

Wirkung von chronisch-psychosozialem Stress auf myeloide Suppressorzellen und auf Tumorwachstum



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Dominic Schmidt

aus

Regensburg

im Jahr

2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

26.09.2014

Die Promotion wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Daniela Männel

Unterschrift:

Gewidmet meiner Familie

„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind, wie sie sind.“

Aristoteles (384 - 322 v. Chr.), griechischer Philosoph, Schüler Platos, Lehrer Alexanders des Großen von Makedonien

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	11
1.1 Historie und das Stress-Konzept.....	11
1.2 Kontrollierbarkeit und Berechenbarkeit	12
1.3 Physiologische Stress-Reaktion.....	13
1.4 Krankheiten bedingt durch akuten und chronischen Stress.....	14
1.5 Das Immunsystem	14
1.6 Das angeborene Immunsystem	15
1.6.1 Dendritische Zellen.....	15
1.6.2 Neutrophile Granulozyten.....	15
1.6.3 Makrophagen	16
1.6.4 Natürliche Killerzellen (NK).....	16
1.6.5 Mast-Zellen.....	17
1.6.6 Basophile Granulozyten	17
1.6.7 Eosinophile Granulozyten.....	17
1.7 Das erworbene Immunsystem.....	17
1.7.1 B-Lymphozyten	18
1.7.2 B-Zell-Differenzierung.....	18
1.7.3 B-Zell-Aktivierung	19
1.7.4 T-Zell-abhängige Immunantwort	19
1.7.5 T-Zell-unabhängige Immunantwort	20
1.8 T-Lymphozyten	20
1.8.1 T_H -Zellen	20
1.8.2 Zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen.....	21
1.9 Regulatorische T-Zellen (T_{Reg})	21
1.9.1 Marker für murine T_{Reg}	21
1.9.2 Effektor-Mechanismen von nT_{Reg}	23
1.10 Myeloide Suppressorzellen	24
1.10.1 Eigenschaften von MDSC.....	25

1.10.2 Immunmodulatorische Funktionen von MDSC	25
1.10.3 MDSC-Aktivierung und –Rekrutierung	26
1.11 Der Einfluss von Stress auf das Immunsystem	27
1.11.1 Modelle für chronischen Stress.....	27
1.11.2 Chronic Subordinate Colony Housing	28
1.12 Zielsetzung dieser Arbeit.....	29
2. Material und Methoden.....	30
2.1 Antikörper/ Konjugate	30
2.2 Versuchstiere	31
2.2.1 Behandlung mit 6-OH Dopamin (Oxydopamin).....	31
2.2.2 Behandlung mit RU-486 (Mifepriston).....	31
2.2.3 Behandlung mit Dexamethason.....	32
2.3 Chemikalien und Reagenzien	33
2.4 Kits	33
2.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte	34
2.6 Stressmodell: Chronic Subordinate Colony housing (CSC).....	34
2.7 Durchflusszytometrie und Zell Isolationen.....	35
2.7.1 Präparation der Milz und Erstellung von Milzzellsuspensionen	35
2.7.2 Präparation des Femurs und Erstellung von Knochenmarkszellsuspensionen	35
2.7.3 Durchflusszytometrische Färbungen von Milz- und Knochenmarks-Zellen	36
2.7.4 Durchflusszytometrische Färbungen von Gesamt-Blut	36
2.8 Isolation von PMN- und MO-MDSC	37
2.8.1 Isolierung von CD11b ⁺ Zellen	37
2.8.2 Isolation von PMN-MDSC (CD11b ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ^{int}).....	38
2.8.3 Isolation von MO-MDSC (CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ⁺).....	39
2.8.4 MDSC:T-Zell Suppression Assay	39
2.9 Histologie von Tumor-Schnitten	42
2.9.1 Erstellen von Semi-Dünnschnitten.....	42
2.9.2 Färben von histologischen Schnitten des Tumorgewebes	42
2.9.3 Analyse von histologischen Tumor-Schnitten mit TissueFAXS	43

3. Ergebnisse	45
3.1 Chronisch psychosozialer Stress und die Auswirkungen auf das Immunsystem	45
3.1.1 Auswirkung von chronischem Stress auf Lymphozyten	45
3.1.2 Auswirkung von chronischem Stress auf myeloide Zellen.....	46
3.2 Funktionelle Charakteristika von MDSC	47
3.3 Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von CD11b ⁺ Zellen in Milz und Knochenmark	49
3.4 Mechanismen, die zur Akkumulation von CD11b ⁺ Zellen in der Milz führen	51
3.4.1 Die Rolle von IL-6 auf stressinduzierte myeloide Zellen.....	52
3.4.2 Die Rolle von TNF auf stressinduzierte myeloide Zellen	53
3.4.3 Die Rolle von TNFR2 für stressinduzierte myeloide Zellen	55
3.4.4 GM-CSF und G-CSF induziert Granulozyten bzw. Monozyten/ Makrophagen.....	57
3.5 Die Rolle des sympathischen Nervensystems für stressinduzierte Myelopoese	58
3.6 Die Rolle der HPA-Achse für stressinduzierte Myelopoese	60
3.6.1 Konfrontation mit einem zweiten und dritten Residenten induziert jeweils einen Anstieg an Corticosteron im Blut	60
3.6.2 Akute Behandlung mit Glukokortikoiden imitiert akuten CSC-Stress.....	61
3.6.3 Chronische Behandlung mit Glukokortikoiden imitiert 19 Tage CSC.....	63
3.6.4 Glukokortikoide induzieren einen Anstieg an G-CSF im Serum	65
3.6.5 Blockade der HPA-Achse mit einem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten	66
3.7 Die Rolle von stressinduzierten MDSC in sekundären Erkrankungen nach CSC	69
3.7.1 Der Einfluss von Stress auf Tumorwachstum (23 Tage)	69
3.7.2 Funktionelle Analyse von MDSC, isoliert nach Tumor (23 Tage)	71
3.7.3 Untersuchung der CSC-induzierten tumorfördernden Mechanismen	73
3.7.4 Funktionelle Analyse von MDSC, isoliert nach Tumor (9 Tage)	76
3.7.5 Untersuchung der CSC-induzierten Veränderungen 9 Tage nach Beendigung von chronischem Stress.....	78
3.7.6 Der Einfluss chronischer Behandlung mit Dexamethason auf das Tumorwachstum (20 Tage)	80
3.7.6 Funktionelle Analyse von MDSC, isoliert von dexamethason-behandelten Tieren nach Tumor (20 Tage).....	81
4. Diskussion.....	84

4.1 19 Tage chronischer Stress induziert suppressive Zellen.....	84
4.2 Stressinduzierte myeloide Zellen sind funktionsfähige MDSC	86
4.3 Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von MDSC in Milz und Knochenmark	89
4.4 Die Rolle von IL-6 in der stressvermittelten Akkumulation von CD11b ⁺ -Zellen in Milz und Knochenmark.....	90
4.5 Die Rolle von TNF/ TNFR2 in der stressvermittelten Akkumulation von CD11b ⁺ -Zellen in Milz und Knochenmark.....	91
4.6 Die Rolle des SNS in der stressvermittelten Akkumulation der CD11b ⁺ -Zellen in Milz und Knochenmark.....	93
4.7 Die Rolle der HPA-Achse in der stressvermittelten Akkumulation der CD11b ⁺ -Zellen in Milz und Knochenmark	93
4.7.1 Akute Behandlung mit Dexamethason imitiert akuten Stress.....	95
4.7.2 Chronische Behandlung mit Dexamethason imitiert chronischen Stress.....	96
4.7.3 Akute Behandlung mit Dexamethason induziert einen moderaten Anstieg an G-CSF.....	96
4.7.4 Blockade der HPA-Achse mit dem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten RU-486	97
4.8 Über die Relevanz stressinduzierter myeloider Zellen.....	97
4.8.1 Chronischer Stress beschleunigt Tumorwachstum	98
4.8.2 Untersuchung der Mechanismen, die nach CSC-Stress Tumorwachstum fördern	99
4.8.3 Chronische Behandlung mit Glucocorticoiden hat keinen Einfluss auf Tumorwachstum.....	100
4.9 Anmerkung T-Zell Suppression Assay	101
Zusammenfassung.....	102
Referenzen.....	103
Abkürzungsverzeichnis.....	108
Curriculum Vitae.....	113
Danksagung	116
Eidesstattliche Erklärung	118

