoll - Lösung mit einer 10 ml Pasteur-Pipette abpipettiert und in ein neues 50 ml Teströhrchen überführt. Beide MNC – Schichten der zu Anfang getrennt verdünnten, zusammengehörigen Blutproben wurden dabei in ein gemeinsames Röhrchen überführt. Nach Verdünnung mit PBS und BSA im Verhältnis von 1:3 folgte ein Waschschrift für 10 Minuten bei 4°C, 300 g, entsprechend 1200 Umdrehungen. Anschließend wurde die Population der mononukleären Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und nochmals bei 4° Celsius für 10 Minuten bei 300 g thrombozytenfrei gewaschen. Zur Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer - Zählkammer wurden 10 µl Zellsuspension entnommen, im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau angefärbt und ausgezählt.

4.3.3 Temporäre Kryopreservation, Auftauen der Zellen und Antikörpermarkierung

Unter Verwendung des Gefrierschutzmittels DMSO wurden die isolierten PBMC zeitweise kryokonserviert. Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) aufgenommen. Jeweils 500 µl dieser Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen gegeben und in

Probanden und Methoden

einer mit Isopropylalkohol befüllten Einfrierbox mit einer gleichmäßigen Temperaturreduktion um $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -80°C gekühlt. Zur nachfolgenden Aufbewahrung erfolgte einen Tag später die Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C).

Nach einer raschen Erwärmung der Proben im Wasserbad ($+37^{\circ}\text{C}$) wurden die Zellen durch Zugabe von RPMI (zugesetzt mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) komplett aufgetaut, in Röhrchen mit 10 ml RPMI - Zellkulturmedium überführt und anschließend gewaschen. Zur Vitalitätsanalyse wurden daraufhin 10 μl Zellen mit 10 μl Trypanblau (0,4%) gefärbt, tote Zellen färben sich dabei blau an. Die Zellen wurden auf die verschiedenen FACS Röhrchen verteilt und zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurden die verdünnten Antikörpermischungen zu den Zellen gegeben. Für die Verdünnung wurden durchschnittlich 3 μl Antikörper auf 50 μl AB-Puffer, bestehend aus PBS und 5% humanem AB-Serum der Firma Biotest, verwendet. Die im Einzelfall verwendete Antikörpermenge findet sich in der nachstehenden Tabelle 2. Die Oberflächenfärbung war nach erneuter Waschung mit PBS nach 30 Minuten abgeschlossen. Für die Färbungen wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) sowie Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) verwendet.

Zur intrazellulären Markierung von FOXP3 wurde das entsprechende Röhrchen für 50 Minuten mit 1 ml frisch angesetzter Fix und Perm Solution bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert, zweimal mit PBS und Perm Puffer gewaschen, anschließend mit 2% Rattenserum geblockt und mit 15 μl FOXP3 PE gefärbt. Die Arbeitsschritte orientierten sich im Wesentlichen am Protokoll von e-bioscience / Natutec.

Die nachfolgende Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper:

Probanden und Methoden

Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Markierung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulärem FOXP3; IgG Isotypkontrollen wurden durchgeführt.

Spezifität	Färbung	Bezug von	Menge
CD3	FITC	Caltag, South San Francisco, CA	5 µl
CD4	Per CP	BD Biosciences, San Jose, CA	3 µl
CD8	Per CP	BD Biosciences, San Jose, CA	3 µl
CD45RA	FITC	Caltag, South San Francisco, CA	3 µl
CCR7	APC	R&D Systems, Minneapolis, MN	8 µl
FOXP3 mAB PCH101	PE	e-bioscience, San Diego, CA	15 µl
CTLA-4	PE	BD Biosciences, San Jose, CA	7 µl
GITR	PE	R&D Systems, Minneapolis, MN	7 µl
LAP	Unkonjugiert	R&D Systems, Minneapolis, MN	3 µl
CD25	PE	Caltag, South San Francisco, CA	3 µl

4.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine effiziente Methode der Expressionsanalyse von Oberflächenmolekülen auf Zellpopulationen dar. Daneben lassen sich sowohl Zellgröße als auch Granularität bestimmen. Durchflusszytometrisch lassen sich T-Zell-Subpopulationen anhand ihrer unterschiedlichen Expression von Zelloberflächenproteinen beziehungsweise intrazellulärer Marker, an welche farbstoffmarkierte spezifische monoklonale Antikörper binden, charakterisieren und sortieren.

Das Grundprinzip der Detektion von Zellen und Partikeln mittels fluoreszenzmarkierten Markern ist die Messung durch einen Laserstrahl, welcher beim Auftreffen auf Zellen oder Partikel abgelenkt wird, Fluoreszenzen anregt und dadurch Zellen registriert. Nach der Markierung der in einer Pufferlösung als gemischte Zellpopulation vorliegenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten spezifischen Antikörpern werden die Zellen in einem Probenröhrchen verwahrt. Eine Pumpe baut einen Luftdruck auf, welcher sich auf einen Behälter mit Trägerflüssigkeit

überträgt. Der Druckaufbau im Trägerflüssigkeitsbehälter drückt die Flüssigkeit in eine Messküvette. Das gleichzeitige Ansteigen des Druckes im Probenröhrchen drückt auch die Zellen zusammen mit der Trägerflüssigkeit in die Messküvette, in welcher die Zellsuspension zusammen mit der Trägerflüssigkeit zu einem feinen laminaren Probenstrom ausgezogen wird. Über eine Düse werden die Zellen in feinen Tröpfchen einzeln am Messpunkt vorbeigeleitet. Der laminare Probenfluss in der Messküvette passiert dabei das monochromatische Licht des Laserstrahls, das beim Auftreffen auf die Zellkörper und Bestandteile in der Probe gestreut wird. Die nach vorne gelenkten Strahlen geben Informationen über die Zellgröße, man spricht hierbei auch vom Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC). Das Maß für die zweite wichtige Messgröße, die Zellgranularität, liefert das im 90° – Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht, auch Sidescatter (SSC) genannt. Sind die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder direkt mit Farbstoffen markiert, wird ein Teil der Lichtenergie absorbiert und Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge emittiert. Gestreutes Licht gibt somit Aufschluss über Größe und Granularität der Zellen.

Die Lichtemission durch Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt Aussagen über die Expression von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen, welche die Einordnung in verschiedene Zellpopulationen ermöglichen. Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht und leiten diese Signale digitalisiert an einen Computer zur Analyse weiter. Verfügt das FACS-Gerät über eine Sortierfunktion, wird der elektrisch leitfähige Flüssigkeitsstrom am Ende aufgebrochen. Dadurch zerbricht der Flüssigkeitsstrom in einzelne Tröpfchen, welche je nach Fluoreszenz-Eigenschaften elektrisch positiv oder negativ geladen werden und in einem elektrostatischen Feld ladungsabhängig in unterschiedliche Auffangbehälter geleitet werden.

In der vorliegenden Studie wurde ein „FACS Calibur“ Vierfach-FACS sowie CELLQuest software der Firma BD Biosciences, San Jose, CA, eingesetzt.

4.4 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS für Windows (Versionen 12.0 und 14.0) durchgeführt. Da die Werte keiner Normalverteilung folgten, kam im Rahmen der statistischen Auswertung der zweiseitige Wilcoxon – Test für verbundene Stichproben zur Anwendung.

Probanden und Methoden

Etwaige Korrelationen zwischen kardiovaskulären und immunologischen Parametern wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet.

Für alle Parameter finden sich Median (Med), 25. und 75. Perzentile, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA) sowie die Signifikanz, durch den p-Wert angegeben und durch entsprechende Sterne gekennzeichnet. Ist in der tabellarischen Ergebnisbeschreibung statt eines Sternes „ns“ angegeben, wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Für die hypothesentestenden Parameter sind zusätzlich Minimum und Maximum angegeben. Grafische Darstellungen als Liniendiagramme mit Mittelwerten und deren Standardfehler wurden gewählt, um einen anschaulichen Überblick über den Versuchsverlauf zu ermöglichen.

Das Signifikanzniveau wurde in der vorliegenden Arbeit auf $p < 0,05$ (*) festgelegt mit entsprechend deutlicherer Signifikanz bei $p < 0,01$ (**) beziehungsweise $p < 0,001$ (***). Die p-Werte sind durch einen, zwei beziehungsweise drei Sterne gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Allgemeine Probandendaten

Die im Folgenden geschilderten Ergebnisse beziehen sich auf eine Stichprobe von n=31 Probanden, welche im Rahmen des vorliegenden Experiments untersucht wurden.

Das Alter der Versuchspersonen lag im Median bei 26,1 Jahren mit einem Range von 21 bis 41 Jahren. Der BMI nach Broca (kg/m²) betrug im Median 22,15 und variierte von 19,8 bis 26,9. Damit war keiner der Teilnehmer untergewichtig, drei Probanden lagen mit einem BMI von über 25 kg/m² leicht über der Normgewichtsgrenze. Von den 25 Studenten waren 13 Probanden im Fach Medizin eingeschrieben. Bei den berufstätigen Teilnehmern handelte es sich um einen Arzt, einen Sanitätsoffizieranwärter, einen Kameramann sowie einen Tischler. Ein Proband gab lediglich eine selbstständige Tätigkeit an und ein weiterer Versuchsteilnehmer befand sich zum Zeitpunkt des Experimentes auf Arbeitssuche.

Tabelle 3: Allgemeine Daten des Probandenkollektivs

Alter in Jahren	Median Range	26,1 21 – 41
BMI nach Broca (in kg/m ²)	Median Range	22,15 19,8 – 26,9
Geschlecht	männlich weiblich	31 0
Schulabschluss	Abitur mittlere Reife	30 1
Aktuelle Tätigkeit	Student berufstätig	25 6
Familienstand	ledig verheiratet geschieden	29 2 0

5.2 Psychologische Aktivierung

Zur Ermittlung etwaiger Veränderungen des subjektiv empfundenen Zustandsärgers (state-Bogen des State-Trait-Ärgerausdrucksinventars „STAXI“) sowie der aktuellen Zustandsangst (state-Skala des State-Trait-Angsinventars „STAI-G“) wurden den Teilnehmern vor Beginn der

Ergebnisse

ersten Ruhephase („prä“), direkt im Anschluss an die Testphase („Stress“) sowie am Versuchsende („post“) standardisierte psychologische Fragebögen vorgelegt.

Der Vergleich der erhobenen Rohwerte der Gesamtstichprobe mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben zeigte einen stark signifikanten Anstieg ($p < 0,01$) des subjektiv empfundenen Ärgers nach Einwirken des Stressors. Auch die subjektiv empfundene Angst zeigte einen tendenziellen Anstieg direkt im Anschluss an die Testphase. Der p-Wert lag mit 0,14 jedoch außerhalb des Signifikanzniveaus. Nach der Stressphase („post“) erreichten die Werte beider Skalen das Ausgangsniveau. Am Kontrolltag konnten keine signifikanten Anstiege beider Skalen über die Zeit beobachtet werden.

Eine Darstellung der statistischen Parameter Median inklusive 25. und 75. Perzentile, Standardabweichung, Mittelwert, Minimum, Maximum sowie die Signifikanz anhand des p-Wertes befindet sich in Tabelle 4.

Um die Veränderungen über den zeitlichen Verlauf sowohl an Stress- als auch am Kontrolltag besser zu veranschaulichen, findet sich in Abbildung 6 eine grafische Darstellung der Veränderung der Mittelwerte von Zustandangst und Zustandsärger an beiden Untersuchungstagen.

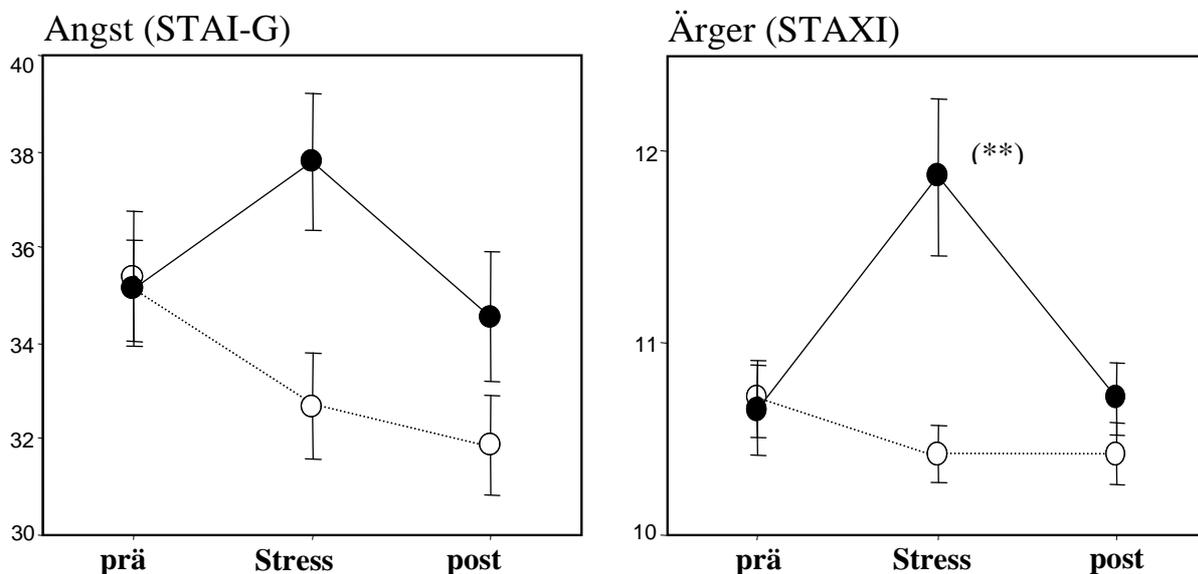


Abbildung 6: Psychologische Aktivierung der Probanden im Versuchsverlauf am Stresstag (schwarze Markierung) sowie am Kontrolltag (weiße Markierung) hinsichtlich subjektiv empfundener Angst (STAI-G) und subjektiv empfundenem Ärger (STAXI) zu den drei Zeitpunkten „prä“, „Stress“ und „post“ (Rohwerte der Skalen).

Ergebnisse

Tabelle 4: Veränderung von Zustandsärger (STAXI) und Zustandsangst (STAI-G) am Stresstag (S) sowie am Kontrolltag (K). Dargestellt sind 25. Perzentile, Median (MED), 75. Perzentile, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Minimum, Maximum sowie die Signifikanz anhand des durch den zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben erhobenen p-Wert (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Rohwerte		25.Perz.	MED	75.Perz.	MW	SA	Min	Max	Sig.
STAXI S	prä	10	10	11	10,7	1,3	10	16	-
	Stress	10	11	13	11,9	2,3	10	18	**
	post	10	10	11	10,7	1,1	10	14	ns
STAXI K	prä	10	10	12	10,7	1,1	10	14	-
	Stress	10	10	11	10,4	0,8	10	13	ns
	post	10	10	10	10,4	0,9	10	13	ns
STAI-G S	prä	31	35	39	35,1	6	24	47	-
	Stress	32	37	45	37,8	8	25	53	ns
	post	30	34	42	34,6	7,6	21	51	ns
STAI-G K	prä	31	34	38	35,4	7,8	23	53	-
	Stress	29	32	36	32,7	6,2	21	49	**
	post	27	32	35	31,9	5,7	21	49	***

5.3 Physiologische Aktivierung

Zur Messung der kardiovaskulären Aktivierung der Teilnehmer unter Stress und in Ruhe wurden die Parameter Herzfrequenz, der systolische sowie der diastolische Blutdruck erhoben. Die kontinuierlichen Messungen erfolgten sowohl am Stress- als auch am Kontrolltag zu vier Zeitpunkten: vor der Stressphase („prä“), während der Testphase („Stress“), im Anschluss an den Test („post“) sowie nach ungefähr zwanzig Minuten gegen Ende des Experiments („end“). Die erhobenen Werte wurden über die Messphasen gemittelt und mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben analysiert.