Einleitung

1.1 Historie und das Stress-Konzept

Stress ist ein vieldeutiger Begriff, mit dem stets Negatives assoziiert ist. Er begleitet uns täglich in der Arbeitswelt, in der Freizeit und im familiären Leben und hindert uns unbeschwert unserem Leben nachzugehen. Unterliegen wir ihm permanent, so zeigt es sich, dass unser Körper sich verändert und wir werden krank. Warum das so ist, wird wissenschaftlich seit dem 19 Jahrhundert untersucht. Der erste Wissenschaftler, der sich mit diesem Thema auseinander setzte, war der französische Physiologe Claude Bernard (1813 – 1878). Er beschreibt mit dem Begriff „*Milieu intérieur*“ zum ersten Mal, dass ein Organismus zum Überleben seine innerliche Integrität bzw. sein inneres Milieu wahren muss, und lieferte Pionierarbeit für den durch Walter Cannon (1871 – 1945) erwähnten Begriff der „Homöostase“ (eustasis) im Jahre 1932 (1). Dies ist der Zustand, an dem der Organismus am besten an seine Umgebung angepasst ist. Cannon prägte den Begriff einer „*fight-or-flight*“-Situation, in welcher der Organismus sich in einer Stresssituation entscheiden muss, sich dem Stressor entgegenzustellen oder vor ihm zu fliehen (2). Ist die Entscheidung bzw. die Reaktion nicht angepasst, verfällt dieser in *allostasis*, welche kurz- bzw. langfristig schädlich sein kann. 1936 war der österreichisch-kanadische Mediziner Hans Selye der Erste, der den Begriff „Stress“ als die „unspezifische Reaktion des Körpers auf jede Art von Anforderung“ definierte (3). Er unterschied auch als Erster zwischen „Stressor“ und der „Stress Antwort“ (4, 5). Dabei ist ein extern agierender physischer oder ein innerlich wirkender psychologischer Stimulus dann ein „Stressor“, wenn die Homöostase des Organismus bedroht ist, wohingegen die „Stress Antwort“ die Reaktion ist, um die innere Homöostase wieder zu erlangen. Im Weiteren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die zunächst einen aversiven Stressor definierten, um letztendlich die physiologische Veränderung als eine spezifische Stress-Antwort zu interpretieren. Ein wichtiger Aspekt ist hier die individuelle Wahrnehmung; nicht jedes Individuum erkennt einen solchen Stressor als eine Gefährdung der inneren Homöostase an (6). Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine Stress-Antwort adaptiv oder maladaptiver Natur ist. Selye setzte sich zu diesem Thema mit dem „Allgemeinen Anpassungssyndrom“ auseinander. Dabei kann sich der Körper kurzfristig an die neue, unangenehme Situation anpassen, langfristig kann es jedoch zu körperlichen Schäden führen. Durch die Interaktion zwischen Stressor und der adaptiven Stress-Antwort ergeben sich drei mögliche Folgen (7). Erstens: Stressor und die Stress-Antwort passen perfekt zusammen (*match*) und der Körper gelangt zur Homöostase bzw. *eustasis* zurück. Zweitens: Die adaptive Stress-Antwort ist unangebracht (*mismatch*) und der Körper fällt in *allostasis*. Drittens: Stressor und Stress-Antwort passen perfekt zusammen und der

Organismus gelangt durch Erfahrung und eine neue verbesserte homöostatische Fähigkeit in einen Zustand der Über-Anangepasstheit (*hyperstasis*).

1.2 Kontrollierbarkeit und Berechenbarkeit

Im Weiteren Verlauf der Zeit wurden viele Versuche unternommen, um physiologische und psychologische Folgen von Stress zu untersuchen. Dafür wurden viele Studien mit Tiermodellen durchgeführt, die chronischen Stress nachahmten. Beliebte Modelle für chronischen Stress in Nagern waren u.a. „*restraint stress*“ (Einsperrstress) oder „*social defeat*“, bei dem ein subordiniertes Tier zusammen mit einem dominanten Tier gehalten wird und nur durch eine durchsichtige Plastikgitterwand getrennt ist. Zwei mal am Tag wird diese Wand für kurze Zeit entfernt und das dominante Tier hat die Möglichkeit das unterwürfige Tier zu attackieren. Neuere Interpretationen der Ergebnisse dieser Untersuchungen gaben Anlass, die Begriffe „Stressor“ und „Stress-Antwort“ neu zu überdenken. Bei der Definition eines Stressors müssen die Kriterien der Kontrollierbarkeit und Berechenbarkeit berücksichtigt werden (6). Allgemein ist die resultierende Stress-Antwort auf einen Stressor ein adaptiver Prozess mit einer gewissen Schutzfunktion. Ist ein Stressor stereotypisch, entwickelt das zu stressende Individuum eine gewisse Erwartungshaltung. Ein solcher Stimulus stellt somit nur zu Beginn eines Experiments einen Stressor dar, wohingegen er womöglich zum Ende nicht mehr als ein solcher wahrgenommen wird. Die Abgrenzung zu einem schädlichen Stressor liegt hier in der Kontrollierbarkeit und Berechenbarkeit. Dieser charakterisiert sich durch Unkontrollierbarkeit und Unberechenbarkeit, d.h. er agiert stets anders bzw. auf eine andere Art und Weise, auf die sich das gestresste Individuum nur schwer einstellen kann. Ein weiterer Aspekt, der einen pathologischen Stressor von einem normalen „physiologischen“ Stressor unterscheidet, ist die zeitliche Genesungsdauer. Kehren Stressmediatoren nach Terminierung der Stress-Situation schnell auf Basallevel zurück, sind keine körperlichen Schäden zu erwarten. Sind jene aber lange Zeit im Organismus erhöht, kann dies zu Schäden führen. Ein weiterer Faktor, der einen Stressor charakterisiert, ist die Intensität, die in einem Bereich zwischen sicher und lebensbedrohlich schwankt. Koolhaas et al. haben dies in einer eleganten Form in einem zweidimensionalen Diagramm zusammengefasst, wobei natürliche, kontrollierbare Herausforderungen von einem unkontrollierbaren, lebensbedrohlichen Stressor lokal distanziert wurden (vgl. Abbildung 1.1).

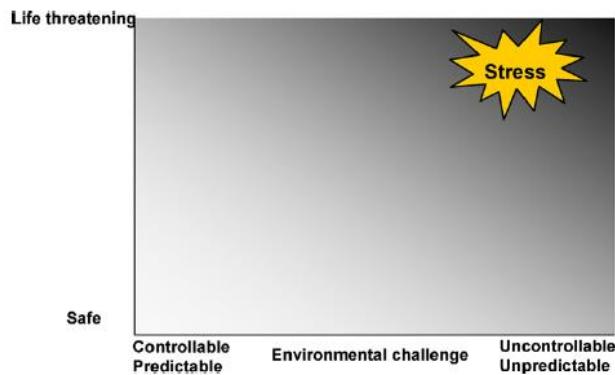


Abbildung 1.1: Gezeigt ist die Abhängigkeit, wann eine natürliche Herausforderung lebensbedrohlicher Stress ist bzw. wann diese eine sichere, voraussehbare und kontrollierbare Situation darstellt. Dabei beeinflusst die Kontrollierbarkeit/ Voraussehbarkeit (x-Achse) und die Stärke der Herausforderung (y-Achse), wann ein Stimulus zum Stressor wird und als Stress aufgefasst wird. Bildherkunft: (6).

1.3 Physiologische Stress-Reaktion

In einer akuten, physiologischen Stress-Reaktion des Körpers werden u.a. zwei sehr wichtige Haupt-Stress-Systeme im Körper aktiviert (8). Das ist zum einen das sympathische Nervensystem (SNS) und zum anderen die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*hypothalamo-pituitary-adrenocortical*; HPA). Innerhalb von Sekunden wird durch die Aktivierung des SNS Adrenalin und Noradrenalin aus den chromaffinergen Zellen des Nebennierenmarks ausgeschüttet, wo es für eine schnelle Sekretion gebildet und gespeichert wird. Innerviert wird die Nebenniere durch den *Nervus splanchnicus*. Dieser entspringt aus dem thoraco-lumbalen Bereich des Rückenmarks und innerviert direkt, ohne postganglionäre Verschaltung, die chromaffinergen Zellen des Marks der Nebenniere. Adrenalin bewirkt eine Erhöhung des Herzschlages, den Anstieg des Blutdruckes sowie die Erweiterung der Bronchiolen und fördert durch katabole Mechanismen eine schnelle Bereitstellung von Energiereserven, wohingegen anabole Prozesse unterdrückt werden.

Im Gegensatz zu dem schnell agierenden SNS benötigt die hormongetriebene HPA-Achse länger, um sich zu entwickeln. *Corticotropin Releasing Hormone* (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP) werden in den parvozellulären Neuronen im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus produziert, werden in deren Axonen zu der *Eminentia Mediana* des Hypophysen-Stiels transportiert und innerhalb von Sekunden nach Stressor-Perzeption dort entlassen. Durch das Portal-Blut-System gelangen beide Hormone in die Adenohypophyse und stimulieren synergistisch die Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Weitere stress-induzierte Mediatoren aus der Hypophyse sind die beiden Proopiomelanocortin (POMC)-Derivate Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) und β -Endorphin, sowie Noradrenalin, das in den A1/ A2 - Zentren des *Locus caeruleus* im Hirnstamm produziert wird (7, 9). ACTH gelangt über den Blutkreislauf des Körpers zur

Nebennierenrinde und bewirkt innerhalb von wenigen Minuten einen Entlass von Glucocorticoiden (*glucocorticoid*, GC) aus der *Zona fasciculata* in den Blutkreislauf. Nach kürzester Zeit (mehrere Minuten) bewirken GC auf mehreren Ebenen im Gehirn mittels Glucocorticoid- (GR) und Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR) ein negatives Feedback bzgl. ihrer eigenen Produktion (10). Das häufigste natürliche GC im Menschen ist durch Cortisol vertreten, wohingegen Nager hauptsächlich Corticosteron produzieren.

Im Folgenden werden weitere physiologische Wirkungen durch Stress aufgeführt: Stress stimuliert die Aufmerksamkeit und unterdrückt den Schlaf, er erhöht die Herzaktivität, den arteriellen Blutdruck und induziert Glukoneogenese, Glykogenolyse, Lipolyse und die Sekretion von Glukose aus der Leber (7). Wachstums-Hormone sind auf mehreren Ebenen durch Stress-Mediatoren inhibiert, währenddessen Östrogen und Schilddrüsen-Hormone das Stress-System stimulieren (7). Die Tätigkeit des Magens ist durch den Vagus-Nerv gehemmt, wohingegen der Dickdarm durch das sakrale parasympathische Nervensystem stimuliert wird.

In Bezug auf die Wirkdauer des Stressors unterscheidet man zwischen kurz wirkendem akuten Stress und lang anhaltendem chronischen Stress. Akuter Stress wird als die Periode definiert, die Minuten bis Stunden andauert, wohingegen chronischer Stress mehrere Stunden pro Tag in einem Zeitraum von Wochen und Monaten einwirkt.

1.4 Krankheiten bedingt durch akuten und chronischen Stress

Neben einer positiven Wirkung von Stress gibt es auch negative Seiten. Akut und/oder chronisch einwirkende Stressmediatoren induzieren auch Abnormalien und Krankheiten. So wurde gezeigt, dass akuter Stress allergische Krankheiten wie Asthma, Ekzeme oder Nesselsucht, angiokinetische Phänomene wie Migräne, arterielle Hypertonie oder Hypotonie, unterschiedliche Arten von Schmerz, gastrointestinale Symptome sowie Panikattacken und Psychosen bedingt (7). Chronischer Stress kann physische, Verhaltens- und neuropsychiatrische Symptome verursachen. Beschrieben sind: Angst, Depression, exekutive und kognitive Fehlfunktionen, kardiovaskuläre Phänomene wie Hypertonie, metabolische Störungen wie Fettleibigkeit, das metabolische Syndrom und Typ 2 Diabetes mellitus, arteriosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen, neurovaskuläre degenerative Erkrankungen, Osteopenie und Osteoporose sowie Schlafstörungen wie Schlaflosigkeit oder exzessive Tagesmüdigkeit (7).

1.5 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist im Laufe seines Lebens zahlreichen äußerlichen und innerlichen Herausforderungen ausgesetzt, die seiner Gesundheit schaden können. Dazu zählen chemische und physikalische Einflüsse, aber auch zahlreiche Mikroorganismen wie

Bakterien, Pilze und Viren. Um die innere Homöostase des Körpers zu wahren, entwickelte sich im Lauf der Evolution unser Immunsystem. Das Immunsystem kann konzeptmäßig in zwei Teile aufgetrennt werden: Das ist zum einen das angeborene Immunsystem, das schnell und stereotypisch auf eine große Anzahl von Stimuli reagiert, und zum anderen das erworbene Immunsystem, das zeitverzögert antigenspezifisch reagiert. Das gesamte Immunsystem ist ein intrinsisches Netzwerk aus Zellen und Molekülen, die miteinander agieren, um die Gesundheit des Körpers aufrecht zu erhalten.

1.6 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht zellulär aus Phagozyten wie dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen (NK), Mastzellen sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten (11). Lösliche Moleküle sind das Komplement-System, Akut-Phase-Proteine, Zytokine und Chemokine. Epithelien des Körpers bilden eine Barriere, um äußere Einflüsse auf den Körper zu verhindern. Dringen jedoch Pathogene wie Bakterien durch das Epithel in das Gewebe ein, werden schnell unspezifische Phagozyten mobilisiert, die eingedrungene Schädlinge aufnehmen und zerstören sollen. Dabei erkennen Phagozyten Bakterien durch spezielle Rezeptoren, die sogenannten „*pattern recognition receptors*“ (PRR). Moleküle, die man häufig auf solchen Organismen vorfindet und die durch PRR erkannt werden, sind z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Mannose und Teichonsäure, die zu den „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMP) zählen. Nach der Erkennung von Pathogenen werden diese durch Phagozytose eliminiert. Dabei ist ein erster Schritt, dass Pathogene auf der Oberfläche von Phagozyten hängen bleiben und in Vesikel internalisiert werden. Das Phagosom verschmilzt mit dem Lysosom und das Pathogen wird verdaut. Peptide und Fragmente des Pathogens werden im Anschluss auf den „*major histocompatibility complex*“ (MHC) geladen und auf der Zelloberfläche des Phagozyten präsentiert.

1.6.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind darauf spezialisiert, Antigen zu fangen, es Lymphozyten zu präsentieren und stellen somit die Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. DC verweilen im Gewebe, wie der Haut, der Leber und im Darm, werden nach Antigenaufnahme aktiviert und wandern dann in Lymphknoten ein, um dort Antigen zu präsentieren (11).