Unter Einfluss des Stressors zeigte sich ein hoch signifikanter Anstieg (p<0,01) der Herzfrequenz um 6,7 Schläge pro Minute von einem Median von 68,7 auf 75,4 Schläge pro Minute. Kurze Zeit nach Beendigung der Belastungsphase kehrte die Herzfrequenz wieder auf das Ausgangsniveau zurück. In der letzten Messphase gegen Versuchsende zeigte sich ein

Ergebnisse

Herzfrequenzabfall ($p < 0,05$) unter den Ausgangswert. Am Kontrolltag konnten keine signifikanten Veränderungen der Herzfrequenz beobachtet werden. Der folgende Boxplot (Abbildung 7) zeigt die Veränderungen unter Einfluss des Stressors.

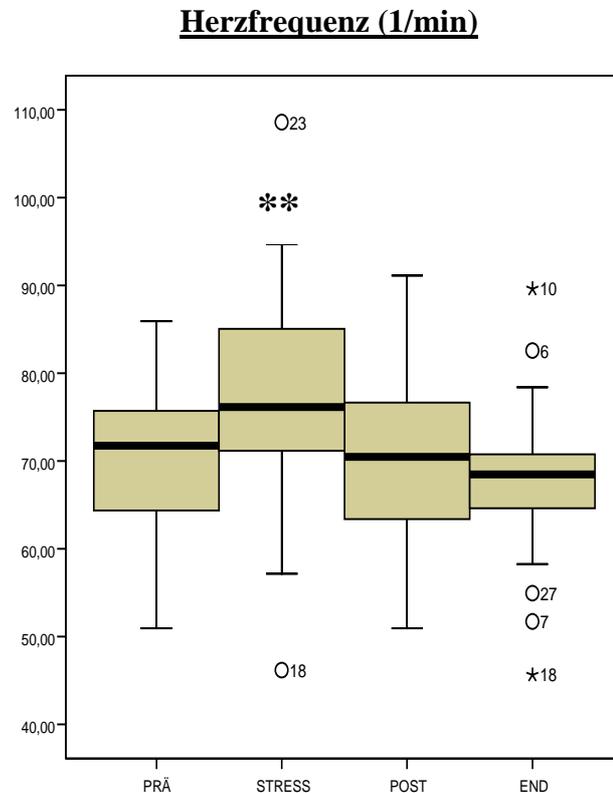


Abbildung 7: Herzfrequenz in Schlägen pro Minute über den Versuchsverlauf unter Einwirkung des mentalen Belastungstests zu den vier Messzeitpunkten „prä“, „Stress“, „post“, „end“. Während der Stressbelastung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz: ** $p < 0,01$

Auch der systolische und diastolische Blutdruck demonstrierten unter Einfluss des Laborstressors hochsignifikante Anstiege ($p < 0,001$). Sie blieben über den Versuchszeitraum erhöht. Unter Einfluss der Stressbelastung zeigte sich bei Betrachtung der Mediane ein Anstieg des systolischen Blutdrucks um durchschnittlich 44,2 mmHg sowie des diastolischen Blutdrucks um 13,4 mmHg (Median) im Vergleich zu den Ausgangswerten. Der Kontrolltag zeigte bezüglich des systolischen und diastolischen Blutdrucks bis auf einen leichten Anstieg des systolischen Blutdrucks ($p < 0,05$) am Versuchsende keine Veränderungen. Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Blutdruckveränderungen unter Einfluss des Stressors. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Herzfrequenz- und Blutdruckveränderungen am Kontrolltag, also ohne eine Exposition des Probanden mit dem Stressor.

Blutdruck unter Einfluss der Stressbelastung

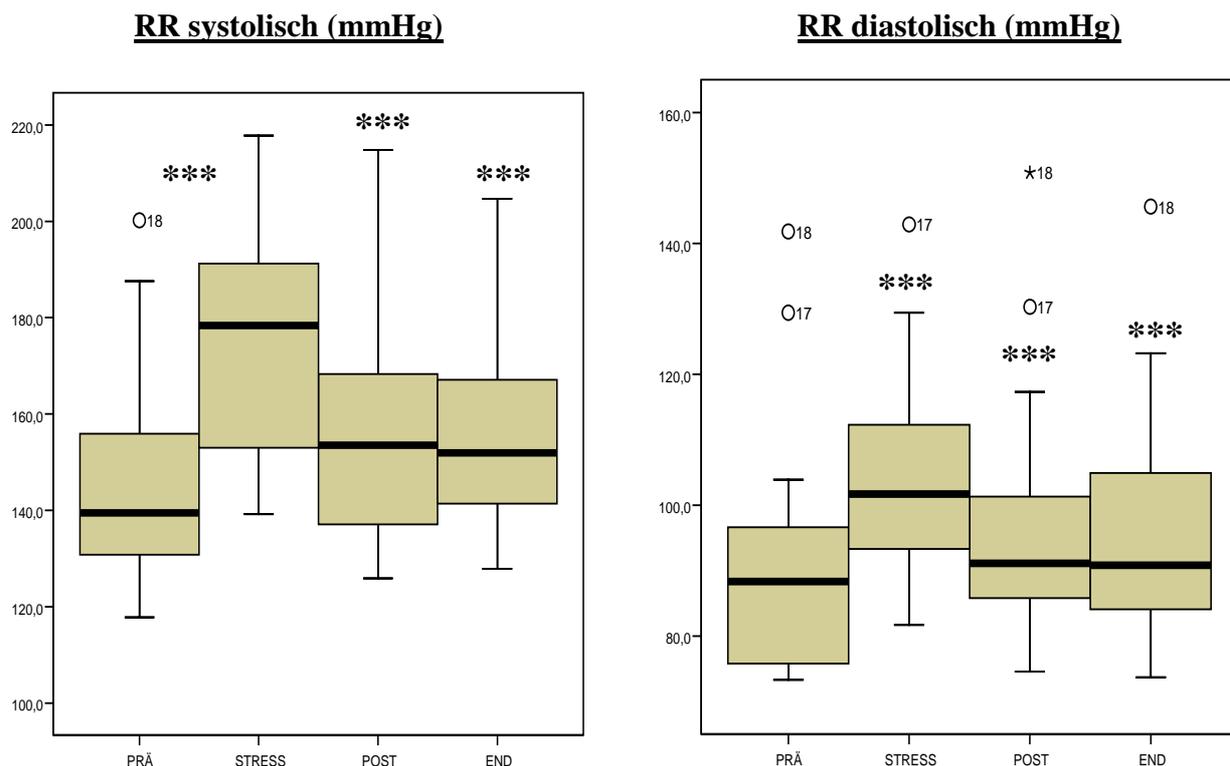


Abbildung 8: Systolischer und diastolischer Blutdruck (in mmHg) über den Versuchsverlauf unter Einwirkung des mentalen Belastungstests zu den vier Messzeitpunkten „prä“, „Stress“, „post“ und „end“. Unterschiede im Vergleich mit den Ausgangswerten („prä“) wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben überprüft. *** p<0,001.

Tabelle 5: Kardiovaskuläre Parameter am Kontrolltag. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Anstieg der kardiovaskulären Parameter zum Zeitpunkt „Stress“. Dargestellt sind 25. Perzentile, Median (Med), 75. Perzentile, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA) und die Signifikanz anhand des p-Wertes (* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) zu den vier Messzeitpunkten.

Kontrolle		25.Perz.	Med	75.Perz.	MW	SA	Sig.
HF (1/min)	prä	61,3	68,1	75,4	68,1	10,3	-
	Stress	60,8	69,1	78,3	68,6	10,5	ns
	post	61,3	65,9	76,4	68,3	10,1	ns
	end	59,9	64,2	76,4	66,5	10,3	ns
RR sys (mmHg)	prä	126,9	141,3	152	141,6	20,3	-
	Stress	134,3	144,2	159,8	141,2	30,9	ns
	post	127,6	143,1	151,1	141,9	20,9	ns
	end	135,8	146,4	160,2	142,4	30,7	*
RR dia (mmHg)	prä	76	83,2	101	87,9	17,2	-
	Stress	77,1	81,2	101,7	87,7	16,4	ns
	post	73,8	82,3	98,3	86,1	17,7	ns
	end	77,5	88,9	103,8	89,1	15,4	ns

5.4 Immunologische Parameter

5.4.1 Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie auf T-Zell- Subpopulationen

Im Anschluss wurde untersucht, ob sich die beobachtete psychophysiologische Aktivierung in einer spezifischen Umverteilung peripherer T-Zellsubpopulationen äußern würde. Vor der Analyse CD4⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen erfolgte daher eine Untersuchung peripher zirkulierender T-Zellsubpopulationen unter Einfluss der akuten mentalen Belastung.

Nach Isolierung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC), anschließender Färbung und Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD45RA und CCR7 erfolgte eine quantitative Erfassung mittels Durchflusszytometrie. Dementsprechend wurden neben dem Anteil aller CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen alle vier Möglichkeiten der CCR7/CD45RA-Expression analysiert und somit eine Einteilung in „naive“ T-Zellen, zentrale T-Gedächtniszellen, T-Effektor-Gedächtniszellen sowie terminal differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen vorgenommen.

Unter Einfluss des Stressors zeigten sich bei der Untersuchung der Gesamtheit der Stichprobe (n=31) im Falle der CD8⁺ T-Zellen bis auf einen leichten Abfall am Versuchsende (p<0,05) keine signifikanten Veränderungen. Der Median des Anteils aller CD8⁺ Zellen betrug anfangs 28,1% (25.Perz.: 24,6% - 75.Perz.: 33,9%), unter Stress 30% (25.Perz.: 21,6% - 75. Perz.: 35,6%) und nach der Erholungsphase 27,25% (25.Perz.: 21,6% - 75.Perz.: 33,2%). Eine Betrachtung der Mediane der peripheren CD4⁺ T-Zellen ergab einen Abfall unter Stress („prä“: 38,1% 25.Perz.: 32,3% - 75.Perz.: 42,9%; „Stress“: 31,1% 25.Perz.: 25,8% - 75.Perz.: 35,3% p<0,001). Nach der Erholungsphase kehrten die Werte wieder auf das Ausgangsniveau zurück („post“: Med.: 35,2% 25.Perz.: 30,6% - 75.Perz.: 38,8%). Bei Fehlen des Stressors am Kontrolltag konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum keinerlei signifikante Veränderungen beobachtet werden.

T-Zellsubpopulationen T_{NAIVE}, T_{CM}, T_{EM} und T_{EMRA} :

Es zeigte sich ein im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikanter, prolongierter Abfall des Anteils CD4⁺ und CD8⁺ naiver (CCR7⁺CD45RA⁺) T-Zellen im peripheren Blut der Probanden (CD4⁺ p<0,01; CD8⁺ p<0,001), welcher auch nach Ende der zweiten Ruhephase noch nachweisbar war (CD4⁺ p<0,01; CD8⁺ p<0,01). Auch der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ zentraler T-Gedächtniszellen (CCR7⁺CD45RA⁻) sank unter Einfluss des Stressors (CD4⁺ p<0,05 und CD8⁺

Ergebnisse

$p < 0,01$) ab und blieb im Falle der $CD8^+$ zentralen T-Gedächtniszellen auch nach der Erholungsphase unter dem Ausgangsniveau ($p < 0,05$).

$CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektor-Gedächtniszellen ($CCR7^-CD45RA^-$) blieben über den Versuchsverlauf auf stabilem Niveau, gleichzeitig zeigte sich ein verzögerter Anstieg $CD4^+$ T-Effektor-Gedächtniszellen nach der Erholungsphase zum Zeitpunkt „post“ ($p < 0,05$). Auch der Anteil peripherer $CD8^+$ terminal differenzierter T-Effektor-Gedächtniszellen ($CCR7^-CD45RA^+$) zeigte unter Einfluss des Stressors einen stark signifikanten Anstieg ($p < 0,01$). $CD4^+$ terminal differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen blieben auf dem Ausgangsniveau. Eine Analyse der T-Zellsubpopulationen am Kontrolltag lieferte über den gesamten Untersuchungszeitraum keine statistisch signifikanten Veränderungen. Die Abbildungen 9 und 10 geben einen Überblick über den Verlauf der Mittelwerte im Versuchsverlauf und dienen einer grafischen Gegenüberstellung der Ergebnisse am Stress- sowie am Kontrolltag.

$CD4^+$ T Zellsubpopulationen im Versuchsverlauf

(% an Gesamtlymphozyten)

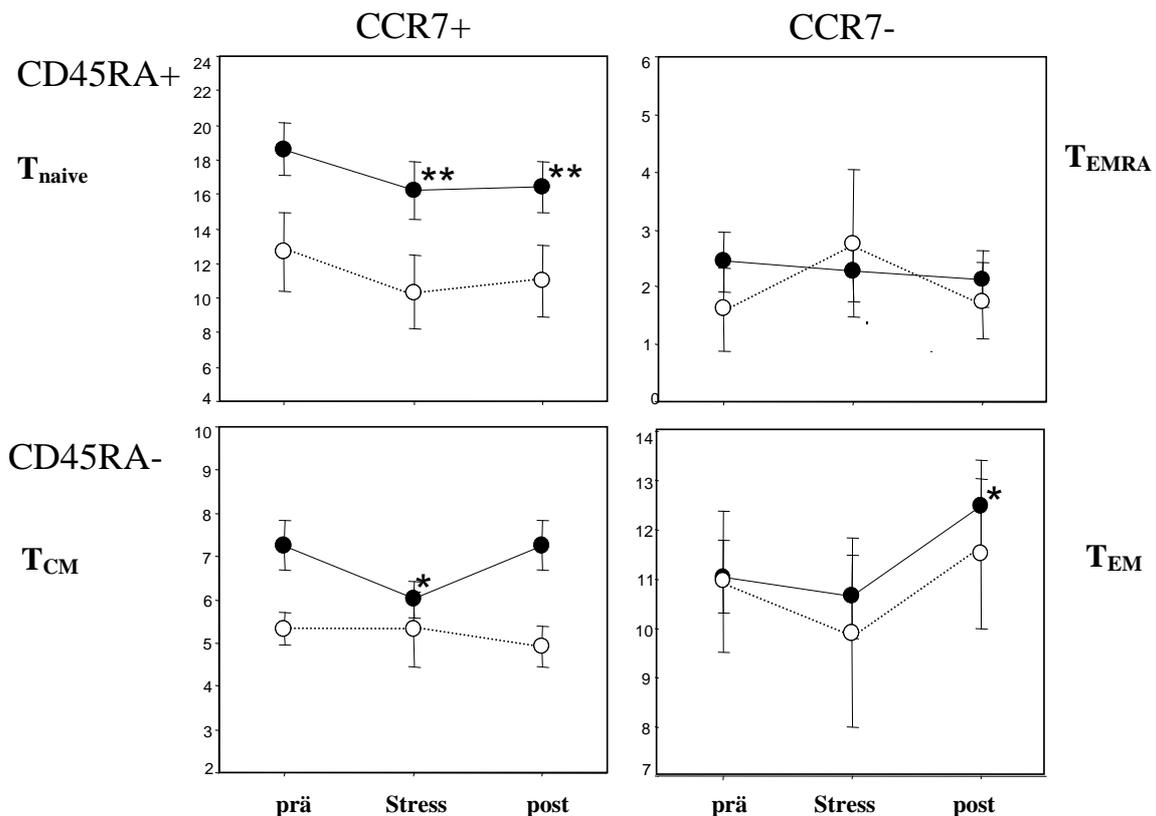


Abbildung 9: $CD4^+$ T-Zellen: T-Zellsubpopulationen über den Versuchsverlauf vor („prä“), während („Stress“), nach der mentalen Belastung („post“) sowie am Kontrolltag. Schwarz markierte Linien repräsentieren die Mittelwerte unter Stress, weiß markierte Linien die Ergebnisse am Kontrolltag. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ergebnisse

CD8⁺ T Zellsubpopulationen im Versuchsverlauf

(% an Gesamtlymphozyten)