1.6.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im Blut und haben eine bedeutende Aufgabe in der frühen Phase von inflammatorischen Reaktionen (11). Sie sind die ersten Immunzellen, die chemotaktisch durch Chemokine in entzündetes Gewebe gelockt werden. Interleukin (IL) 8 ist im Menschen ein wichtiges Chemokin, das

neutrophile Granulozyten ins Gewebe rekrutiert. Nach Aktivierung durch zahlreiche Stimuli wie z.B. Komplement-Proteine (C5a), Immun-Komplexe, Chemokine und Zytokine, degranulieren neutrophile Granulozyten und entlassen eine Vielzahl an lytischen Substanzen in ihre Umgebung. Man unterscheidet drei Klassen an Granula: erstens gibt es Zellen mit azurophilen Granula, in denen Myeloperoxidase (MPO), Defensine, Neutrophil-Elastase (NE) und Cathepsin G enthalten sind. Die zweite Kategorie sind solche Granula mit Mediatoren, die ausschließlich von Neutrophilen freigesetzt werden, wie z.B. Laktoferrin. Die letzte Kategorie an Granula enthalten vor allem Gelatinasen und Cathepsine. Ein weiterer Mechanismus von neutrophilen Granulozyten, um extrazelluläre Bakterien zu eliminieren, ist die Bildung von sogenannten „*neutrophil extracellular traps*“ (NET). Die Bildung von NETs ist der letzte Mechanismus eines neutrophilen Granulozyten, bei dem er meist selbst stirbt. Nach der Freisetzung von Substanzen aus den Granula „explodiert“ die Zelle und NETs werden aus DNA-Bestandteilen und Substanzen aus den Granula gebildet und fangen Bakterien damit ein. Die Lebenszeit eines Granulozyten ist in der Regel sehr kurz und beträgt in etwa acht Stunden, danach geht er in Apoptose und stirbt.

1.6.3 Makrophagen

Monozyten und Makrophagen sind mit etwa drei bis acht Prozent im Blut vertreten. Sie sind effiziente Phagozyten und eliminieren Pathogene und Zellschrott (11). Makrophagen bilden die zweite Welle an Leukozyten, die in entzündetes Gewebe einwandert, um u.a. tote neutrophile Granulozyten und NETs zu entsorgen. Makrophagen sind potente Zytokin-Produzenten und produzieren u.a. pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und „*tumor necrosis factor*“ (TNF). Weiterhin sind sie in der Lage, „*reactive oxygen species*“ (ROS) sowie durch „*inducible nitric oxide synthase*“ (iNOS) das Radikal „*nitric oxide*“ (NO) zu bilden.

1.6.4 Natürliche Killerzellen (NK)

NK-Zellen sind mit etwa fünf bis 20 Prozent aller mononukleären Zellen im Blut vertreten (11). Sie sind wichtige Faktoren für das unspezifische Lysieren von virus-, bakterien- und protozoen-befallenen Zellen sowie von Tumorzellen. NK-Zellen töten jede Zelle, die eine fremde MHC-Klasse I (MHC I) bzw. keinen oder einen niedrigen Grad an MHC I-Expression besitzt, so wie es bei Tumorzellen und virus-befallenen Zellen der Fall ist. Durch einen speziellen inhibitorischen Rezeptor („*killer cell immunoglobulin-like receptor*“ (KIR)) erkennt eine NK-Zelle MHC I und wird in einem nicht-aktivierten Zustand gehalten. Kommt es jedoch zur Aktivierung einer NK-Zelle durch einen fremden MHC, lysiert sie die erkannte Zelle durch Perforine, die Löcher in der Membran der zur zerstörenden Zelle bilden.

1.6.5 Mast-Zellen

Mast-Zellen sind praktisch nicht im Blut, sondern hauptsächlich im Gewebe zu finden, wo sie eine wichtige Rolle in akuten Entzündungsreaktionen dadurch spielen (11), dass sie in allergischen Reaktionen Substanzen aus ihren Granula freisetzen (sie „degranulieren“). Ihre Granula enthalten vasoaktive Amine, Proteasen, Heparin, IL-4, TNF und „*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“ (GM-CSF). Solche Substanzen induzieren die Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ins entzündete Gewebe, erhöhen die vaskuläre Permeabilität und die Schleimsekretion, ebenso die gastro-intestinale Beweglichkeit und die Bronchiokonstriktion, die erste Anzeichen und Symptome für Allergie und Anaphylaxie sind.

1.6.6 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten sind mit ungefähr einem Prozent der Leukozyten im Blut vertreten und normal nicht im Gewebe zu finden. In entzündetes Gewebe können sie dennoch rekrutiert werden und sie entlassen ähnliche Substanzen aus ihren Granula wie Mast-Zellen (11).

1.6.7 Eosinophile Granulozyten

Granulozyten und eosinophile Granulozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr von Parasiten wie Würmern (Helminthen) (11). Eine weitere wichtige Funktion spielen sie in allergischen Reaktionen und Asthma. Eosinophile Granulozyten speichern eine große Anzahl an proteolytischen Granula und wandern durch das Blut an Epithelien, wie die der Lunge oder des Darms. Sie besitzen spezielle Rezeptoren, die Immunglobulin E (IgE) an seinem konstanten Teil erkennen, dem Fc ϵ RI. IgE (oder IgA), welches an Pathogenen gebunden ist, wird durch eosinophile Granulozyten erkannt, woraufhin diese lytische Bestandteile aus ihren Granula entlassen, um die Pathogene zu eliminieren. Weitere Mediatoren sind Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 und TNF, Leukotriene und Prostaglandine. Durch Freisetzung von Elastase-Enzymen, dem Wachstumsfaktor „*tissue growth factor β* “ (TGF β), dem Plättchen-Wachstumsfaktor „*platelet derived growth factor*“ (PDGF) und dem Gefäß-Wachstumsfaktor „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) fördern eosinophile Granulozyten die Wiederherstellung des Gewebes.

1.7 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene spezifisch zu eliminieren, und grenzt sich vom angeborenen Immunsystem durch seine Spezifität ab. Zelluläre Bestandteile des erworbenen Immunsystems sind T-Zellen, B-Zellen, NK/T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (APC) wie DC (12). Lösliche Bestandteile sind Antikörper (Immunglobuline). T- und B-Zellen stammen von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab und entwickeln sich zu reifen T- und B-Zellen. Vorläufer von T-Zellen

entstehen im Knochenmark, wandern in den Thymus ein und reifen zu T-Lymphozyten heran. Vorläufer von B-Zellen reifen im Knochenmark heran und werden als B-Lymphozyten in den Blutkreislauf entlassen.

1.7.1 B-Lymphozyten

Reife, naive B-Lymphozyten tragen auf ihrer Membran IgD und IgM und erfüllen die Aufgabe der Antigenerkennung (12). Immunglobuline bestehen aus jeweils zwei schweren und zwei leichten Ketten, die mit Disulfid-Brücken verbunden sind. Es gibt fünf Typen von schweren Ketten, die die Immunglobulin-Klasse definieren: α , γ , δ , ϵ und μ . Die daraus resultierenden Klassen sind IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. IgA findet man vor allem an Epithelien wie in der Lunge und im Gastro-Intestinal-Trakt. Weiterhin findet man es in der Muttermilch, in der Tränenflüssigkeit und im Speichel. IgD sitzt membranständig auf B-Lymphozyten und ist Teil des B-Zell-Rezeptors („*B cell receptor*“ BCR) von naiven B-Lymphozyten. IgE ist, wie zuvor erwähnt, beteiligt an allergischen Reaktionen und der Parasiten-Abwehr. IgG ist das Haupt-Immunglobulin in der erworbenen Immunität und besitzt die Fähigkeit, die Barriere der Plazenta zu überwinden. IgM ist genau wie IgD Teil des naiven BCR und befindet sich in der frühen Phase einer Immunreaktion im Serum.

1.7.2 B-Zell-Differenzierung

Die Reifung eines B-Lymphozyten beginnt mit einer Pro-B-Zelle, die drei wichtige Gene exprimiert: TdT, RAG1 und RAG2, welche die Gen-Rekombination bewirken (12). Eine solche Rekombination erfüllt den Sinn, mit einer beschränkten Anzahl an Genen eine Fülle an Spezifitäten mehrerer Immunglobuline zu erstellen. Zunächst wird die schwere Kette gebildet, in der zufällig D- (*diversity*) und J- (*joining*) Segmente rekombinieren und schließlich ein V- (*variable*) Segment binden. Der Mechanismus dieser Rekombination ist, dass das Genom Schlingen zwischen den verschiedenen D- und J- Segmenten bildet und selektiv Bereiche aus dem Genom ausgeschnitten werden. Die schwere Kette wird mit der invarianten Kette an der Oberfläche zusammen mit Ig α und Ig β exprimiert und bildet den Pre-BCR. Nach der Rekombination der leichten Kette wird die λ -Kette rekombiniert und nach Bildung eines kompletten IgM reift die B-Zelle und produziert ein membrangebundenes IgD. Die Reifung zu dieser Pre-B-Zelle findet antigenunabhängig im Knochenmark statt. Die Rekombination von schwerer und leichter Kette bringt etwa 10^{11} verschiedene Spezifitäten zustande. Um eine solch hohe Anzahl an Spezifitäten zu reduzieren bzw. zu spezialisieren, wird durch Positiv- und anschließend durch Negativ-Selektion die Anzahl an unterschiedlich spezifischen B-Zellen minimiert. In der vorhergehenden Positiv-Selektion erhalten B-Zellen mit einem funktionellen, membrangebundenen Ig-Molekül ein Überlebenssignal und reifen weiter. In der darauffolgenden Negativ-Selektion erhalten solche Zellen, die eine zu hohe Affinität gegen Selbst-Antigen haben, ein negatives Signal und gehen in Apoptose, den

programmierten Zell-Tod. Übrig bleiben solche Zellen, die einen funktionellen BCR tragen, der nur moderat Selbst-Antigen erkennt und bindet. Eine B-Zelle reift im Knochenmark bis zu einem unreifen Stadium, wo sie IgM an ihrer Oberfläche exprimiert, heran und verlässt dieses, um in der Milz zu einem reifen B-Lymphozyten heranzureifen.

1.7.3 B-Zell-Aktivierung

Die Hauptaufgabe von B-Zellen ist es, spezifische Antikörper/ Immunglobuline gegen Pathogene zu produzieren, die solche opponisieren, neutralisieren und zerstören (12). Dafür bedarf es zunächst einer Aktivierung von B-Zellen, um zu proliferieren und schließlich zu einer Plasma-Zelle zu differenzieren, die hoch-affine Antikörper produziert. Antigen (z.B. Pathogene) zu binden, ist die Hauptaufgabe des BCR. Durch die Bindung von Antigen an dem BCR kommt es intrazellulär zu einer Signal-Kaskade, die in der Expression von Genen endet, die an der Proliferation beteiligt sind. Nach Internalisierung des BCR und Prozessierung des Antigens besitzen B-Zellen eine Funktion schwacher antigenpräsentierender Zellen. Sie präsentieren in der Folge Antigen den T-Helfer (T_H)-Zellen, das sie auf MHC II geladen haben, der mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) interagiert. Dies führt dazu, dass T_H -Zellen Zytokine produzieren, die B-Lymphozyten proliferieren und differenzieren lassen. Bestandteile des Komplement-Systems, die an Pathogenen gebunden sind, geben ein zweites Signal an die B-Zelle. Diese werden von Komplement-Rezeptoren („complement receptor“ CR) erkannt und verstärken die humorale Immunantwort (flüssigkeitsvermittelte Antikörperproduktion).

1.7.4 T-Zell-abhängige Immunantwort

In der T-Zell-abhängigen Immunantwort bedarf es Co-Stimulation durch T_H -Zellen (12). T_H -Zellen exprimieren die co-stimulatorischen Moleküle „cluster of differentiation 28“ (CD28) und CD40L auf ihrer Oberfläche und interagieren mit B7 und CD40, das auf B-Zellen zu finden ist. Diese Interaktion steigert die Aktivierung von B-Lymphozyten und induziert die Produktion von zahlreichen Zytokinen. Nach der Interaktion zwischen CD40L und CD40 kommt es zum Klassenwechsel des Immunglobulins, bei der die schweren Ketten von IgM oder IgD zu IgG, IgA oder IgE wechseln. Dabei bleibt die variable Domäne unverändert und die Spezifität des Immunglobulins bleibt die gleiche. Nach dem Klassenwechsel kommt es zur Affinitätsreifung, in der hoch-spezifische B-Lymphozyten selektiert werden. Zu Beginn einer Immunantwort gibt es eine Vielzahl an schnell Antikörper produzierenden B-Lymphozyten mit sowohl niedriger als auch hoher Spezifität. Durch somatische Hypermutation kommt es zu einer gesteigerten Mutationsrate im Genom für Immunglobuline und nur solche B-Lymphozyten, die durch diesen Mechanismus hoch-affine Immunglobuline mit starker Bindung produzieren, erhalten ein positives Überlebenssignal. Im Anschluss wandern Antikörper produzierende Plasmazellen sowie Gedächtnis-B-Zellen in das

Knochenmark ein und können, nach einer zweiten Exposition mit bekanntem Antigen, schnell hoch-affine Antikörper produzieren.

1.7.5 T-Zell-unabhängige Immunantwort

In der T-Zell-unabhängigen Immunantwort wird Antikörper-Produktion in Abwesenheit von T-Zellen induziert (12). Dabei entstehen jedoch Antikörper mit einer geringen Affinität. Die Antigene sind meist keine Proteine, sondern polymere Moleküle wie z.B. bakterielle Polysaccharide, die die Funktion haben, Bakterien zu bekapseln.

1.8 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten reifen bis zu einem Stadium einer Pre-T-Zelle im Knochenmark heran, verlassen dieses und wandern durch das Blut in den Thymus, um dort zu einer reifen T-Zelle zu differenzieren (12). Zu diesem Zeitpunkt haben sie noch keinen TCR und tragen weder CD4 noch CD8. Der TCR wird fast mit dem gleichen Mechanismus re-arrangiert wie der BCR. Der TCR besteht in der Regel aus einer α - und β - Kette und bildet einen $\alpha\beta$ -TCR. $\gamma\delta$ -T-Zellen zeichnen sich durch einen $\gamma\delta$ -TCR aus, die jedoch nur zu einem kleinen Teil vertreten sind. Bei der Bildung des TCR wird zuerst die β -Kette re-arrangiert, diese assoziiert mit der Pre- α -Kette, welche im Folgenden re-arrangiert wird. In der nächsten Phase der Reifung einer T-Zelle sind sie doppel-positiv für CD4 und CD8 und unterlaufen eine Positiv-Selektion. Sie migrieren dabei vom Cortex zum Mark des Thymus und nur solche erhalten ein Überlebenssignal, die Selbst-Antigen erkennen, welches von Epithel-Zellen im Thymus auf einem MHC-Molekül präsentiert wird. Zellen, die nicht den Selbst-MHC erkennen, gehen durch Fehlen eines Stimulus in Apoptose. Je nachdem, ob eine T-Zelle Antigen von einem MHC I oder MHC II präsentiert bekommt, differenziert sie zu einer CD8 $^{+}$ -oder zu einer CD4 $^{+}$ -T-Zelle. In einer nachfolgenden Negativ-Selektion wandern einfach-positive T-Zellen weiter in das Mark des Thymus und bekommen von professionellen APC wie Makrophagen oder DC Selbst-Antigen präsentiert. Solche T-Zellen, die zu stark mit dem MHC-Komplex interagieren, sterben durch Apoptose. Lediglich fünf Prozent der T-Zellen, die in den Thymus als unreife T-Zelle eingewandert sind, verlassen diesen als reife und naive T-Zelle.

1.8.1 T_H-Zellen

T_H-Zellen sind CD4 $^{+}$ - $\alpha\beta$ -TCR-tragende T-Zellen, die in drei Hauptklassen unterteilt werden können, nämlich in T_H1, T_H2 und T_H17 (12). T_H1-Zellen sind pro-inflammatorisch, begünstigen demnach Entzündungsreaktionen, produzieren in großen Mengen IL-2, welches die Proliferation von T-Zellen begünstigt, sowie IFN γ , welches Makrophagen aktiviert. Die T_H1-Immunkontakt-Antwort ist somit kritisch für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene. T_H2-Lymphozyten wirken anti-inflammatorisch, produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, die die Antikörper-Produktion von B-Zellen stimulieren. T_H2-Zellen spielen eine Rolle in allergischen

Reaktionen, indem z.B. IL-4 den Klassenwechsel zu IgE begünstigt, wohingegen IL-5 eosinophile Granulozyten aktiviert. T_{H17} -Zellen sind wie T_{H1} -Lymphozyten proinflammatorisch und spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von extrazellulären Mikroorganismen. T_{H17} -Zellen zeichnen sich ferner dadurch aus, IL-17 und IL-22 zu produzieren, während ihre Differenzierung durch IL-23 begünstigt wird.