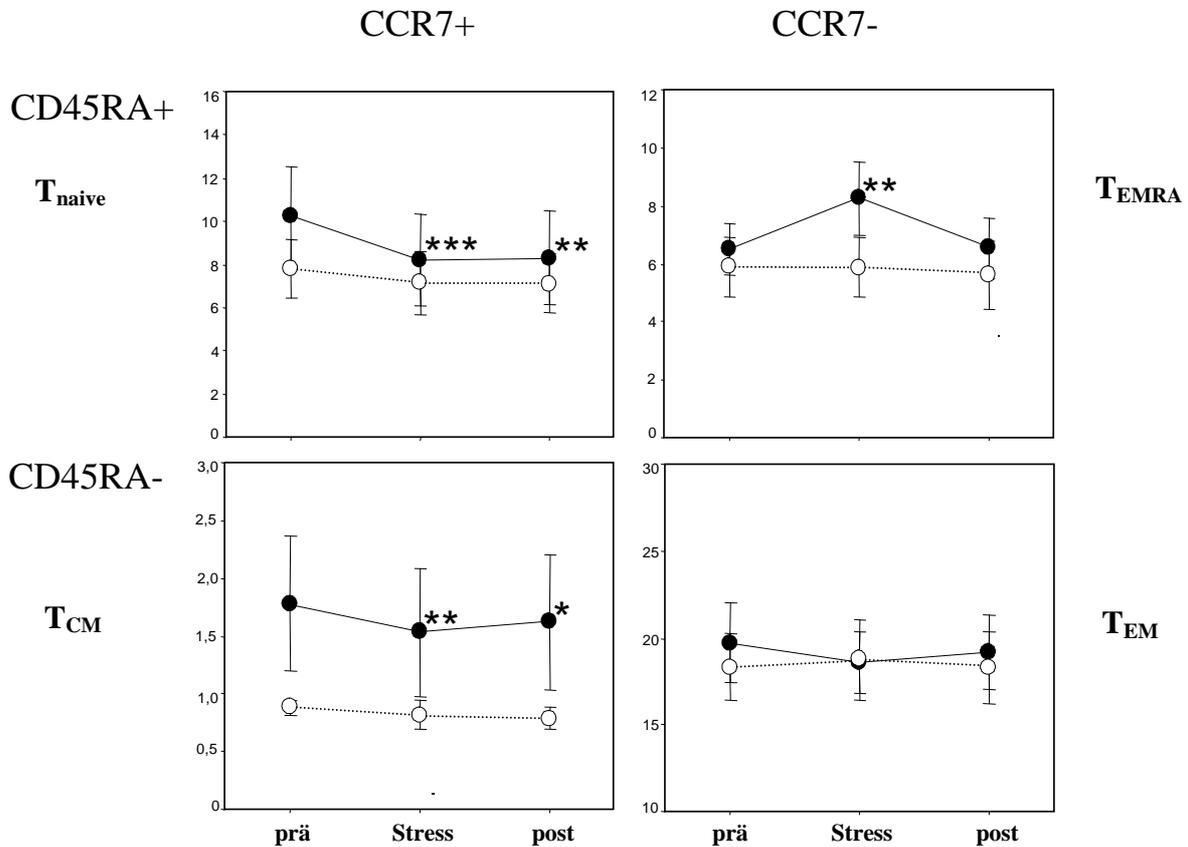


Abbildung 10: CD8⁺ T-Zellen: Naive T-Zellen (T_{naive}), zentrale T-Gedächtniszellen (T_{cm}), T-Effektorzellen (T_{em}) sowie terminal differenzierte T-Effektorzellen (T_{emra}) über den Versuchsverlauf vor („prä“), während („Stress“) sowie nach der mentalen Belastung „(post“) sowie am Kontrolltag. Die Werte sind als prozentualer Anteil an den Gesamtlymphozyten angegeben. Signifikanzen sind durch * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 gekennzeichnet. Schwarz markierte Linien in den Abbildungen 9 und 10 repräsentieren die Mittelwerte und deren Standardfehler unter Stress, weiß markierte Linien zeigen die Ergebnisse am Kontrolltag.

Zusammenfassend zeigten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen unter Einfluss der psychischen Belastung einen signifikanten Abfall naiver und zentraler T-Gedächtniszellen. Antigenerfahrene T-Effektor-Gedächtniszellen sowie terminal differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen demonstrierten hingegen stressinduzierte Anstiege im peripheren Blut oder blieben auf stabilem Niveau. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen mit der Auflistung der relevanten statistischen Parameter befindet sich im Anhang in Tabelle 8.

5.4.2 Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen im peripheren Blut: Ergebnisse zu Hypothese 1

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob die beobachteten Umverteilungen nicht-regulatorischer, konventioneller T-Zellen von einer stressinduzierten Veränderung CD4⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen begleitet sein würden. Zu diesem Zweck erfolgten vor Beginn des Stressors („prä“), direkt im Anschluss („Stress“) sowie nach einer Erholungsphase peripher-venöse Blutentnahmen. Die Erfassung der regulatorischen T-Zellen erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen den intrazellulären Marker FOXP3. Zusätzlich erfolgte eine Auftrennung der regulatorischen T-Zellen nach ihrer CCR7- Expression.

Veränderungen des Anteils regulatorischer T-Zellen an den Gesamtlymphozyten wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben analysiert. Die Ergebnisse der statistischen Analyse beziehen sich auf den Vergleich der Baseline („prä“) mit den beiden Folgezeitpunkten („Stress“, „post“).

CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen unter akutem Stress im Vergleich mit den Ausgangswerten

Unter Einfluss des Stressors zeigte sich im Vergleich zu den Ausgangswerten ein signifikanter Abfall des Anteils CD4⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen ($p < 0,01$) im peripheren Blut. Am Kontrolltag konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden.

CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen nach der Erholungsphase im Vergleich mit den Ausgangswerten

Nach der Erholungsphase kehrte der Anteil CD4⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Auch zu diesem Zeitpunkt zeigten sich am Kontrolltag keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Zusammenfassend kam es unter der akuten Stressbelastung zu einem statistisch signifikanten Abfall von CD4⁺FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen. Gegen Ende der Untersuchung kehrten die Werte wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Abbildung 11 gibt einen Überblick über den Verlauf über die drei Messzeitpunkte.

Ergebnisse

CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen

(% an Gesamtlymphozyten)

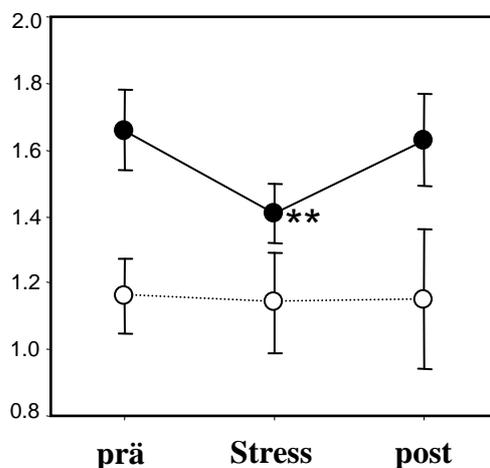


Abbildung 11: CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen der Probanden am Stress- und am Kontrolltag zu den drei Messzeitpunkten „prä“, „Stress“ und „post“. Die Werte sind als prozentualer Anteil an den Gesamtlymphozyten angegeben und zeigen den Verlauf der Mittelwerte und deren Standardfehler. Schwarze Markierungen repräsentieren die Werte unter Stress, weiße Markierungen stellen die Kontrolldaten dar. **p<0,01

Tabelle 6: CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen an Stress- und Kontrolltag. Dargestellt sind die 25. Perzentile, Median (Med), 75. Perzentile, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Minimum (Min), Maximum (Max) sowie die Signifikanz anhand des durch den zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben erhobenen p-Wertes (** p<0,01).

% an Gesamtlymphozyten		25.Perz.	Med	75.Perz.	MW	SA	Min	Max	Sig.
Stresstag CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	prä	1,12	1,63	2,09	1,66	0,68	0,43	2,27	-
	Stress	1,09	1,35	1,73	1,4	0,53	0,27	2,69	**
	post	1,14	1,45	2,13	1,63	0,76	0,34	2,4	ns
Kontrolltag CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	prä	0,8	1,26	1,4	1,16	0,35	0,6	5	-
	Stress	0,62	1,18	1,59	1,14	0,47	0,14	3,3	ns
	post	0,68	0,94	1,42	1,15	0,69	0,32	3	ns

Ergebnisse

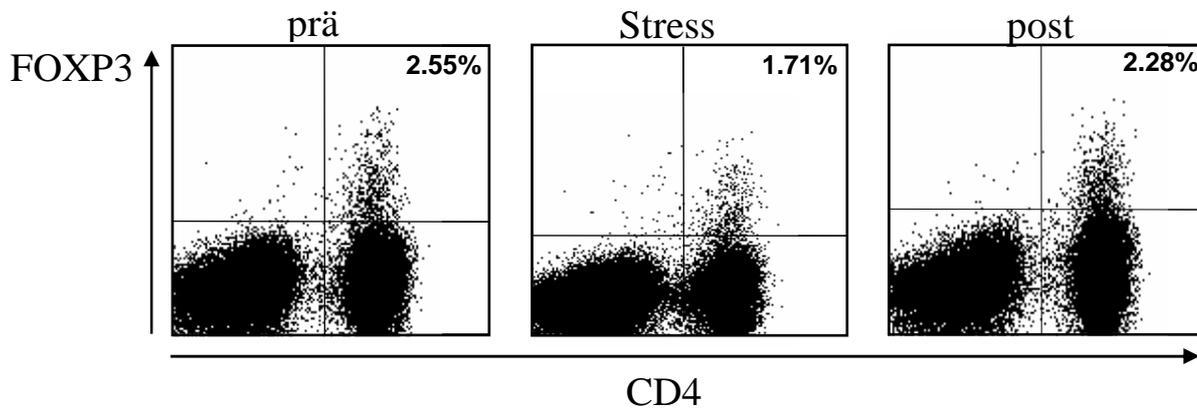
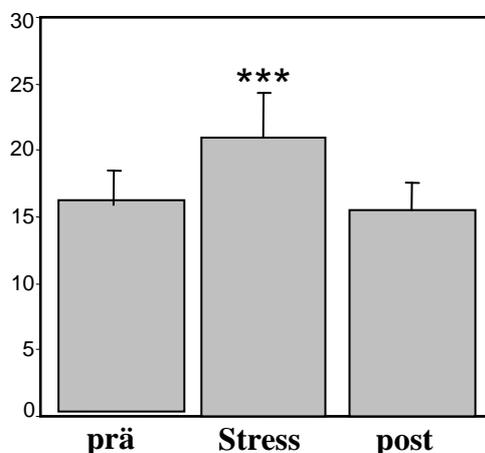


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses der durchflusszytometrischen Auswertung eines Probanden als dot-plot: CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen vor („prä“), während („Stress“) sowie nach („post“) der Stresseinwirkung mit dem Ergebnis eines Abfalls CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt „Stress“.

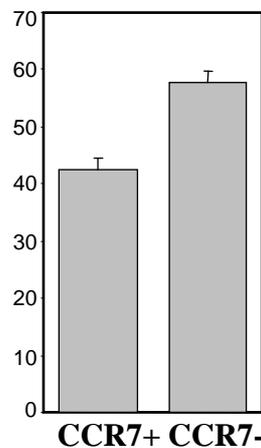
Eine zentrale Aufgabe regulatorischer T-Zellen besteht in der Suppression konventioneller T-Effektorzellen. Daher wurde untersucht, ob der beobachtete Abfall von Tregs zu einer Veränderung des Quotienten aus CD8⁺CCR7⁺ Effektorzellen und CD4⁺FOXP3⁺ Tregs, zwei immunologisch entgegengesetzt wirkenden Zellpopulationen, begleitet sein würde. CD8⁺CCR7⁺ Effektorzellen gehören zu den T-Zellen mit dem ausgeprägtesten zytolytischen Potential und zeigten auch in der vorliegenden Arbeit stressinduzierte Anstiege. Es stellte sich ein signifikanter Anstieg des Quotienten aus CD8⁺CCR7⁺ und CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen dar ($p < 0,001$). Nach der Erholungsphase kehrte der Quotient auf das Ausgangsniveau zurück (Abbildung 13 a).

Eine Analyse der nach der Expression von CCR7 charakterisierten Subpopulationen der untersuchten CD4⁺FOXP3⁺ Tregs zeigte, dass es sich bei den CD4⁺FOXP3⁺ Tregs überwiegend um CCR7-negative T-Zellen handelte (Abbildung 13 b).

a) Quotient $CD8^+CCR7^-/CD4^+FOXP3^+$



b) Unterteilung $CD4^+FOXP3^+$ Tregs nach ihrer CCR7-Expression



Abbildungen 13a und 13b: Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem beobachteten Anstieg $CD8^+CCR7^-$ zytotoxischer T-Zellen und $CD4^+FOXP3^+$ Tregs wurde der Quotient für alle drei Zeitpunkte berechnet (Abbildung 13a). P-Werte wurden mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben berechnet, *** $p < 0,001$.

Abbildung 13b zeigt die Unterteilung von $CD4^+FOXP3^+$ T-Zellen zum Zeitpunkt „prä“ (Baseline) in $CCR7^+$ und $CCR7^-$ T-Zellen.

Mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurde untersucht, ob das Ausmaß des Herzfrequenzanstiegs der Versuchsteilnehmer mit dem Abfall $CD4^+FOXP3^+$ regulatorischer T-Zellen korreliert sein würde. Die Korrelationsanalyse ergab keinen relevanten Zusammenhang ($R = -0,199$), die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Auch bei der Untersuchung eines etwaigen Zusammenhangs zwischen Herzfrequenz und Umverteilung der T-Zellsubpopulationen fand sich nur eine sehr schwache Korrelation (Range von $R = -0,298$ bis $R = 0,157$).

Korrelationsanalyse: Herzfrequenzanstieg und Treg-Abfall

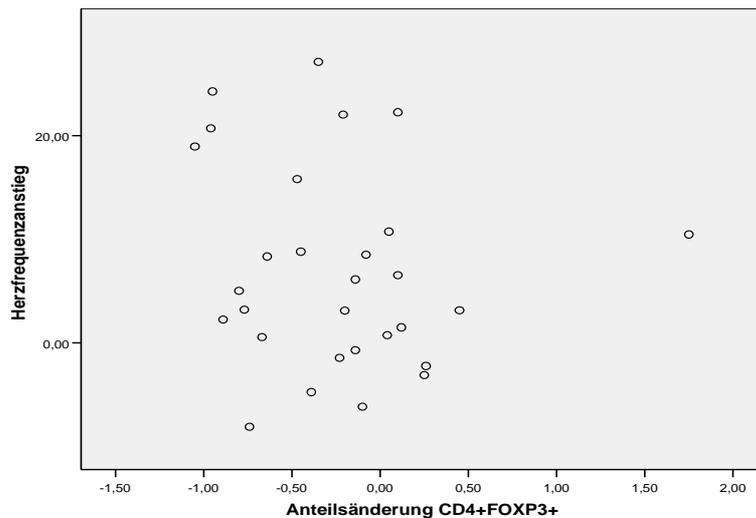


Abbildung 14 Die Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Herzfrequenzanstieg der Teilnehmer und der Änderung im Anteil CD4⁺FOXP3⁺ Tregs von der ersten („prä“) zur zweiten Blutentnahme kurz nach der Stresseinwirkung („Stress“) zeigte keinen relevanten Zusammenhang.

5.4.3 Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺LAP⁺ und CD4⁺GITR⁺ T-Zellen: Ergebnisse zu Hypothese 2

Verschiedene Effektormoleküle sind eng mit der Funktion von Tregs assoziiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die gewonnenen Zellen auf die Expression der Effektormoleküle CTLA-4, GITR sowie LAP im peripheren CD4⁺ T-Zellpool untersucht. Die PBMC wurden mithilfe von spezifischen Antikörpern gefärbt, durchflusszytometrisch erfasst und anschließend auf statistisch signifikante Unterschiede gegenüber den Ausgangswerten („prä“) mit Hilfe des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben getestet.

Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen

Das „Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4“ (CTLA-4) ist ein zentraler Mediator immunsuppressiver Wirkungen von Tregs. Unter Einfluss des Laborstressess zeigte sich ein zeitgleicher Abfall von CD4⁺FOXP3⁺ Tregs und von CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt „Stress“. Nach der Erholungsphase konnte ein leichter Anstieg von CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen beobachtet werden ($p < 0,05$).

Ergebnisse

Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺GITR⁺ T-Zellen

GITR („Glukocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene“) ist ein Oberflächenrezeptor, welcher auf Tregs sowie auf aktivierten konventionellen T-Zellen exprimiert wird. Der akute Laborstress bewirkte keine Veränderung des Anteils von CD4⁺ T-Zellen, welche GITR exprimierten.

Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺LAP⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen, welche das „Latency associated peptide“ (LAP) koexprimieren demonstrierten unter Einfluss des Stressors einen stark signifikanten Abfall ($p < 0,001$) in ihrem Anteil an den Gesamtlymphozytenzahlen. Nach Ende der Erholungsphase kehrten die Werte auf das Ausgangsniveau zurück.

Wie bei den übrigen untersuchten Zellpopulationen konnten am Kontrolltag keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine Übersicht über die Werte im Versuchsverlauf gibt Abbildung 15, eine vollständige Darstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 7.

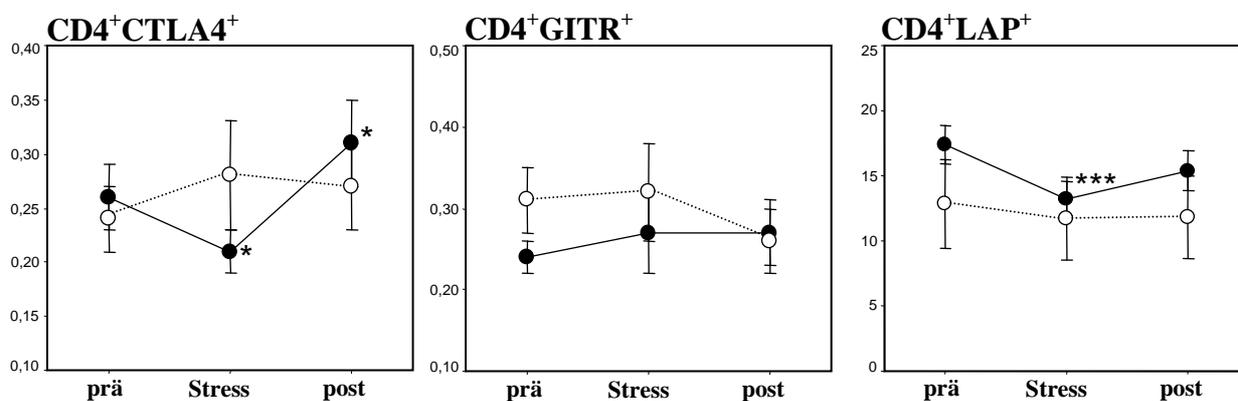


Abbildung 15: Überblick über Expressionsveränderungen der eng mit der Funktion von Tregs assoziierten Effektormoleküle CTLA-4, GITR und LAP auf CD4⁺ T-Zellen (Mittelwert und SEM). Die Messungen erfolgten nach der ersten Ruhephase (prä), nach dem Stresstest (Stress) sowie nach Ende der zweiten Ruhephase (post). Stress- und Kontrolldaten sind in der gleichen Grafik dargestellt. Schwarze Markierungen repräsentieren die Daten unter Stress, weiße Markierungen die jeweiligen Kontrolldaten. Sterne repräsentieren signifikante Veränderungen (zweiseitiger Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) im Vergleich zur Baseline: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

Tabelle 7: CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺GITR⁺ sowie CD4⁺LAP⁺ T-Zellen an Stress- und Kontrolltag. Dargestellt sind 25. Perzentile, Median (Med.), 75. Perzentile, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA), Minimum (Min.) und Maximum (Max.) sowie die Signifikanz anhand des durch den zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben erhobenen p-Wertes (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001). Die Daten sind als prozentualer Anteil an den Gesamtlymphozyten dargestellt.

% an Gesamtlymphozyten		25.Perz.	Med	75.Perz.	MW	SA	Min	Max	Sig.
<u>Stresstag</u>									
CD4⁺CTLA-4⁺	prä	0,17	0,2	0,28	0,26	0,15	0,09	0,67	-
	Stress	0,12	0,19	0,25	0,21	0,12	0,06	0,63	*
	post	0,16	0,26	0,37	0,32	0,22	0,08	1,22	*
CD4⁺GITR⁺	prä	0,13	0,26	0,31	0,24	0,12	0,04	0,57	-
	Stress	0,1	0,19	0,34	0,27	0,25	0,03	1,28	ns
	post	0,12	0,18	0,35	0,27	0,22	0,05	1,07	ns
CD4⁺LAP⁺	prä	12,29	19,68	23,03	17,39	8,08	0,26	34,35	-
	Stress	9,31	12,92	18,88	13,2	7,1	0,34	26,48	***
	post	9,6	14,73	21,68	15,34	8,36	0,69	35,24	ns
<u>Kontrolltag</u>									
CD4⁺CTLA-4⁺	prä	0,16	0,21	0,33	0,24	0,1	0,1	0,43	-
	Stress	0,13	0,21	0,42	0,28	0,18	0,08	0,61	ns
	post	0,15	0,25	0,41	0,27	0,13	0,1	0,45	ns
CD4⁺GITR⁺	prä	0,21	0,31	0,44	0,31	0,13	0,13	0,49	-
	Stress	0,12	0,35	0,44	0,33	0,19	0,09	0,67	ns
	post	0,12	0,24	0,37	0,26	0,14	0,09	0,54	ns
CD4⁺LAP⁺	prä	2,8	10,72	20,8	12,81	10,76	0,64	35,14	-
	Stress	4,97	9,42	15,8	11,74	10,09	0,36	32,71	ns
	post	2,74	11,55	18,37	11,81	9,53	0,22	29,12	ns

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse sowohl für CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen als auch für Effektormoleküle, welche positiv mit deren suppressorischer Funktion korreliert sind, eine Herabregulation im peripheren Blut unter Einfluss der akuten psychischen Stressbelastung. Darüber hinaus konnte der in vorangegangenen Studien beobachtete Anstieg effektororientierter und immunitätsfördernder Elemente reproduziert und bestätigt werden.

6 Diskussion

6.1 *Ergebnisdiskussion: Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen während einer vermuteten Aktivierung der adaptiven Immunität*

Ziel der vorliegenden Studie war eine Analyse der multidirektionalen Auswirkungen T – zellvermittelter Immunität unter Einwirkung eines akuten psychischen Laborstressses. Bisher war der Schwerpunkt bei der Untersuchung psychoimmunologischer Zusammenhänge auf konventionelle, nicht-regulatorische T-Zellen gelegt worden (Segerstrom and Miller 2004). Vorausgegangene Studien hatten gezeigt, dass es unter Einwirkung des auch in der vorliegenden Arbeit applizierten akuten Laborstressses zu einer Mobilisierung zytotoxischer T-Zellen in das periphere Blut kommt, während für weniger antigenerfahrene T-Zellen ein Migrationsverhalten in sekundär lymphatisches Gewebe vermutet wird (Atanackovic, Schnee et al. 2006). Auch andere Autoren hatten einen stressinduzierten Anstieg aktivierter und antigenerfahrener, beispielsweise CCR5-positiver T-Zellen im peripheren Blut beobachten können. Die Liganden von CCR5 sind Chemokine, welche durch aktivierte Endothelzellen sezerniert werden. Akuter Stress scheint also eine Mobilisation jener T-Zellen zu induzieren, welche eng mit aktiviertem und defektem Endothel interagieren. Dadurch könnte akuter Stress die Plaquebildung in Gefäßen fördern und atherosklerotische Vorgänge damit unterstützen (Bosch, Berntson et al. 2003).

Die beobachtete Mobilisierung antigenerfahrener T-Effektorzellen wirft die Frage auf, wie sich immunregulatorische Komponenten und somit immunologische Gegenspieler wie CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen im Rahmen akuter „fight or flight“ - Situationen verhalten.

6.1.1 Psychophysiologische Aktivierung

Psychologische Reagibilität

Um zu prüfen, ob der eingesetzte mentale Belastungstest tatsächlich eine subjektiv empfundene psychische Belastung für die Probanden darstellte, füllten die Teilnehmer im Verlaufe der Untersuchung standardisierte psychologische Fragebögen des State-Ärgerinventars (STAXI) sowie des State-Angstinventars (STAI-G) aus.

Diskussion

Bei Betrachtung des subjektiv empfundenen Ärgers konnte ein stark signifikanter Anstieg unter Stress beobachtet werden, welcher bei Versuchsende wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte. Auch die subjektiv empfundene Angst zeigte einen stressinduzierten Anstieg, das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert von 0,14 jedoch nicht erreicht. Der im Verlauf des Kontrolltages beobachtete Abfall der subjektiv empfundenen Ängstlichkeit könnte durch das repetitive Ausfüllen der Fragebögen unter Ausbleiben eines anderweitigen Stimulus gewertet werden.

In vorausgegangenen Laboruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe war die psychische Aktivierung anhand der subjektiv empfundenen Ärgerlichkeit (STAXI) überprüft worden. Diese hatte, wie auch in der vorliegenden Arbeit, signifikante Anstiege gezeigt (Atanackovic, Schnee et al. 2006). Die psychologische Aktivierung hatte sich hier in einem deutlichen Anstieg der kardiovaskulären Parameter Blutdruck und Herzfrequenz widergespiegelt.

Physiologische Reagibilität

Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte unter Einfluss des psychischen Stressors ein stark signifikanter Anstieg der Herzfrequenz und des systolischen sowie diastolischen Blutdrucks beobachtet werden. In der Literatur hat sich der Herzfrequenzanstieg als geeignetes Kriterium in der Validierung akuter Stresssituationen bewährt und stellt das bevorzugte Instrument zur Quantifizierung akuten psychischen Stresses und einer sympathischen Aktivierung dar (Herbert, Cohen et al. 1994; Larson, Ader et al. 2001; Atanackovic, Brunner-Weinzierl et al. 2002). Owen und Steptoe beobachteten eine positive Korrelation zwischen dem Herzfrequenzanstieg und NK-Zellzahlanstiegen (Owen and Steptoe 2003).

Nach Beendigung des Stressors blieben im vorliegenden Experiment lediglich der systolische und der diastolische Blutdruck auf erhöhtem Niveau.

Am Kontrolltag stellten sich in der Anfangsphase des Experiments wie erwartet keine Anstiege der kardiovaskulären Parameter dar. Der leichte Anstieg des systolischen Blutdruckes gegen Versuchsende könnte Ausdruck einer vegetativen Reaktion, verursacht durch die lange Immobilität, sein.

Es konnte somit gezeigt werden, dass der in unserem Experiment applizierte akute psychische Stress sowohl eine psychische als auch physische Reaktion im Rahmen einer sympathischen Aktivierung der Versuchsteilnehmer hervorrief. Dies wurde statistisch signifikant bestätigt. Das

Diskussion

Ziel eines deutlichen und dennoch kurzfristigen, sowie nach Ende der Belastung reversiblen Stressempfindens konnte erreicht werden.

Gleichzeitig sollte gewährleistet sein, dass eine psychophysiologische Aktivierung nicht durch die mit dem ersten Versuchstag verbundene Aufregung, sondern spezifisch durch die geforderte Aufgabenstellung - der Lösung des mentalen Belastungstests - hervorgerufen wird. Durch eine Randomisierung des Stresstages auf den ersten oder zweiten Untersuchungstag und eine Auswertung von Kontrolldaten, welche keinerlei signifikante Anstiege zeigten, konnte dies sichergestellt werden. Der empfundene Stress bezog sich nicht auf den ersten, „unbekannten“ Versuchstag sondern äußerte sich als deutliche, mit der Lösung des Tests verbundene, mentale Belastung.

Zusammenfassend konnte belegt werden, dass der verwendete Stressor eine deutliche mentale Belastung für die Versuchsteilnehmer darstellte. Die psychische Aktivierung äußerte sich in einer verstärkten kardiovaskulären Erregung. Dies deutet auf eine bereits in Vorstudien beobachtete Freisetzung von „Stresshormonen“, insbesondere Katecholaminen, unter Einfluss der mentalen Belastung, hin (Atanackovic, Brunner-Weinzierl et al. 2002). Die kardiovaskuläre Reagibilität ist eng mit der Aktivierung des sympathischen Nervensystems verknüpft (Schachinger, Weinbacher et al. 2001). Eine sympathisch vermittelte und stressinduzierte Immunalteration hatte Schedlowski et al. in einem Anstieg von NK-Zellen nach einer Adrenalininfusion nachweisen können (Schedlowski, Hosch et al. 1996).

6.1.2 Immunologische Parameter

Ob die beobachtete psychophysiologische Belastung und sympathische Aktivierung der Probanden von Veränderungen in der Verteilung verschiedener Anteile des peripheren T – zellvermittelten Immunsystems begleitet sein würde, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei stand eine Analyse regulatorischer CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen (Tregs), eine für periphere Toleranz und Immunhomöostase zentrale Zellpopulation, im Mittelpunkt.

6.1.2.1 Auswirkungen des Stressexperimentes auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie auf T-Zell-Subpopulationen

Zur späteren Einordnung der Ergebnisse der Veränderungen von Tregs fand zunächst eine Basisanalyse konventioneller, nicht-regulatorischer T-Zellen sowie deren Subpopulationen im peripheren Blut statt. CD4⁺-positive sowie CD8⁺-positive T-Zellen lassen sich anhand der Expression des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7 sowie von CD45RA in vier verschiedene T-Zell-Subpopulationen einteilen (Sallusto, Lenig et al. 1999; Wills, Carmichael et al. 1999; Sallusto, Geginat et al. 2004).

In vorangegangenen Studien hatte gezeigt werden können, dass es unter akutem psychischem Stress zu einer kurzfristigen Umverteilung dieser im peripheren Blut zirkulierenden T-Zellsubpopulationen kommt (Atanackovic, Schnee et al. 2006):

CD4⁺ und CD8⁺ naive (CD45RA⁺CCR7⁺) T-Zellen sowie zentrale Gedächtniszellen (CD45RA⁻CCR7⁺) T-Zellen zeigten nach Einwirken des Stressors einen Abfall im peripheren Blut. Diese Zellen sind durch eine Zirkulation zwischen Blutbahn und lymphatischem Gewebe auf der Suche nach ihrem Antigen gekennzeichnet, besitzen jedoch keine signifikante Effektorfunktion und zeigen keine Gewebemigration (Jenkins, Khoruts et al. 2001; Wolint, Betts et al. 2004). Charakteristisch ist eine Expression des Lymphknoten – Homing - Rezeptors CCR7 auf ihrer Oberfläche, welcher den Eintritt in sekundär lymphatische Organe, den geeigneten Ort einer Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen, erleichtert.

Gleichzeitig konnte eine Mobilisierung von T-Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻CCR7⁻) sowie terminal differenzierter T-Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁺CCR7⁻) in das periphere Blut beobachtet werden. Diese Zellen verfügen über ein hohes zytolytisches Potential und können rasch in entzündetes Gewebe migrieren, wo sie ihre Effektorfunktion ausüben (Roman, Miller et al. 2002). CD8⁺ T-Zellen, welche effektiv virale Antigene bekämpfen, sind meist CCR7-negativ (Chen, Shankar et al. 2001; Hengel, Thaker et al. 2003).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte unter Einfluss des akuten Stresses ein statistisch signifikanter und prolongierter Abfall des prozentualen Anteils peripherer CD4⁺ und CD8⁺ naiver (CD45RA⁺CCR7⁺) T-Zellen und zentraler T-Gedächtniszellen (CD45RA⁻CCR7⁺) beobachtet werden. Dieser Effekt hielt im Falle der naiven T-Zellen und CD8⁺ zentralen T-Gedächtniszellen über den Stressor hinaus an und war auch gegen Ende des Experiments noch nachweisbar.

Diskussion

Ausdifferenzierte, antigenerfahrene T-Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻CCR7⁻) und terminal differenzierte T-Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁺CCR7⁻) hingegen stiegen entweder an oder blieben auf stabilem Niveau. Ein Anstieg war am deutlichsten bei CD8⁺ terminal differenzierten (CCR7⁻ CD45RA⁺) zytotoxischen T-Effektor-Gedächtniszellen zu beobachten. Diese Subpopulation ist durch die Produktion großer Mengen an Zytokinen und der Fähigkeit zu besonders rascher Migration und Effektorreaktion gekennzeichnet (Lanzavecchia and Sallusto 2000).