1.8.2 Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen

CD8⁺-T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr von virusbefallenen und Tumorzellen (12). Mediatoren von CD8⁺-T-Zellen sind Perforine, Granzyme und die Expression von FasL, welches andere Zellen, die einen Fas-Rezeptor tragen, in Apoptose schickt.

1.9 Regulatorische T-Zellen (T_{Reg})

Immunreaktionen, induziert von Pathogenen, Mikroorganismen und weitere Stimuli besitzen primär die Funktion, den Verursacher dieser Reaktion zu beseitigen. Um jedoch eine überschießende Immunreaktion zu verhindern, bedarf es regulatorischer Mechanismen. Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) sind eine von mehreren existierenden immunregulierenden Zell-Typen. Die Beschreibung solcher Zellen geht auf das Jahr 1995 zurück, wo Shimon Sakaguchi CD4⁺CD25⁺-Zellen mit suppressiver Funktion beschreibt, die Autoimmunität verhindern (13). Im Verlauf der Zeit ist unser Wissen über diese Zell-Population enorm gestiegen und wir kennen eine Vielzahl an Markern und Funktionen von T_{Reg} , die verschiedene Unterpopulationen diskriminieren. CD4⁺CD25⁺-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor „forkhead box protein 3“ (FoxP3) und bilden eine eigene Zellpopulation, die aus dem Thymus von Mäusen und Menschen entspringt und folglich natürliche T_{Reg} (nT_{Reg}) genannt werden (14). Es zeigte sich, dass T_{Reg} den Verlauf von Autoimmunität unterbinden, eine wichtige Rolle in der Toleranzbildung gegen Allo-Antigene nach Transplantation spielen, sowie allergische Immun-Antworten modulieren. nT_{Reg} besitzen die Fähigkeit, die Aktivierung und Funktionen von Effektor-T-Zellen (T_{Eff}), APC, DC und B-Zellen zu unterdrücken. Weiterhin zeichnen nT_{Reg} sich durch einen hypoproliferativen Status nach TCR/CD3-Stimulation aus, welcher durch hohe Dosen an IL-2 und Co-Stimulation aufgehoben werden kann. Zur Fähigkeit, Proliferation und Zytokin-Produktion von T_{Eff} zu unterdrücken, bedarf es direkten Zell-Zell-Kontakts. nT_{Reg} besitzen ein breites Spektrum an $\alpha\beta$ -TCRs, die gegen Selbst- und Fremd-Antigen gerichtet sind. Bemerkenswert ist hierbei, dass der TCR von nT_{Reg} eine höhere Affinität für den MHC II/Peptid-Komplex besitzt als T_{Eff} -Zellen.

1.9.1 Marker für murine T_{Reg}

Im Lauf der Zeit, nach der Entdeckung von CD4⁺CD25⁺-Zellen mit immun-regulatorischer Funktion, wurden weitere Marker gefunden, die solche Zellen näher charakterisieren (14). CD25 ist ein Oberflächenmarker, der den IL-2-Rezeptor beschreibt. CD25 ist aber nicht ein

exklusiver Marker für T_{Reg} . CD25 wird auch auf aktivierten T_{Eff} hoch-reguliert. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist der am weitesten akzeptierte Marker für nT_{Reg} . „*cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4*“ (CTLA4; CD152) und „*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor*“ (GITR) sind zwei weitere bedeutende Marker für nT_{Reg} . CTLA4 ist ein strukturelles Homolog des Co-Stimulations-Rezeptors CD28 und bindet die beiden Haupt-Co-Stimulations-Moleküle CD80/CD86 auf APCs. Dieser Mechanismus ist essenziell für den suppressiven Wirkmechanismus von nT_{Reg} . GITR gehört zu der TNF-Superfamilie und man nimmt an, dass er als Co-Stimulation-Rezeptor auf T-Zellen fungiert. Viele Berichte beschreiben GITR als negativen Regulator für T_{Reg} -Funktionen (15).

Die IL-7-Rezeptor- α -Kette (CD127) ist ein Negativ-Marker für nT_{Reg} . nT_{Reg} sind somit CD127 $^-$. Die aktuell beste Marker-Kombination für nT_{Reg} ist CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$ CD127 $^-$, zusammen mit dem suppressiven Status *in vitro*, und gilt aktuell als der „Gold-Standard“, um nT_{Reg} zu charakterisieren. CD62L- dient als Marker für naive T-Zellen und kann als positiver Marker für nT_{Reg} verwendet werden.

„*Programmed death-1*“ (PD-1) ist wie CTLA4 ein CD28-Homolog mit den Liganden PD-L1 und PD-L2. Die Expression von PD-1 auf der Zelloberfläche von T-Zellen wird durch Aktivierung hoch-reguliert. Aktivierte T_{Eff} -Zellen, die ebenfalls wie nT_{Reg} CD4 $^+$ CD25 $^+$ sind, können durch Verwendung des PD-1-Markers unterschieden werden. Un-stimulierte (via TCR) nT_{Reg} lagern intrazelluläres PD-1 und tragen somit kein PD-1 auf ihrer Zelloberfläche. Somit unterscheidet man un-stimulierte CD4 $^+$ CD25 $^+$ PD-1 $^+$ T_{Eff} - von CD4 $^+$ CD25 $^+$ PD-1 $^-$ nT_{Reg} -Zellen.

Zwei im Jahre 2007 erwähnte Marker für T_{reg} beschreiben zum einen die „*Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*“ (CD39) und zum anderen die „*Ecto-5'-nucleotidase*“ (CD73), die beide auf nT_{Reg} stark exprimiert werden.

„*Homing-associated cell adhesion molecule*“ (H-CAM; CD44) ist ein Marker, um innerhalb der CD4 $^+$ CD25 $^+$ nT_{Reg} funktionell unterschiedliche Populationen zu unterscheiden. Dabei korreliert der Grad an CD44 (*low*, *intermediate* oder *high*) positiv mit ihrer suppressiven Aktivität: CD4 $^+$ CD25 $^+$ CD44 high nT_{Reg} zeigten dabei den höchsten Grad an suppressiver Aktivität, die hauptsächlich durch das anti-inflammatorische IL-10 vermittelt wird.

„*Latency-associated peptide*“ (LAP) ist die amino-terminale Domäne des „*transforming growth factor- β* “ (TGF- β)-Vorläufer-Peptides, das nach Abspaltung nicht-kovalent an dem TGF- β -Protein gebunden ist. LAP ist ein weiterer Marker, der analog CD44 positiv mit der suppressiven Wirkung von CD4 $^+$ CD25 $^+$ nT_{Reg} korreliert.

Weitere Marker, von denen nur wenig Daten vorhanden sind, wären: die α_E -Integrin-Untereinheit (CD103), „*lymphocyte activation antigen-3*“ (LAG-3), „*glycoprotein A repetitions predominant*“ (GARP), Gallektin1, Gallektion10, TNF-Superfamilien-Mitglied 25 (TNFRSF25; DR3) und der Transkriptionsfaktor HELIOS. HELIOS ist ein Transkriptionsfaktor, der ausschließlich in nT_{Reg} und nicht in induzierten T_{Reg} (iT_{Reg}) exprimiert wird.