Damit können die in vorausgegangenen Studien gewonnenen Beobachtungen bestätigt werden (Atanackovic, Schnee et al. 2006). Die Ergebnisse stützen die These, wonach akuter Stress eine Mobilisierung antigenerfahrener und insbesondere zytotoxischer T-Zellen in die Peripherie bewirkt. Naive und zentrale T-Gedächtniszellen hingegen fallen im peripheren Blut ab. Möglicherweise unterliegen diese Zellen einer Migration in sekundär lymphatisches Gewebe, wo sie optimale Bedingungen für eine Antigenpräsentation durch dendritische Zellen vorfinden. Dadurch würden sie ebenfalls zu einer optimalen „Rekrutierung“ immunologischer Ressourcen beitragen.

Die Mobilisierung peripherer antigenerfahrener T-Effektorzellen mit zytotoxischen Eigenschaften ist während akuter „fight or flight“-Reaktionen äußerst sinnvoll für die rasche Initiierung einer effektiven Immunabwehr. Von der peripheren Blutbahn können T-Zellen so schnell an potentielle Eintrittspforten von Pathogenen, wie beispielsweise verletztem und entzündetem Gewebe, gelangen und dort ihre Effektorfunktion ausüben. Diese multidirektionalen Wirkungen unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen haben gemeinsam, dass jeder Zelltyp jeweils in Richtung jenes Kompartiments zu migrieren scheint, in welchem eine bestmögliche und rasche Funktion gewährleistet wird.

Interessante Ergebnisse liefern murine Studienmodelle, welche Zellbewegungen vom peripheren Blut in die Haut untersuchten. Dhabar et al. konnten zeigen, dass akuter Stress zu einem Anstieg von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in der Haut führt (Dhabhar 2002). Akuter Stress vor einem chirurgischen Eingriff führte bei Mäusen zu einem lokalen Anstieg von neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen im Operationsgebiet (Viswanathan and Dhabhar 2005). Darüber hinaus konnte akuter Stress nach einer primären Immunisierung die Immunreaktion bei einem zweiten Antigenkontakt verstärken (Viswanathan, Daugherty et al. 2005).

Diskussion

Diese Ergebnisse an Mäusen und die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Resultate liefern Hinweise, dass auch Anteile der erworbenen Immunität unter akutem Stress aktiviert werden und in jenen Kompartimenten aktiv werden, in welchen möglicherweise ein Kontakt mit äußeren Pathogenen bevorsteht. In dieser Situation bestünde ein besonders großer Bedarf an Effektorzellen und einer effizienten und schnell einsetzenden Immunantwort. Das Modell einer Verstärkung von angeborener *und* erworbener Immunität durch akuten Stress wird somit unterstützt.

6.1.2.2 Auswirkungen des Stressexperimentes auf periphere CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen: zu Hypothese 1

Bisher wurden bei der Betrachtung adaptiver T-Zell- Immunantworten im Rahmen eines akuten psychischen Stresses konventionelle T-Zellen analysiert. Diese initiieren und fördern, abhängig von ihrem Reifezustand, Immunantworten durch die Suche nach ihrem passenden Antigen und anschließende klonale Expansion, Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen, Chemokinproduktion sowie durch die Stimulation von B-Zellen. Konventionelle, nicht-regulatorische T-Zellen scheinen, so konnte dies auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden, einer stressinduzierten Umverteilung zugunsten zytotoxischer T-Effektorzellen im peripheren Blut zu unterliegen.

Zu jeder gesunden Immunantwort gehören neben stimulierenden jedoch auch regulatorische, suppressive Komponenten, welche überschießende Immunreaktionen verhindern und die Immunantwort terminieren. Im peripheren Blut finden sich zu diesem Zweck natürliche regulatorische CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen (Tregs), welche den Transkriptionsfaktor FOXP3 als spezifischen Marker exprimieren. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Auswirkungen eines akuten psychischen Laborstresses auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen von gesunden männlichen Probanden unter Formulierung der folgenden Hypothese:

Hypothese 1: Unter akuter mentaler Stresseinwirkung kommt es zu einer Abnahme des Anteils CD4⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen am Gesamtlymphozytenpool und zu einer Umverteilung zugunsten zytotoxischer T-Effektorzellen im peripheren Blut gesunder, männlicher Probanden.

Diskussion

Die Hypothese kann anhand der Untersuchungsergebnisse bestätigt werden. Wenige Minuten nach Einwirken des Stressors zeigte sich ein signifikanter Abfall des Anteils peripherer CD4⁺FOXP3⁺ Tregs an den Gesamtlymphozyten. Gegen Versuchsende blieb dieser unter dem Ausgangsniveau, der Abfall im Vergleich zur Baseline erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Gleichzeitig konnte ein höchst signifikanter Anstieg des Quotienten aus CD8⁺CCR7⁻ T-Effektorzellen und CD4⁺FOXP3⁺ Tregs beobachtet werden.

Diese Beobachtung stützt das Modell einer Verstärkung von zytotoxischen, effektororientierten und immunitätsfördernden Elementen unter Einfluss akuten Stresses, welche auch in murinen Studienmodellen nachgewiesen werden konnte (Viswanathan and Dhabhar 2005). Durch eine Herabregulation immunregulatorischer Komponenten wie Tregs im peripheren Blut scheint diese Immunaktivierung unterstützt zu werden. Durch eine Hemmung des suppressiven Arms des Immunsystems können T-Effektorzellen freier agieren und den Organismus so besser vor drohenden Infektionen durch Verletzungen schützen.

In einer akuten Gefahrensituation und folgender „fight or flight“-Aktivierung würde der Körper von dieser „Zügelung“ des immunsuppressiven Arms der erworbenen Immunität und der gleichzeitig beobachteten Mobilisierung von zytotoxischen T-Effektorzellen profitieren.

Wiederholte Exposition des Organismus mit einer stressinduzierten Aktivierung zytotoxischer T-Zellantworten und zeitgleich resultierender Herabregulation von Tregs könnte jedoch eine Progression entzündlicher Vorgänge, beispielsweise im Rahmen der Entstehung arteriosklerotischer, kardiovaskulärer Erkrankungen, zur Folge haben. Durch eine mangelnde Kontrollfunktion von Tregs und aggressive T-Effektorzell-Immunantworten könnte eine wiederholte Konfrontation mit akutem Stress zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen (Viswanathan, Daugherty et al. 2005; Brusko, Putnam et al. 2008).

Diese Erkenntnisse liefern somit einen Beitrag zur biologischen Erklärung des Einflusses von Stress auf die Pathogenese und den Verlauf dieser Erkrankungen (Sandberg, Paton et al. 2000; Bosch, Berntson et al. 2003; Mohr, Hart et al. 2004; Straub, Dhabhar et al. 2005).

Tregs sind bisher nicht im Kontext akuten psychischen Stresses untersucht worden. Es finden sich jedoch Untersuchungen von Tregs im Rahmen chronischer Stresssituationen. Höglund et al. analysierten das Verhalten von CD4⁺CD45RO⁺CD25^{bright} Tregs im Rahmen einer Prüfungsperiode von 41 gesunden sowie atopischen Medizinstudenten (Höglund, Axen et al. 2006). Es zeigten sich stressinduzierte Anstiege des peripheren prozentualen Anteils von Tregs

Diskussion

in beiden Probandengruppen. Ein Beleg der Stresswirkung auf Immunfunktionen stellt die Tatsache dar, dass der beobachtete Anstieg von Tregs deutlicher war bei Teilnehmern mit ausgeprägtem und als hoch eingeschätztem Stresserleben. Die Wirkung chronischen Stresses auf das Immunsystem, wie beispielsweise in Prüfungsphasen, ist wiederholt als immunsupprimierend bestätigt worden. Dabei werden sowohl angeborene als auch erworbene Immunität gleichsam geschwächt (Dhabhar and McEwen 1997; Segerstrom and Miller 2004; Ader 2007). Da es sich bei Höglund um eine über Wochen andauernde chronische Stressbelastung handelte, steht der beobachtete Anstieg von Tregs nicht im Widerspruch zu unseren Daten. Chronischer Stress könnte daher mit einer Verstärkung regulatorischer Komponenten einhergehen und damit Immunfunktionen schwächen. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen ein akuter Stressor über einen Zeitraum von wenigen Minuten appliziert. Dieser scheint, im Rahmen einer Aktivierung von Anteilen effektororientierter Immunität, eine begleitende Herabregulation von Tregs zur Folge zu haben. Es wäre auch möglich, dass unterschiedliche Ergebnisse in der Tatsache begründet sind, dass der von Höglund et al. zur Charakterisierung von Tregs gewählte Marker CD25 keinen ausreichend Treg-spezifischen Marker darstellt. CD25 wird auch auf aktivierten T-Effektorzellen exprimiert. Insofern müssten zur weiteren Klärung des gegensätzlichen Verhaltens von Tregs unter akuten und chronischen Stresseinwirkungen Untersuchungen mit einheitlichen Treg-Markern, beispielsweise in einer Untersuchung von $CD4^+FOXP3^+$ Tregs unter chronischem Stress, erfolgen.

Seit der Charakterisierung $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen 1995 durch Sakaguchi et al konnten große Fortschritte im Verständnis der Entwicklung von Tregs sowie von Mechanismen ihrer Suppression erzielt werden (von Boehmer 2005; Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Dabei richtet sich erst seit kurzem verstärkt der Fokus auf die Frage, in welches Kompartiment Tregs wandern und wo sie ihre Suppressorfunktion *in vivo* ausüben.

Bei Tregs scheint es sich keineswegs um eine homogene Zellgruppe zu handeln, sondern, analog der Einteilung konventioneller T-Zellen (Sallusto, Lenig et al. 1999), können Tregs in vier verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Je nach Expression verschiedener Chemokinrezeptoren und Oberflächenmoleküle wie des Lymphknoten – Homing - Rezeptors CCR7 oder CD45RA können auch Tregs in naive, zentrale T-Gedächtniszellen sowie effektororientierte Tregs eingeteilt werden (Huehn and Hamann 2005; Valmori, Merlo et al. 2005; Tosello, Odunsi et al. 2008). In lymphatischem Gewebe wurden vermehrt $CCR7^+$ Tregs

Diskussion

gefunden. Diese scheinen die klonale Expansion und Differenzierung naiver konventioneller T-Zellen in T-Effektorzellen zu inhibieren. Im peripheren Blut hingegen üben effektorzellähnliche Tregs (CCR7⁻) eine periphere Kontrolle auf konventionelle, nicht-regulatorische T-Effektorzellen aus (Huehn and Hamann 2005).

Es ist anzunehmen, dass es sich bei der von uns beobachteten Treg-Herabregulation ebenfalls um eine Umverteilung und Migration in verschiedene Kompartimente handelt. In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kompartiment, dem peripheren Blut, konnte ein Abfall von Tregs gezeigt werden.

Einerseits wäre eine Migration in lymphatisches Gewebe vorstellbar. Dort können Tregs ihre suppressive Funktion durch Hemmung der T-Zell-Differenzierung ausüben. Damit wäre eine indirekte *Verstärkung* von partiellen Treg-Funktionen nicht auszuschließen. In lymphatischem Gewebe wurden überwiegend CCR7-positive Tregs gefunden (Huehn and Hamann 2005).

Eine Betrachtung der Treg-Subpopulationen zeigt jedoch, dass es sich bei unseren CD4⁺FOXP3⁺ Tregs hauptsächlich um CCR7-negative Tregs handelte (Abbildung 13b), die damit einen eher effektorähnlichen Phänotyp präsentieren. Diese Tregs finden sich überwiegend in der Peripherie. Diese Daten stimmen mit denen von Beyer und Schultze überein, bei welchen es sich bei den untersuchten Tregs ebenfalls überwiegend um CCR7-negative, effektorähnliche Tregs handelte (Beyer and Schultze 2007). Diese Treg-Subpopulation übt ihre regulatorische Funktion typischerweise in der Peripherie und in der Suppression von konventionellen Effektorzellen aus.

Eine verstärkte Migration von Tregs in periphere Gewebe, wie die Haut, hätte eine gleichgerichtete Bewegung mit konventionellen T-Effektorzellen vermuten lassen, in diesem Falle also einen tendenziellen *Anstieg* im peripheren Blut.

Die genaue Beantwortung der Frage, ob Tregs unter akutem Stress in lymphatische Gewebe migrieren, oder aber ausdifferenzierten T-Effektorzellen über die Blutbahn an periphere „Orte des Geschehens“ und mögliche Infektionsschauplätze folgen, erfordert jedoch Biopsien dieser Gewebe.

Die Frage, welchen Phänotyp Tregs überwiegend präsentieren, ist nicht abschließend geklärt. Unterschiedliche Verteilungen in Treg-Subpopulationen sind bisher beschrieben worden (Cesana, DeRaffele et al. 2006; Tosello, Odunsi et al. 2008).

Diskussion

Ob regulatorische T-Zellen überwiegend naiv oder effektorphänotypisch sind, ist in erster Linie, wie im Falle konventioneller T-Zellen, davon abhängig, in welchem Kompartiment untersucht wird und wahrscheinlich auch davon, ob es sich um gesunde oder kranke Probanden handelt. So sind beispielsweise Tregs von Tumorpatientinnen mit Ovarialkarzinom größtenteils effektordifferenziert und CCR7-negativ (Curiel 2007). Cesana et al. stellten fest, dass die Anzahl peripherer CD4⁺CD25⁺ Tregs bei Patienten mit metastasiertem Melanom oder Nierenzellkarzinom signifikant erhöht ist. Diese CD4⁺CD25⁺ T-Zellen waren in der Patienten- und Kontrollgruppe zu über 90 % CCR7-positiv. Damit handelte es sich bei Cesana et al. fast vollständig um naive Tregs (CD45RA⁺CCR7⁺) oder um zentrale Gedächtniszell - Tregs (CD45RA⁻CCR7⁺). Die Übereinstimmung der Daten in gesunden Kontrollen ließ den Schluss einer ähnlichen Aufteilung bei Krebspatienten und Gesunden zu (Cesana, DeRaffele et al. 2006). Beyer und Schultze hingegen beschrieben nur ein Drittel aller Tregs als naive (CD4⁺CD25⁺) Tregs (Beyer and Schultze 2007).

Unsere Ergebnisse einer überwiegenden Anzahl CCR7-negativer Tregs stimmen auch hinsichtlich der Aufteilung der konventionellen CD4⁺ Subpopulationen mit Sallusto et al. und Beyer et al. überein (Sallusto, Geginat et al. 2004; Beyer and Schultze 2007): Konventionelle CD4⁺ naive und zentrale T-Gedächtniszellen machten je circa 20-40% des Gesamtlymphozytenpools aus. Diese Analyse konventioneller T-Zell-Subpopulationen fehlte bei Cesana et al., worin unterschiedliche Ergebnisse begründet sein könnten. Die bisher vorliegenden Ergebnisse lassen noch keine abschließenden Aussagen über die Verteilung von Treg-Subpopulationen zu.

Effektordifferenzierte CCR7⁻ Tregs machten in der vorliegenden Studie über 60 % aller Tregs aus. Unter der Stresseinwirkung kam es zu einem Abfall aller CD4⁺ T-Zellen. Bei Betrachtung der Subpopulationen sowohl der konventionellen T-Zellen als auch der Tregs fiel jedoch auf, dass im konventionellen T-Zellpool CCR7-negative T-Zellen auf stabilem Niveau blieben oder sogar anstiegen. Tregs, welche zu über 60 Prozent ebenfalls CCR7-negativ waren, fielen dennoch ab im peripheren Blut. Aus diesem Grund wird trotz des beobachteten Abfalls der CD4⁺ T-Zellen eine spezifische Herabregulation von Tregs vermutet.

Zusammenfassend kann Hypothese 1 bestätigt werden. Unter Einwirkung des Stressors konnte eine Herabregulation regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut beobachtet werden. Dabei verschob sich das Verhältnis zwischen zytotoxischen CCR7⁻ T-Zellen und Tregs zugunsten

Diskussion

effektororientierter zytotoxischer T-Zellen. Die Herabregulation von Tregs unterstützt das Modell einer Verstärkung erworbener Immunfunktionen in akuten Stresssituationen.

Zusätzliche Hinweise auf Veränderungen in der Treg-Aktivität geben Untersuchungen von Effektormolekülen, welche eng mit der Funktion von Tregs in Verbindung stehen.

6.1.2.3 Auswirkungen des Stressexperimentes auf Treg-assoziierte Effektormoleküle: zu Hypothese 2

Falls Tregs eine zentrale Rolle in der Interaktion und Wirkung von Stress auf die Entwicklung von Autoimmunpathologien und weiteren Erkrankungen spielen, stellt sich die Frage, welche molekularen Mechanismen daran beteiligt sind. Tregs üben ihre suppressorische Wirkung mit Hilfe verschiedener Effektormoleküle aus, deren stressassoziiertes Verhalten hier analysiert wurde.

Hypothese 2: Im Rahmen der vermuteten stressinduzierten Abnahme des Anteils $CD4^+FOXP3^+$ regulatorischer T-Zellen wird eine gleichgerichtete Änderung der Expression der Treg-assoziierten Effektormoleküle CTLA-4, GITR und LAP auf $CD4^+$ T-Zellen des peripheren Blutes beobachtet.

Das „*Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein-4*“ (CTLA-4), auch als CD152 bezeichnet, ist ein auf Tregs sowie auf aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen exprimiertes Glykoprotein der CD28-Rezeptorfamilie und wirkt inhibierend auf die T-Zellfunktion und –proliferation (Sansom and Walker 2006). Man geht davon aus, dass die durch eine CTLA-4-Bindung an CD80/CD86 hervorgerufenen Signale negativ auf die T-Zell-Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen wirken und zentraler Bestandteil der Terminierung der T-Zell-Antwort sind. CTLA-4 - defiziente Mäuse entwickeln letale lymphoproliferative Erkrankungen (Tivol, Borriello et al. 1995; Waterhouse, Penninger et al. 1995). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich unter der Stresseinwirkung ein Abfall von $CD4^+CTLA-4^+$ T-Zellen, zeitgleich mit dem Rückgang $CD4^+FOXP3^+$ Tregs im peripheren Blut. Gegen Ende des Experiments lag ein leichter Anstieg $CD4^+CTLA-4^+$ T Zellen vor. Es ist bekannt, dass CTLA-4 nicht nur auf Tregs, sondern auch auf aktivierten konventionellen T-Zellen exprimiert wird, was den Anstieg $CD4^+CTLA-4^+$ T-Zellen gegen Ende des Experiments erklären könnte.

Diskussion

Der Oberflächenrezeptor GITR („*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene*“), welcher auf Tregs exprimiert wird, wirkt einerseits als Kostimulator verstärkend auf die immunsuppressive Wirkung von Tregs. Andererseits fördert GITR ein Andauern und Überleben von T-Effektorzellen (Shimizu, Yamazaki et al. 2002). Die Annahme, dass GITR nur auf Tregs exprimiert wird, konnte widerlegt werden. Es ist bekannt, dass auch konventionelle aktivierte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen GITR exprimieren (McHugh, Whitters et al. 2002). Die Tatsache, dass bei der GITR Expression keine stressinduzierten Veränderungen zu beobachten waren, könnte in dieser bidirektionalen Funktion begründet liegen.

Auch das „*Latency Associated Peptide*“ (LAP) konnte als mit der Funktion von Tregs assoziiertes Effektormolekül identifiziert werden (Nakamura, Kitani et al. 2004). Durch eine Komplexbildung mit TGF- β 1 vermittelt es immunsuppressive Funktionen von Tregs. TGF- β ist ein auch unabhängig von Tregs pleiotrop immunsuppressiv wirkendes Molekül (Letterio and Roberts 1998). Bommireddy et al. zeigten, dass TGF- β 1 Mangel mit einem Verlust der immunsuppressiven Aktivität und reduzierten Zellzahlen von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs einhergeht (Bommireddy, Babcock et al. 2008). Ali et al. beobachteten, dass LAP auch TGF- β 1-unabhängige *in vivo* und *in vitro* chemotaktische Immuneffekte besitzt (Ali, Gaughan et al. 2008). Der in dem vorliegenden Stressexperiment beobachtete signifikante Abfall von $CD4^+LAP^+$ T-Zellen verlief zeitlich konform mit dem beobachteten $CD4^+FOXP3^+$ Treg-Abfall und unterstützt die These einer Herabregulation immunsuppressiver Elemente unter akutem Stress.

Zusammenfassend kann die Hypothese 2 für CTLA-4 und LAP bestätigt werden. Diese Effektormoleküle zeigten auf $CD4^+$ T-Zellen einen stressinduzierten Abfall im Vergleich zu den Gesamtlymphozyten. $CD4^+GITR^+$ T-Zellen zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen. Dies könnte in der gleichzeitig immunstimulatorischen als auch immunsuppressiven Wirkung von GITR begründet liegen.

6.2 *Klinische Bedeutung regulatorischer T-Zellen in Autoimmunität und Tumorimmunologie*

Regulatorische T-Zellen agieren in einem sensiblen Gleichgewicht zwischen Autoimmunität und Antitumorimmunität (Shimizu, Yamazaki et al. 1999). Durch die Begrenzung von Immunantworten schützen sie einerseits vor der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, andererseits können eine effektive Immunantwort und die Elimination von Tumorzellen ebenfalls inhibiert werden (Beyer and Schultze 2006; Zou 2006; Wang and Wang 2007).

Im Bereich der Tumorimmunologie werden Tregs seit einigen Jahren intensiv erforscht. Patienten mit soliden Tumoren weisen erhöhte Treg-Zahlen im peripheren Blut auf. Im Tumorgewebe selbst wurden in zahlreichen Neoplasien erhöhte Treg-Zahlen nachgewiesen (Liyanaage, Moore et al. 2002; Ichihara, Kono et al. 2003; Wolf, Wolf et al. 2003; Zou 2006; Curiel 2007). Diese Erhöhung war beim Ovarialkarzinom auch mit einer reduzierten Überlebensrate assoziiert (Curiel, Coukos et al. 2004). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Tregs durch Suppression von T-Effektorzellen eine effiziente Antitumorimmunität behindern. Shimizu et al. konnten bei Mäusen durch eine Depletion von Tregs mit Antikörpern gegen CD25 eine Reduktion der Tumormasse erreichen (Shimizu, Yamazaki et al. 1999). Die Depletion regulatorischer T-Zellen mit Hilfe von Antikörpern gegen CTLA-4 und GITR konnte ebenfalls in einigen Fällen eine Tumorabstoßung begünstigen (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001; Zou 2006). In einem Modell zur Melanombehandlung konnte die CD25⁺Treg - Depletion durch eine CTLA-4 - Blockade unterstützt werden (Sutmuller, van Duivenvoorde et al. 2001). Allerdings konnten bei der Anwendung von Therapiekonzepten mit Antikörpern gegen CTLA-4 autoimmuntypische Nebenwirkungen beobachtet werden (Hodi, Mihm et al. 2003). Auch niedrige Dosen des Zytostatikums Cyclophosphamid führten in der Vergangenheit sowohl in Tumormodellen als auch bei Tumorpatienten zu einer verbesserten Immunantwort, was als mögliches Ergebnis einer Treg-Depletion diskutiert wird (Lutsiak, Semnani et al. 2005). Die Einbindung von Tregs in die Tumor - Immunhomöostase machen sie, neben der Weiterentwicklung bereits bestehender Tumorimmuntherapien, zu einem vielversprechenden Ansatz auf dem Weg der Entwicklung moderner Therapiekonzepte (Keilholz, Martus et al. 2006).

Die ersten Beobachtungen der schweren Autoimmunphänomene bei Defekten in der Treg-Funktion sowohl im Mausmodell („scurfy mice“) als auch beim Menschen – in der Entwicklung

Diskussion

des an anderer Stelle beschriebenen IPEX-Syndroms - ließen bereits früh eine Einbindung von Tregs in die Entstehung von Autoimmunerkrankungen vermuten (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995; Bennett, Christie et al. 2001; Brunkow, Jeffery et al. 2001; Sakaguchi 2004). Multiple Sklerose (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004), rheumatoide Arthritis (Ehrenstein, Evans et al. 2004) und Typ1 - Diabetes (Lindley, Dayan et al. 2005) sind nur einige Beispiele einer langen Liste an Autoimmunerkrankungen, bei welchen ein gestörtes Gleichgewicht zwischen effektororientierter Immunität und deren Kontrolle durch Tregs vermutet wird. Diesem Ansatz nach wird das Entstehen von Autoimmunerkrankungen begünstigt, wenn einer übermäßigen Anzahl an gegen Selbstantigene gerichteten T-Effektorzellen eine zu geringe Zahl oder in ihrer Funktion defekte Tregs gegenüberstehen (Torgerson 2006). Die Defekte in der immunregulatorischen Funktion scheinen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Tregs und Effektorzellen zugunsten von effektororientierter Immunität zu führen (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Entgegen anfänglicher Vermutungen konnten die meisten Autoren jedoch keine reduzierten Treg-Zellzahlen feststellen. Am Beispiel der Multiplen Sklerose konnte erstmals gezeigt werden, dass der Defekt vielmehr in einer unzureichenden Funktion der Tregs zu liegen scheint (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004). Bisherige Ergebnisse sind je nach Krankheitsbild unterschiedlich, was zum Teil an einer anfänglich unzureichenden Isolierungsmöglichkeit von Tregs in Ermangelung spezifischer Marker gelegen haben könnte (Brusko, Putnam et al. 2008). Autoimmunerkrankungen werden insgesamt als multifaktoriell angesehen, neben genetischen Ursachen werden auch Umwelteinflüsse als mögliche Promoter diskutiert. Tregs stellen dennoch einen Angelpunkt zukünftiger Therapieoptionen dar. In einigen Therapieansätzen werden T-Effektorzellen über monoklonale Antikörper spezifisch blockiert. Tregs scheinen davon ausgenommen zu sein, was zu einer Wiederherstellung der Effektorzell/Treg – Immunhomöostase führt. Momentan noch in der präklinischen Phase sind Immuntherapiekonzepte der *in vitro* Expansion von Tregs zum Zwecke der Reinfusion (Brusko, Putnam et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Tregs sowohl im Bereich von Autoimmunerkrankungen als auch in der Tumorimmunologie über ein vielversprechendes therapeutisches Potential verfügen. Eine optimale Nutzung dieses Potentials durch weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Funktionmechanismen von Tregs ist eine der Aufgaben heutiger immunologischer Forschung.

Akuter Stress könnte gerade in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen als Promoter fungieren. Eine wiederholte Exposition mit akuten Stressoren mit einer Treg-Herabregulation

Diskussion

könnte eine unzureichende Treg-Funktion zusätzlich verstärken und somit an der Entstehung oder Exazerbation von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein. In einem alternativen Szenario könnte eine permanente Herabregulation von Tregs die Immunantwort nicht nur gegen Fremdantigene bei drohenden Infektionen, sondern auch gegen Tumorantigene verstärken und so zu einer tendenziellen Optimierung der Antitumorimmunität beitragen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Treg-Umverteilungen dürften für einen Einfluss auf die tumorassoziierte Immunität jedoch zu kurzfristig sein.

6.3 Diskussion zur Versuchsdurchführung

Der in der vorliegenden Arbeit angewandte mentale Belastungstest stellt ein im Rahmen von psychophysiologischen Laboruntersuchungen validiertes Verfahren der akuten mentalen Stressexposition dar. Wegen der Vielzahl möglicher Stressoren in Alltagssituationen ist es letztlich jedoch schwierig, aus Laborergebnissen allgemeine Rückschlüsse auf die Wirkung akuten Stresses auf das Immunsystem im täglichen Erleben zu ziehen. Häufig handelt es sich bei Stressoren um eine Kombination aus körperlichem und psychischem Stress oder akutem und chronischem Stress. Hinzu kommt eine durch Lernmechanismen hervorgerufene unterschiedliche Stressbewältigung jedes einzelnen Individuums.

Da die psychoimmunologische Stressforschung jedoch zum Teil gegensätzliche Wirkungen von verschiedenen Stressentitäten, besonders deutlich in einer unterschiedlichen Wirkung von akutem und chronischem Stress, bestätigen konnte, ist eine möglichst spezifische Analyse einzelner Stressarten dennoch erforderlich und anzustreben. Insbesondere akute Stressbelastungen lassen sich hierbei gut durch künstliche Laborbedingungen imitieren. Vorteile dieses Ansatzes wie Reproduzierbarkeit, wiederholte Exposition mit den gleichen Stimuli und eine Standardisierbarkeit von Untersuchungsprotokollen liegen auf der Hand.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Probanden im Rahmen eines Crossover-Designs an zwei Tagen untersucht, welche im Versuchsaufbau identisch waren. Der Stresstest wurde an einem der beiden Versuchstage durchgeführt. Im Rahmen dieses Crossover-Designs stellte der Proband seine eigene Kontrolle dar. Der Stresstest wurde per Zufallsprinzip auf den ersten oder zweiten Untersuchungstag randomisiert. Auf diese Weise sollte vermieden werden, dass eine etwaige Aufgeregtheit während der relativ neuen Situation des ersten Versuchstages einen direkten

Diskussion

Einfluss auf die Ergebnisse des Stresstestes ausüben kann. Das Vorhandensein einer Kontrollgruppe erlaubte einen Vergleich der Daten mit und ohne Stresseinwirkung.

Die Darstellung der Ergebnisse als prozentualer Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl ist im Rahmen der psychoneuroimmunologischen Stressforschung ein übliches und vielfach angewendetes Verfahren. Die Ermittlung absoluter Zellzahlen könnte darüber hinaus weitere Erkenntnisse liefern, insbesondere im Zusammenhang mit gleichzeitiger Quantifizierung der Subpopulationen in verschiedenen Kompartimenten.

Akute Stressoren wirken in einem Zeitrahmen von Minuten bis Stunden. Die letzte Blutentnahme in dem vorliegenden Experiment fand eine halbe Stunde nach Ende des mentalen Belastungstests statt. Stressantworten, welche durch frühzeitige adrenerge Aktivierung ausgelöst werden, können in diesem Zeitfenster dargestellt werden. Das Einsetzen gerade von durch die HPA-Achse und Cortisolausschüttung vermittelten Stressantworten reagiert zeitlich verzögert. Interessant für nachfolgende Studien, beide Stressachsen betreffend, wäre daher eine längerfristige Beurteilung regulatorischer T-Zellen im Verlauf der dem Belastungstest folgenden Stunden.

Für definitive Aussagen über den Verbleib regulatorischer T-Zellen wären murine Studienmodelle mit Biopsien beispielsweise lymphatischen Gewebes sowie der Haut erforderlich. Nur so ist ein direkter Vergleich der verschiedenen Kompartimente und eine gesicherte Einordnung von Umverteilungsvorgängen über die periphere Blutbahn möglich.

Viele Mechanismen regulatorischer T-Zellen sind noch nicht vollständig geklärt. Auch die Diskussion um einen validen Marker von Tregs ist noch nicht abgeschlossen. So könnte neben der Erfassung des gut belegten Treg-Markers FOXP3 die Integration des Interleukin-7-Rezeptors (CD127) für nachfolgende Studien eine sinnvolle Ergänzung zur Treg-Isolierung darstellen. Immer neue Zusammenhänge der Involvierung regulatorischer T-Zellen in unterschiedliche Krankheitsbilder werden entdeckt. Gerade das Wissen über regulatorische T-Zellen im psychoneuroimmunologischen Netzwerk sowie die Rolle, welche Stress in immunregulatorischen Zusammenhängen einnimmt, scheinen noch lückenhaft. Daher sind in Zukunft weitere Studien zum Zwecke der Erweiterung der hier vorgestellten Ergebnisse erforderlich.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersucht die Auswirkungen einer akuten psychischen Stressbelastung auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen im peripheren Blut gesunder männlicher Probanden.

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind eine vor wenigen Jahren charakterisierte Zellpopulation und stellen ein zentrales Element in der Kontrolle von Immunreaktionen und Aufrechterhaltung peripherer Toleranz dar. Sie sind in der Lage, verschiedene Immunzellen zu regulieren. Daher sind sie ein wichtiger Bestandteil der Verhinderung von Autoimmunität, auch eine Beteiligung an der Pathogenese von malignen Erkrankungen und Infektionen wird vermutet. Bisherige Erkenntnisse machen sie zu einem interessanten Ansatzpunkt in der Entwicklung von Immuntherapien.