1.9.2 Effektor-Mechanismen von nT_{Reg}

Der suppressive Wirk-Mechanismus von nT_{Reg} ist durch direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt, wie in Experimenten mit Kulturplatten mit einer semi-permeablen Membran *in vitro* gezeigt wurde (14, 16). Der potenteste suppressive Mechanismus besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit aus CTLA4 aus der B7-Superfamilie. CTLA4 konkurriert mit CD28 auf T_{Eff} -Zellen um den Kontakt mit CD80 und CD86. CD28 unterliegt auf Grund der überragenden Affinität von CTLA4, dadurch fehlt T_{Eff} -Zellen die Aktivierung und sie werden anerg. Der suppressive Mechanismus von CTLA4 erscheint zweifach: Zum einen ligiert CTLA4 auf nT_{Reg} mit CD80/CD86 auf aktivierte T-Zellen und vermittelt ein inhibitorisches Signal direkt auf T_{Eff} -Zellen. Und zum anderen supprimieren nT_{Reg} indirekt T_{Eff} -Zellen, indem sie APC modulieren. CTLA4 verhindert die Reifung von DC, reguliert die Expression von CD80/CD86 auf DC herunter und induziert die Expression des Enzyms „*indoleamine-2,3-desoxygenase*“ (IDO) in DC. IDO ist ein Schlüssel-Enzym im Tryptophan-Metabolismus, welches Tryptophan in Formylkynerinin umwandelt, welches ein stark suppressives Agens ist.

LAG-3 ist ein Molekül auf nT_{Reg} , das nach Interaktion mit dem MHC II auf DC die co-stimulatorischen Moleküle CD80/CD86 herunterreguliert.

Das Ig-ähnliche Typ I-Transmembran-Protein CD83 mit bisher unbekanntem Rezeptor ist ein weiteres immunsuppressives Molekül, das direkt durch Zell-Zell-Kontakt suppressiv wirkt.

Abgesehen von oberflächlichen Mediatoren auf nT_{Reg} spielen Zytokine eine bedeutende Rolle. IL-10 ist hierbei das wichtigste anti-inflammatorische Zytokin, welches T_H1 -Zytokine wie TNF, IL-1, IL-12 sowie IFN γ von APC unterdrückt. Weiterhin aktiviert es Mast-Zellen sowie die Zytokin-Produktion von eosinophilen Granulozyten und besitzt direkte suppressive Aktivität auf T-Zell-Proliferation. TGF- β sowie IL-35, produziert von nT_{Reg} , sind nach IL-10 weitere anti-inflammatorische Zytokine und induzieren regulatorische Fähigkeiten in naiven T-Zellen, die auch als iT_{Reg} bekannt sind.

nT_{Reg} exprimieren Granzym A und B sowie Perforin und besitzen somit die Fähigkeit, andere Zellen direkt durch Lyse zu töten.

Neben CTLA4 gibt es einen weiteren bedeutenden suppressiven Mechanismus, nämlich den der Depletion von Zytokinen, Nährstoffen und der Veränderung des Mikro-Milieus. Aufgrund

ihrer hohen Expression an CD25 haben nT_{Reg} einen hohen Konsum an IL-2 und „fressen“ buchstäblich das Wachstums-Zytokin den T_{Eff} -Zellen „vor der Nase weg“. CD39 und CD73 sind zwei Ektoneukleasen, die *Adenosin Triphosphate* (ATP) in Adenosin umwandeln. Adenosin bindet an den $A_{2A}R$ -Rezeptor von T-Zellen und steigert intrazelluläres „*cyclic Adenosin Monophosphate*“ (cAMP, ein second messenger). Weiterhin ist bekannt, dass nT_{Reg} konstitutiv hohe Mengen intrazellulären cAMPs exprimieren und dies direkt mittels „*gap junctions*“ in T_{Eff} -Zellen übertragen können.

Zystein ist eine essentielle Aminosäure für T-Zellen. T-Zellen sind selbst nicht in der Lage, Cystin zu Cystein zu reduzieren, und sind auf APC angewiesen. Cystin existiert hauptsächlich als extrazelluläre Form, kann nicht von T-Zellen aufgenommen werden und daher sind T-Zellen auf DC angewiesen, die Cystein sezernieren. T_{Reg} sind in der Lage, diese Funktion in DC zu unterbinden, und supprimieren somit indirekt T_{Eff} -Funktionen.

1.10 Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen („*myeloid derived suppressor cells*“; MDSC) beschreiben eine Zellpopulation von unreifen, myeloiden Zellen, die wie T_{Reg} immunregulatorisch agieren können. Beschrieben wurden diese Zellen Ende der 1970er Jahre als natürliche Suppressor (NS)-Zellen mit der Eigenschaft, die Proliferation von T-Zellen nach Mitogen- oder Allo-Antigen-Stimulation zu inhibieren (17). Von diesen Zellen nahm man an, dass sie für die Bildung von Toleranz und Immunsuppression gegenüber Tumoren verantwortlich sind. Weitere Namen waren „*veto*“- oder „*null*“- Zellen, die keine Marker für reife T-, B- und NK-Zellen oder Makrophagen auf ihrer Oberfläche tragen (18). Erste Marker, die diese Zellen charakterisieren, waren CD34, Glutathione-Reduktase (GR-1) und CD11b. Weiterhin zeigte sich, dass nicht nur Tumor-Wachstum diese Zellen expandieren lässt, sondern auch die Gabe von haematopoetischen Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und „*granulocyte- colony-stimulating factor*“ (G-CSF). Im Lauf der Zeit bildete sich eine diverse Nomenklatur und diese beschreibt diese Zellen u.a. als „*immature myeloid cells*“ (IMC), MDSC und GR-1⁺ myeloide Zellen, die eine distinkte Population von Monozyten und Granulozyten darstellen. Im Jahr 2007 einigte man sich auf den Namen MDSC (19). Viele Studien verdeutlichten die Heterogenität von MDSC, jedoch kristallisierten sich mit der Expression der Marker Ly-6C und Ly-6G zwei Hauptpopulationen heraus. Das ist zum einen eine CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{high}-Population mit einer mit Monozyten vergleichbaren Morphologie, die „*monocytic-MDSC*“ (MO-MDSC) benannt wurde, und zum anderen eine granulozytäre Form, die CD11b⁺ Ly-6G⁺ Ly-6C^{low/int} ist und als „*granulocytic-MDSC*“ (G-MDSC) bzw. als „*polymorphonuclear-MDSC*“ (PMN-MDSC) bezeichnet wird (18, 20, 21). Die Bezeichnungen G-MDSC und PMN-MDSC sind dabei gleichwertig und beschreiben dieselbe Zellpopulation. Im tumorerkrankten Menschen wurden PMN-MDSC als CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺ CD66b⁺ „*vascular endothelial*

growth factor" (VEGF)-Rezeptor 1 (VEGFR1)⁺ -Zellen charakterisiert, wohingegen MO-MDSC als CD14⁺ CD11b⁺ „*human leukocyte antigen DR*“ (HLA-DR)^{low/-} beschrieben sind (21).

1.10.1 Eigenschaften von MDSC

PMN- und MO-MDSC wurden in vielen Tumormodellen an Mäusen untersucht und dabei zeigte sich, dass PMN-MDSC die zahlenmäßig dominante Zellpopulation darstellt, wobei sie jedoch weniger suppressiv als MO-MDSC ist (21). PMN-MDSC supprimieren antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen vor allem durch ROS, wohingegen MO-MDSC durch die Enzyme Arginase1 (ARG1), iNOS und durch die Produktion von „*reactive nitrogen species*“ (RNS) CD8⁺ T-Zellen supprimieren. PMN-MDSC und neutrophile Granulozyten ähneln sich morphologisch sehr, sind aber funktionell und phänotypisch unterschiedlich. PMN-MDSC sind im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten immun-suppressiv, exprimieren höhere Level an CD115 und CD244, geringere Mengen des CXC-Chemokinrezeptors 1 (CXCR1) und CXCR2 und sind weniger phagozytotisch. Im Weiteren exprimieren PMN-MDSC höhere Mengen an ARG1, MPO, ROS, und zeigen geringere Chemotaxis (21). Analog teilen MO-MDSC und inflammatorische Monozyten einen ähnlichen Phänotyp und eine ähnliche Morphologie, sind jedoch funktionell unterschiedlich. MO-MDSC sind im Vergleich zu inflammatorischen Monozyten stark immun-suppressiv und exprimieren hohe Mengen an iNOS und ARG1. iNOS agiert mit anderen Enzymen von MDSC wie ARG1 und NADPH-Oxidase, welches die Produktion von Peroxynitrit begünstigt, das wiederum Proliferation, Effektor-Funktionen und Migration von T-Zellen unterdrückt.

1.10.2 Immunmodulatorische Funktionen von MDSC

MDSC produzieren eine ganze Bandbreite an Mediatoren, die das angeborene und erworbene Immunsystem beeinflussen (21). Man kann die Mechanismen in vier Klassen unterteilen:

Die erste Klasse beinhaltet solche, welche essentielle Nährstoffe für Lymphozyten depletieren. L-Arginin wird durch ARG1 in Ornithin und Harnstoff zersetzt, wohingegen L-Cystein von MDSC verbraucht oder degradiert wird. Das Entfernen dieser Nährstoffe aus der Mikroumgebung von T-Zellen reguliert die ζ -Kette des TCR-Komplexes herunter und T-Zellen gehen in einen proliferativen Arrest und können nicht durch Antigen aktiviert und stimuliert werden.

Der zweite Mechanismus-Typ ist die Bildung von oxidativem Stress durch die Bildung von ROS und RNS. Das Resultat der gebildeten Produkte sind Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid, die auf mehreren molekularen Ebenen T-Zellen blockieren. Effekte dieser Mediatoren sind der Verlust der ζ -Kette des TCR, sie beeinflussen darüber hinaus die IL-2 Rezeptoren (CD25) durch Nitrierung und führen schließlich zu deren Internalisierung.

Der dritte Typ beinhaltet Mechanismen, welche die Lymphozyten-Wanderung und die Lebensfähigkeit beeinflussen. MDSC exprimieren die Metalloproteinase „*disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17*“ (ADAM 17), welche CD62L (L-Selektin) auf naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen degradiert. Durch diesen Verlust verlieren T-Zellen die Fähigkeit in Lymphknoten einzuwandern. Ein weiteres Beispiel ist die Modifikation von CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2) durch Peroxynitrit (22). Das modifizierte CCL2 beeinflusst die Wanderung und Effektor-Funktion von CD8⁺ T-Zellen ins Tumor-Gewebe. MDSC exprimieren Galektin 9, welches das „*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*“ (TIM3) auf Lymphozyten bindet und Apoptose induziert.

Der vierte Typ an Mechanismen besteht in der Aktivierung von T_{Reg}. MDSC fördern die Expansion von antigen-spezifischen nT_{Reg} und induzieren die Umwandlung von naiven CD4⁺ T-Zellen in iT_{Reg}. Die genauen Mechanismen sind jedoch bis dato unbekannt.

Abgesehen davon, dass MDSC T-Zell-Funktionen unterbinden können, ist auch bekannt, dass sie Makrophagen und DC in ihrer Funktion beeinflussen (21). MDSC sind in der Lage, durch Produktion von IL-10 M1-Makrophagen, die pro-inflammatorisch durch Produktion von IL-12 agieren, in alternative anti-inflammatoryische M2-Makrophagen umzuwandeln, welche selbst IL-10 produzieren. Ferner inhibiert MDSC-IL-10 T-Zell-Aktivierung durch DC. Vermittelt wird dies durch eine reduzierte Produktion von IL-12.

1.10.3 MDSC-Aktivierung und –Rekrutierung

Neoplastische Zellen und tumor-assoziierte Stroma-Zellen produzieren viele Mediatoren, die die Myelopoiese beeinflussen und MDSC generieren (21). Zum einen sezernieren sie Zytokine wie GM-CSF, G-CSF, VEGF, „*stem cell factor*“ (SCF) und IL-3, die einerseits Myelopoiese begünstigen und andererseits die Reifung von solchen Zellen hemmen. Weitere Mediatoren sind pro-inflammatorisch wie IL-1 β , IL-6, S100A8 und S100A9 sowie Zytokine von aktivierten T-Zellen wie „*Interferon Gamma*“ (IFN γ), IL-4, IL-10 und IL-13. All diese Faktoren begünstigen die Bildung von unreifen myeloiden Zellen, die weiter in MDSC differenzieren.

Nach Generierung von MDSC werden solche in das Tumor-Stroma durch Faktoren wie CCL2, CCL12, CXC Chemokin Ligand 5 (CXCL5), Prokinezin 2, S100A8 und S100A9 rekrutiert. Wie bereits oben beschrieben, werden CD8⁺ T-Zellen nicht durch nitriertes oder nitrosyierte CCL2 in das Tumor-Gewebe rekrutiert, um dort eine Anti-Tumor-Immunantwort zu induzieren, während MDSC dazu schon in der Lage sind (22). Resultat ist die selektive Anreicherung von myeloiden Zellen im Tumor-Gewebe.

1.11 Der Einfluss von Stress auf das Immunsystem

Im Lauf der Zeit kam man in wissenschaftlichen Untersuchungen immer mehr von der ursprünglichen Ansicht ab, dass Systeme im Körper funktionell getrennt sind. Vielmehr ist heute akzeptiert, dass unterschiedliche Systeme im Körper interagieren. So ist dies auch mit dem Nerven- und Immunsystem. Gängiger Konsens in der Literatur ist die Ansicht, dass akuter Stress, welcher zwischen Minuten und Stunden anhält, immunaktivierend ist, wohingegen chronischer Stress, der über Stunden und Tage anhält, immunsuppressiv ist (23). Es gibt vier Faktoren, die darüber entscheiden, ob Stress oder Stress-Hormone immunaktivierend oder immun-supprimierend wirken. Das ist zum einen die Dauer: akuter, kurz anhaltender Stress verstärkt Immun-Antworten, wohingegen chronisch-andauernder Stress solche unterdrücken. Der zweite Faktor ist der Effekt von Stress auf die Leukozyten-Verteilung. Bereiche im Körper können in einer akuten Stress-Situation mit Immun-Zellen angereichert sein, wohingegen diese bei chronischem Stress depletiert sind. Ein dritter Faktor ist der unterschiedliche Effekt, der von der Dosis an Glucokortikoiden abhängig ist. In physiologischen Dosen besitzen sie einen positiven Effekt auf das Immunsystem, wohingegen sie in pharmakologischen Dosen negative Wirkung besitzen. Ein letzter Faktor ist das Timing eines Stressors bzw. von Stress-Hormonen relativ zur Aktivierung und im Zeitverlauf einer Immunantwort.

1.11.1 Modelle für chronischen Stress

In einer Gruppe zu leben hat sowohl Kosten als auch Vorteile (24). In solch einer Gruppe sind einzelne Mitglieder nicht gleichwertig. Genetischer Hintergrund und Umweltfaktoren bedingen dabei die Position eines Individuums in einer Dominanz-Hierarchie. Evolutionär bietet diese solchen Individuen, die eine höhere und dominante Position in einer Hierarchie einnehmen, Zugang zu mehr Ressourcen. Soziale Stressoren sind im Allgemeinen die potentesten Agonisten, die auf die Homöostase eines Individuums einwirken. Wissenschaftliche Studien zur Erforschung der Auswirkungen von Stress auf das Individuum bzw. das Immunsystem bedienten sich dabei unterschiedlicher experimenteller Modelle, die grob in zwei Kategorien eingeteilt werden: In der ersten Kategorie verwendet man wechselnde Haltungsbedingungen von Tieren. Diese beinhalten Einzelhaltung, Rangunterschiede in einer sozialen Gruppe, soziale Instabilität durch Manipulation der Gruppendynamik, die Unterbrechung des Sozialgefüges durch Einbringung eines dominanten Individuums und die Veränderung der Gruppendichte wie z.B. durch eine Überfüllung des Käfigs. Die zweite Kategorie stellt binäre Interaktionen zwischen Individuen her. Diese Kategorie beinhaltet drei Modelle: Das „Resident-Intrudor“-Modell, das „sensorische Kontakt“-Modell