Psychischer Stress beeinflusst Immunfunktionen. Neben einer immunsuppressiven Wirkung chronischen Stresses ist eine immunitätsfördernde Wirkung akuten Stresses auf die angeborene Immunität bekannt. Antigenerfahrene T-Zellen als Element der erworbenen Immunität scheinen ebenfalls eine stressbedingte Mobilisierung in das periphere Blut zu erfahren. Neuere Forschungsergebnisse stützen damit das Modell einer Aktivierung sowohl angeborener als auch erworbener Immunität unter akutem Stress. Periphere regulatorische CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen blieben in der Analyse akuter Stresswirkungen bisher unberücksichtigt.

In der hier präsentierten Arbeit wurden daher die Auswirkungen eines akuten psychischen Laborstresses auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen im peripheren Blut untersucht. 31 gesunde männliche Probanden absolvierten einen standardisierten mentalen Belastungstest. Zu drei Zeitpunkten erfolgten peripher-venöse Blutentnahmen. Periphere CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen, die mit der Funktion von Tregs assoziierten Effektormoleküle CTLA-4, GITR und LAP auf CD4⁺ T-Zellen sowie konventionelle, nicht-regulatorische T-Zell-Subpopulationen (CCR7/CD45RA) wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die psychophysiologische Aktivierung wurde anhand standardisierter psychologischer Fragebögen und einem Anstieg der physiologischen Parameter Herzfrequenz und Blutdruck belegt. Ein Crossover-Design mit zwei Untersuchungstagen ermöglichte einen Vergleich mit Kontrolldaten.

Zusammenfassung

CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen zeigten einen stressinduzierten Abfall im peripheren Blut der Probanden (p<0,01). Periphere CD4⁺ T-Zellen, welche die mit der Funktion regulatorischer T-Zellen assoziierten Effektormoleküle CTLA-4 und LAP exprimieren, demonstrierten ebenfalls einen stressinduzierten Abfall im peripheren Blut (p<0,05 und p<0,001). CD4⁺GITR⁺ T-Zellen blieben auf dem Ausgangsniveau. Ein vormals beobachteter stressinduzierter Abfall CD45RA⁺CCR7⁺ „naiver“ T-Zellen und CD45RA⁻CCR7⁺ zentraler T-Gedächtniszellen im peripheren Blut der Probanden konnte reproduziert werden. Der Anteil peripherer CD45RA⁻CCR7⁻ T-Effektor-Gedächtniszellen sowie CD45RA⁺CCR7⁻ terminal differenzierter T-Effektor-Gedächtniszellen blieb auf stabilem Niveau oder stieg an. Es konnte ein signifikanter Anstieg des Quotienten aus CD8⁺CCR7⁻ und CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen beobachtet werden (p< 0,001). CD4⁺FOXP3⁺ Tregs waren überwiegend CCR7-negativ.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie tragen zu einer Komplettierung und Erweiterung des Modells T-zellvermittelter Immunität unter akutem psychischem Stress bei. Erstmals wurden immunregulatorische Anteile des T-zellvermittelten Arms des Immunsystems in die Analyse einbezogen.

Inhibierende Komponenten der erworbenen Immunität, wie CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen, scheinen im Rahmen einer stressinduzierten Aktivierung adaptiver Immunfunktionen herabreguliert zu werden. Stressinduzierte Veränderungen in der T-Zelldistribution sind wahrscheinlich durch Umverteilungsvorgänge in unterschiedliche Kompartimente verursacht. Antigenerfahrene und zytotoxische T-Zellen werden in das periphere Blut mobilisiert. CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen erfahren in diesem Zusammenhang eine Herabregulation im peripheren Blut. Möglicherweise tragen sie dadurch zu einer effektiven Immunantwort als Reaktion auf „fight or flight“- Gefahrensituationen bei.

Diese T-Zell-Umverteilung könnte die Immunantwort in der Bekämpfung von Infektionen optimieren oder sogar eine effektive Antitumorimmunität unterstützen. Auf der anderen Seite könnte eine wiederholte Exposition des Organismus mit akuten Stressoren und konsekutiver Immunaktivierung negativen Einfluss auf verschiedene Krankheitsprozesse, beispielsweise in der Förderung von Autoimmunerkrankungen, nehmen.

Literaturverzeichnis

- Ader, R. (1974). "Letter: Behaviorally conditioned immunosuppression." Psychosom Med 36(2): 183-4.
- Ader, R. (2007). Psychoneuroimmunology. San Diego, Academic Press 4th edition.
- Ader, R. and N. Cohen (1975). "Behaviorally conditioned immunosuppression." Psychosom Med 37(4): 333-40.
- Akbar, A. N., L. Terry, et al. (1988). "Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells." J Immunol 140(7): 2171-8.
- Ali, N. A., A. A. Gaughan, et al. (2008). "Latency associated peptide has in vitro and in vivo immune effects independent of TGF-beta1." PLoS ONE 3(4): e1914.
- Anderson, A. E. and J. D. Isaacs (2008). "Tregs and rheumatoid arthritis." Acta Reumatol Port 33(1): 17-33.
- Atanackovic, D., M. C. Brunner-Weinzierl, et al. (2002). "Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species." Immunol Invest 31(2): 73-91.
- Atanackovic, D., B. Schnee, et al. (2006). "Acute psychological stress alerts the adaptive immune response: stress-induced mobilization of effector T cells." J Neuroimmunol 176(1-2): 141-52.
- Austrup, F., D. Vestweber, et al. (1997). "P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues." Nature 385(6611): 81-3.
- Bachen, E. A., S. B. Manuck, et al. (1992). "Lymphocyte subset and cellular immune responses to a brief experimental stressor." Psychosom Med 54(6): 673-9.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392(6673): 245-52.
- Baud, O., O. Goulet, et al. (2001). "Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation." N Engl J Med 344(23): 1758-62.
- Belkaid, Y. and B. T. Rouse (2005). "Natural regulatory T cells in infectious disease." Nat Immunol 6(4): 353-60.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet 27(1): 20-1.
- Benschop, R. J., M. Rodriguez-Feuerhahn, et al. (1996). "Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions." Brain Behav Immun 10(2): 77-91.
- Besedovsky, H., A. del Rey, et al. (1986). "Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones." Science 233(4764): 652-4.
- Besedovsky, H. O. and A. del Rey (1996). "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses." Endocr Rev 17(1): 64-102.
- Beyer, M. and J. L. Schultze (2006). "Regulatory T cells in cancer." Blood 108(3): 804-11.
- Beyer, M. and J. L. Schultze (2007). "CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood are primarily of effector memory phenotype." J Clin Oncol 25(18): 2628-30; author reply 2630-2.
- Bindl, L., T. Torgerson, et al. (2005). "Successful use of the new immune-suppressor sirolimus in IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome)." J Pediatr 147(2): 256-9.

- Blois, S. M., J. M. Ilarregui, et al. (2007). "A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance." Nat Med 13(12): 1450-7.
- Bommireddy, R., G. F. Babcock, et al. (2008). "TGFbeta1 deficiency does not affect the generation and maintenance of CD4+CD25+FOXP3+ putative Treg cells, but causes their numerical inadequacy and loss of regulatory function." Clin Immunol 127(2): 206-13.
- Bosch, J. A., G. G. Berntson, et al. (2003). "Acute stress evokes selective mobilization of T cells that differ in chemokine receptor expression: a potential pathway linking immunologic reactivity to cardiovascular disease." Brain Behav Immun 17(4): 251-9.
- Bosch, J. A., C. Ring, et al. (2002). "Stress and secretory immunity." Int Rev Neurobiol 52: 213-53.
- Bruder, D., M. Probst-Kepper, et al. (2004). "Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells." Eur J Immunol 34(3): 623-30.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet 27(1): 68-73.
- Brusko, T. M., A. L. Putnam, et al. (2008). "Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities." Immunol Rev 223: 371-90.
- Cacioppo, J. T., G. G. Berntson, et al. (1998). "Autonomic, neuroendocrine, and immune responses to psychological stress: the reactivity hypothesis." Ann N Y Acad Sci 840: 664-73.
- Calabrese, J. R., M. A. Kling, et al. (1987). "Alterations in immunocompetence during stress, bereavement, and depression: focus on neuroendocrine regulation." Am J Psychiatry 144(9): 1123-34.
- Cannon, W. B. (1914). "The emergency function of the adrenal medulla in pain and major emotions." American Journal of Physiology 33: 356-372.
- Cesana, G. C., G. DeRaffele, et al. (2006). "Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma." J Clin Oncol 24(7): 1169-77.
- Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." N Engl J Med 354(6): 610-21.
- Chen, G., P. Shankar, et al. (2001). "CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection." Blood 98(1): 156-64.
- Chen, W. (2006). "Dendritic cells and (CD4+)CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance." Front Biosci 11: 1360-70.
- Cools, N., P. Ponsaerts, et al. (2007). "Regulatory T cells and human disease." Clin Dev Immunol 2007: 89195.
- Costantino, C. M., C. M. Baecher-Allan, et al. (2008). "Human regulatory T cells and autoimmunity." Eur J Immunol 38(4): 921-4.
- Curiel, T. J. (2007). "Tregs and rethinking cancer immunotherapy." J Clin Invest 117(5): 1167-74.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med 10(9): 942-9.
- Danke, N. A., D. M. Koelle, et al. (2004). "Autoreactive T cells in healthy individuals." J Immunol 172(10): 5967-72.
- Dhabhar, F. S. (2002). "Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines." Brain Behav Immun 16(6): 785-98.

- Dhabhar, F. S. and B. S. McEwen (1997). "Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking." Brain Behav Immun 11(4): 286-306.
- Dhabhar, F. S., A. H. Miller, et al. (1995). "Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms." J Immunol 154(10): 5511-27.
- Dhabhar, F. S. and K. Viswanathan (2005). "Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289(3): R738-44.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, et al. (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." J Exp Med 200(3): 277-85.
- Elenkov, I. J. and G. P. Chrousos (2002). "Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity." Ann N Y Acad Sci 966: 290-303.
- Fleshner, M., K. T. Nguyen, et al. (1998). "Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity." Am J Physiol 275(3 Pt 2): R870-8.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol 4(4): 330-6.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology 21(6): 903-14.
- Glaser, R. and J. K. Kiecolt-Glaser (2005). "Stress-induced immune dysfunction: implications for health." Nat Rev Immunol 5(3): 243-51.
- Glaser, R., J. Sheridan, et al. (2000). "Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine." Psychosom Med 62(6): 804-7.
- Hengel, R. L., V. Thaker, et al. (2003). "Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen." J Immunol 170(1): 28-32.
- Herbert, T. B., S. Cohen, et al. (1994). "Cardiovascular reactivity and the course of immune response to an acute psychological stressor." Psychosom Med 56(4): 337-44.
- Hodi, F. S., M. C. Mihm, et al. (2003). "Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients." Proc Natl Acad Sci U S A 100(8): 4712-7.
- Hoglund, C. O., J. Axen, et al. (2006). "Changes in immune regulation in response to examination stress in atopic and healthy individuals." Clin Exp Allergy 36(8): 982-92.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science 299(5609): 1057-61.
- Huang, C. T., C. J. Workman, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity 21(4): 503-13.
- Huehn, J. and A. Hamann (2005). "Homing to suppress: address codes for Treg migration." Trends Immunol 26(12): 632-6.
- Ichihara, F., K. Kono, et al. (2003). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers." Clin Cancer Res 9(12): 4404-8.
- Jenkins, M. K., A. Khoruts, et al. (2001). "In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells." Annu Rev Immunol 19: 23-45.
- Johannes B., F. F. (1990). "Computer-Modelle der Belastung zur Untersuchung der Abhängigkeit der individuellen Stress-Reaktivität vom Belastungstyp. XXIII Tagung der STAg KMB INTERKOS-MOS, Koshike, CSFR."
- Johannes B., K. K., Fischer F. (1995). "Voice measurement of oral communication and the experiment "REGULATION". Extended Abstracts and Participants Forum 9th Microgravity Summer School. Topic: Space and Telemedicine, Schnellenberg Castle 4th-7th July, 1995 pp143-146."

- Keilholz, U., P. Martus, et al. (2006). "Immune monitoring of T-cell responses in cancer vaccine development." Clin Cancer Res 12(7 Pt 2): 2346s-2352s.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol 4(4): 337-42.
- Kiecolt-Glaser, J. K., R. Glaser, et al. (1998). "Marital stress: immunologic, neuroendocrine, and autonomic correlates." Ann N Y Acad Sci 840: 656-63.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells." Science 290(5489): 92-7.
- Larson, M. R., R. Ader, et al. (2001). "Heart rate, neuroendocrine, and immunological reactivity in response to an acute laboratory stressor." Psychosom Med 63(3): 493-501.
- Laux, L., Glanzmann, P, Schaffner, O., Spielberger, CD (1981). Das Stait-Trate-Angstinventar. Weinheim, Beltz Testgesellschaft.
- Le, N. T. and N. Chao (2007). "Regulating regulatory T cells." Bone Marrow Transplant 39(1): 1-9.
- Lehmann, J., J. Huehn, et al. (2002). "Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 13031-6.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." Annu Rev Immunol 16: 137-61.
- Lindley, S., C. M. Dayan, et al. (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)/CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." Diabetes 54(1): 92-9.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med 203(7): 1701-11.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol 169(5): 2756-61.
- Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, et al. (2005). "Inhibition of CD4(+)/25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide." Blood 105(7): 2862-8.
- Maestroni, G. J. and P. Mazzola (2003). "Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity." J Neuroimmunol 144(1-2): 91-9.
- McEwen, B. S. (2007). "Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain." Physiol Rev 87(3): 873-904.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity 16(2): 311-23.
- Metalnikov, S. (1932). "Die Rolle des Nervensystems und der psychischen Faktoren bei der Immunität." Clinical and Experimental Medicine 84(1): 89-106.
- Mohr, D. C., S. L. Hart, et al. (2004). "Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis." BMJ 328(7442): 731.
- Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2004). "TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice." J Immunol 172(2): 834-42.
- Owen, N. and A. Steptoe (2003). "Natural killer cell and proinflammatory cytokine responses to mental stress: associations with heart rate and heart rate variability." Biol Psychol 63(2): 101-15.
- Powell, B. R., N. R. Buist, et al. (1982). "An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy." J Pediatr 100(5): 731-7.

- Puccetti, P. and U. Grohmann (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." Nat Rev Immunol 7(10): 817-23.
- Roman, E., E. Miller, et al. (2002). "CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function." J Exp Med 196(7): 957-68.
- Saito, S., A. Shiozaki, et al. (2007). "Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance." Semin Immunopathol 29(2): 115-22.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol 22: 531-62.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol 155(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." Immunol Rev 182: 18-32.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell 133(5): 775-87.
- Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol 22: 745-63.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature 401(6754): 708-12.
- Sandberg, S., J. Y. Paton, et al. (2000). "The role of acute and chronic stress in asthma attacks in children." Lancet 356(9234): 982-7.
- Sansom, D. M. and L. S. Walker (2006). "The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology." Immunol Rev 212: 131-48.
- Sapolsky, R. M., L. M. Romero, et al. (2000). "How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions." Endocr Rev 21(1): 55-89.
- Schachinger, H., M. Weinbacher, et al. (2001). "Cardiovascular indices of peripheral and central sympathetic activation." Psychosom Med 63(5): 788-96.
- Schedlowski, M., A. Falk, et al. (1993). "Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells." J Clin Immunol 13(5): 344-51.
- Schedlowski, M., W. Hosch, et al. (1996). "Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms." J Immunol 156(1): 93-9.
- Schedlowski, M., R. Jacobs, et al. (1993). "Changes of natural killer cells during acute psychological stress." J Clin Immunol 13(2): 119-26.
- Schedlowski, M. and R. E. Schmidt (1996). "[Stress and the immune system]." Naturwissenschaften 83(5): 214-20.
- Schedlowski, M., Tewes, U. (1996). Psychoneuroimmunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwenkmezger, P., Hodapp, V., Spielberger, C.D. (1992). "Das State-Trait-Ärgerausdrucksinventar STAXI: Handbuch. 1. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern."
- Segerstrom, S. C. and G. E. Miller (2004). "Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry." Psychol Bull 130(4): 601-30.
- Selye, H. (1998). "A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936." J Neuropsychiatry Clin Neurosci 10(2): 230-1.
- Shevach, E. M. (2006). "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells." Immunity 25(2): 195-201.

- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J Immunol 163(10): 5211-8.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol 3(2): 135-42.
- Soiffer, R. (2008). "Immune modulation and chronic graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant 42 Suppl 1: S66-S69.
- Spielberger CD., G. R., Lushene RE (1996). "STAXI, STAIG, Collegium Internationale Psychiatrica Scalarum, ed. Internationale Skalen für Psychiatrie, 4th ed. Beltz-Test, Göttingen."
- Stephens, G. L., R. S. McHugh, et al. (2004). "Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells." J Immunol 173(8): 5008-20.
- Steptoe, A. and C. Vogele (1991). "Methodology of mental stress testing in cardiovascular research." Circulation 83(4 Suppl): II14-24.
- Sternberg, E. M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens." Nat Rev Immunol 6(4): 318-28.
- Straub, R. H., F. S. Dhabhar, et al. (2005). "How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 52(1): 16-26.
- Sutmoller, R. P., L. M. van Duivenvoorde, et al. (2001). "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses." J Exp Med 194(6): 823-32.
- Terness, P., M. Kallikourdis, et al. (2007). "Tolerance signaling molecules and pregnancy:IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells." Am J Reprod Immunol 58(3): 238-54.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity 3(5): 541-7.
- Torgerson, T. R. (2006). "Regulatory T cells in human autoimmune diseases." Springer Semin Immunopathol 28(1): 63-76.
- Tosello, V., K. Odunsi, et al. (2008). "Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs." Clin Immunol 126(3): 291-302.
- Valmori, D., A. Merlo, et al. (2005). "A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs." J Clin Invest 115(7): 1953-62.
- van der Vliet, H. J. and E. E. Nieuwenhuis (2007). "IPEX as a result of mutations in FOXP3." Clin Dev Immunol 2007: 89017.
- Vedhara, K., N. K. Cox, et al. (1999). "Chronic stress in elderly carers of dementia patients and antibody response to influenza vaccination." Lancet 353(9153): 627-31.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, et al. (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med 199(7): 971-9.
- Viswanathan, K., C. Daugherty, et al. (2005). "Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity." Int Immunol 17(8): 1059-69.
- Viswanathan, K. and F. S. Dhabhar (2005). "Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation." Proc Natl Acad Sci U S A 102(16): 5808-13.
- Volpi, S., C. Rabadan-Diehl, et al. (2004). "Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation." Stress 7(2): 75-83.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol 6(4): 338-44.

- von Boehmer, H., I. Aifantis, et al. (2003). "Thymic selection revisited: how essential is it?" Immunol Rev 191: 62-78.
- Wang, H. Y. and R. F. Wang (2007). "Regulatory T cells and cancer." Curr Opin Immunol 19(2): 217-23.
- Wang, J., A. Ioan-Facsinay, et al. (2007). "Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells." Eur J Immunol 37(1): 129-38.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." Science 270(5238): 985-8.
- Werlen, G., B. Hausmann, et al. (2003). "Signaling life and death in the thymus: timing is everything." Science 299(5614): 1859-63.
- Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, et al. (2002). "Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome." J Med Genet 39(8): 537-45.
- Wills, M. R., A. J. Carmichael, et al. (1999). "Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45ROhigh to CD45RAhigh in vivo: CD45RAhighCD8+ T cells comprise both naive and memory cells." J Immunol 162(12): 7080-7.
- Wolf, A. M., D. Wolf, et al. (2003). "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients." Clin Cancer Res 9(2): 606-12.
- Wolint, P., M. R. Betts, et al. (2004). "Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells." J Exp Med 199(7): 925-36.
- Wrona, D. (2006). "Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems." J Neuroimmunol 172(1-2): 38-58.
- Yamanouchi, J., D. Rainbow, et al. (2007). "Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity." Nat Genet 39(3): 329-37.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol 6(4): 295-307.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CCR	Chemokine Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CD25	α -Kette des IL-2-Rezeptors
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELC	Epstein-Barr-induced-1 ligand chemokine/Exodus-3
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Forward Scatter
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FOXP3	transcription factor forkhead box P3
GITR	Glucocorticoid-incuded TNF receptor family-related gene
GvHD	Graft-versus-host disease
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX	Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome
μ g; μ l	mikrogramm; mikroliter
LAG3	Lymphocyte activation gene 3
LAP	Latency associated peptide
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minuten
ml	milliliter
MNC	mononuclear cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein Complex
rpm	round per minute
RPMI	Zellkulturmedium „Roswell Park Memorial Institute“
sec	Sekunden
SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine
SSC	Side Scatter
STAI-G	State-Trait-Angstinventar
STAXI	State-Trait-Ärgerausdrucksinventar
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen 1 und 2: schematische Darstellung der Immunregulation durch Tregs	19,21
Abbildungen 3 und 4: Überblick über den Versuchsablauf und die Testphase	30,31
Abbildung 5: Manometertest	33
Abbildung 6: Psychologische Aktivierung der Probanden im Versuchsverlauf (STAI-G und STAXI).....	43
Abbildung 7: Herzfrequenzänderung im Versuchsverlauf	45
Abbildung 8: Blutdruckänderung im Versuchsverlauf	46
Abbildung 9: CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen.....	48
Abbildung 10: CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen.....	49
Abbildung 11: CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ regulatorische T-Zellen im Versuchsverlauf	51
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Auswertung: Dot-plot von CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ T-Zellen eines Probanden.....	52
Abbildungen 13a und 13 b: <i>13a)</i> Quotient CD8 ⁺ CCR7 ⁺ zytotoxischer T-Zellen und CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ Tregs <i>13b)</i> Unterteilung von CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ Tregs in CCR7 ⁺ und CCR7 ⁻ T-Zellen.	53
Abbildung 14: Korrelationsanalyse von Herzfrequenzanstieg und Treg-Abfall.....	54
Abbildung 15: CTLA-4 ⁺ , GITR ⁺ , LAP ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im Versuchsverlauf.....	55
Tabelle 1: T-Zell-Subpopulationen anhand ihrer CD45RA/CCR7-Expression.....	14
Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Markierung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulärem FOXP3	39
Tabelle 3: Allgemeine Daten des Probandenkollektivs	42
Tabelle 4: Zustandsärger (STAXI) und Zustandsangst (STAI-G) an Stress- und Kontrolltag ..	44
Tabelle 5: Kardiovaskuläre Parameter am Kontrolltag	46
Tabelle 6: CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ regulatorische T-Zellen an Stress- und Kontrolltag	51
Tabelle 7: CTLA-4, GITR, LAP an Stress- und Kontrolltag.....	56
Tabelle 8: T-Zell-Subpopulationen im Versuchsverlauf.....	84

Tabelle T-Zell-Subpopulationen

Tabelle 8: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen im Versuchsverlauf am Stresstag (ST) sowie am Kontrolltag (KT)

% an Gesamtlymphozyten			25.Perz.	Med	75.Perz.	MW	SA	Sig.
CD4+	ST	Tnaive prä	12	19	23,9	18,6	8	-
		Tnaive Stress	9,4	15,4	20,9	16,2	8,8	**
		Tnaive post	10,3	15	20	16,4	7,9	**
	ST	Tcm prä	5	6,8	9	7,3	2,7	-
		Tcm Stress	4,6	5,4	7,4	6	2	*
		Tcm post	5,3	6,5	9,2	7,3	2,8	ns
	ST	Tem prä	8	9,8	14,7	11	3,4	-
		Tem Stress	7,9	9,8	12,7	10,7	4	ns
		Tem post	9,3	12	14,8	12,5	4,4	*
	ST	Temra prä	0,9	1,3	3,7	2,5	2,5	-
		Temra Stress	0,9	1,3	2,9	2,3	2,5	ns
		Temra post	0,9	1	3	2,1	2,3	ns
CD4+	KT	Tnaive prä	7,1	10,6	16,6	12,7	7,1	-
		Tnaive Stress	5,8	7,7	16,5	10,4	6,8	ns
		Tnaive post	5,8	10,1	14	11	6,6	ns
	KT	Tcm prä	4,6	5,4	6,1	5,3	1,2	-
		Tcm Stress	4	4,9	6,5	5,3	2,7	ns
		Tcm post	3,9	5,1	5,9	4,9	1,5	ns
	KT	Tem prä	8,1	10,8	12,7	11	4,5	-
		Tem Stress	4,3	10,3	13,1	9,9	6,1	ns
		Tem post	8	11	14,1	11,5	4,8	ns
	KT	Temra prä	0,4	0,7	1,7	1,6	2,3	-
		Temra Stress	0,6	1	4,2	2,8	4,1	ns
		Temra post	0,4	0,9	2,4	1,8	2,1	ns
CD8+	ST	Tnaive prä	4,7	6,6	14,1	10,3	10,9	-
		Tnaive Stress	2,9	5,6	10,5	8,2	10	***
		Tnaive post	2,8	5	11,2	8,3	10,1	**
	ST	Tcm prä	0,9	1,2	1,7	1,8	2,8	-
		Tcm Stress	0,6	1	1,4	1,5	2,6	**
		Tcm post	0,7	1	1,6	1,6	2,7	*
	ST	Tem prä	9,9	17,6	28,3	19,7	12,3	-
		Tem Stress	11,3	16,9	26,3	18,6	9,3	ns
		Tem post	9,3	16,9	29,2	19,2	11,4	ns
	ST	Temra prä	3,7	5,2	9	6,5	4,1	-
		Temra Stress	3,8	6,3	10,9	8,3	6	**
		Temra post	3	5,3	7,9	6,5	4,9	ns
CD8+	KT	Tnaive prä	4,5	6	12,6	7,8	4,2	-
		Tnaive Stress	3,2	5,8	12,9	7,1	4,7	ns
		Tnaive post	3,3	5,8	10,9	7,1	4,4	ns
	KT	Tcm prä	0,7	0,8	1,1	0,9	0,2	-
		Tcm Stress	0,6	0,7	1,1	0,8	0,4	ns
		Tcm post	0,6	0,7	0,9	0,8	0,3	ns
	KT	Tem prä	13,5	18,8	22,8	18,3	5,9	-
		Tem Stress	12,2	20,3	24,3	18,7	7,4	ns
		Tem post	14,1	18,6	21,5	18,3	6,6	ns
	KT	Temra prä	2,9	5,9	8,2	5,9	3,3	-
		Temra Stress	2,2	6,4	9,3	5,9	3,3	ns
		Temra post	1,8	6,7	8,3	5,8	3,9	ns

Fragebogen und Probandeninformation

Fragebogen 1

Name des Probanden: _____

Geburtsdatum: _____

Grösse/Gewicht: _____ cm / _____ kg

Raucher?: ja / nein Nichtraucher seit:

Alkoholkonsum (Menge):

Drogenkonsum: ja / nein

Regelmäßige Medikamenteneinnahme?: ja / nein
Wenn ja, welche? _____

Chronische Erkrankungen / Allergien?: ja / nein _____

OP o. akute Erkrankung in den letzten Wochen? ja/ nein _____

Sportliche Aktivitäten?: Wie oft? _____

Nadelphobie?: ja / nein

Psychische Erkrankungen / derzeitige psychische Belastungssituation?:

Ernährung: Ausgewogen/Vegetarier? _____

Schulabschluss/Beruf: _____ / _____

Familienstand: ledig verheiratet geschieden verwitwet

Proband geeignet?

JA

NEIN

Probandeninformation <u>Körperliche Abwehrkräfte und Stress</u>
--

Sehr geehrter Proband!

Das Immunsystem unseres Körpers, im allgemeinen Sprachgebrauch auch als „Abwehrkräfte“ bezeichnet, ist elementar für unsere Gesundheit. Es bekämpft Infektionen und schützt uns vor anderen schädlichen Einwirkungen.

Das Immunsystem besteht aus im Blut zirkulierenden verschiedenen Zellarten, die wir heutzutage getrennt voneinander beobachten können. Durch die Untersuchung dieser Zellen können wir das Immunsystem genauer beurteilen.

Man nimmt an, dass unser tägliches Erleben Auswirkungen auf den Zustand des Immunsystems hat

Um die Lage Ihres Immunsystems genauer beurteilen und mögliche Auswirkungen von Stress dokumentieren zu können, möchten wir Sie bitten, sich einer kurzen Stressbelastung zu unterziehen. Hierbei werden Sie an einem Termin am Computer einen circa zehnminütigen mentalen Belastungstest durchführen.

Der Test findet zwischen zwei Ruhephasen statt, die Gesamtdauer liegt bei etwa eineinhalb Stunden.

Drei Mal werden wir im Laufe der zwei Untersuchungen je 30 ml Blut aus einem Venenverweilkatheter im Arm entnehmen. Außerdem möchten wir Sie bitten, zu insgesamt drei Zeitpunkten, vor, während und kurz nach der Untersuchung einen kurzen Fragebogen zu Ihrem aktuellen seelischen Empfinden auszufüllen. Blutdruckmessungen und die Bestimmung Ihrer Herzfrequenz werden während der Untersuchung durchgeführt.

Sobald die Versuchsergebnisse vorliegen, bieten wir Ihnen die Möglichkeit, mehr über die Reaktionsweise Ihres Immunsystems auf Stress zu erfahren.

Die entstehenden Daten zu Ihrer Person werden wissenschaftlich ausgewertet und vertraulich behandelt!

Einverständniserklärung

Ich wurde über alle mit der Untersuchung des Immunsystems zusammenhängenden Fragen vollständig aufgeklärt.

Ich bin damit einverstanden, die Blutentnahmen durchführen zu lassen und die Fragebögen auszufüllen.

Es steht mir frei, diese Einwilligung jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, zu widerrufen.

Berlin, den _____

Unterschrift des Probanden

Unterschrift des Untersuchers

Lebenslauf

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

Publikation

Eva Freier, Cora Stefanie Weber, Ulrike Nowottne, Christiane Horn, Katrin Bartels, Sabrina Meyer, York Hildebrandt, Tim Luetkens, Yanran Cao, Caroline Pabst, Julia Muzzulini, Benjamin Schnee, Monika Christine Brunner-Weinzierl, Maurizio Marangolo, Carsten Bokemeyer, Hans-Christian Deter, Djordje Atanackovic

“Decrease of CD4⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in the peripheral blood of human subjects undergoing a mental stressor”

Eingereicht bei „Psychoneuroendocrinology”

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. In erster Linie gilt dieser Dank Herrn Professor Dr. Hans-Christian Deter und der Abteilung für Psychosomatik und Psychotherapie der Charité Campus Benjamin Franklin sowie Herrn Dr. Djordje Atanackovic und dem tumorimmunologischen Labor des Onkologischen Zentrums der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg–Eppendorf.

Herrn Professor Dr. Hans-Christian Deter danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine Anregungen sowie Unterstützung in der Realisierung der vorliegenden Doktorarbeit. Herrn Dr. Djordje Atanackovic danke ich für seine Unterstützung und Kooperationsbereitschaft, welche dieses interdisziplinäre Vorhaben erst ermöglichte.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern der Abteilung für Psychosomatik und Psychotherapie der Charité Campus Benjamin Franklin, insbesondere Frau Dr. Cora Weber sowie Frau Dr. Julia Muzzolini. Bei Frau Miriam Rudat bedanke ich mich für die tatkräftige Hilfe in der Realisierung des Stressexperimentes sowie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre; ein Dank auch an Ulrike Nowottne. Frau Bärbel Girresch, dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin sowie Frau Christiane Horn und Frau Katrin Bartels aus dem tumorimmunologischen Labor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich für die Unterstützung im labortechnischen Teil der Arbeit. Für die Hilfe in der Aufbereitung und Auswertung der Daten bedanke ich mich bei Herrn Immo Curio sowie den Mitarbeitern der Abteilung für Biometrie und Medizinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund sowie meinen Eltern und Geschwistern, welche mich in jeder Phase der Promotionsarbeit unterstützt haben.

Erklärung

„Ich, Eva Freier, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Auswirkungen von kurzzeitigem Laborstress auf CD4⁺FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen im peripheren Blut“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift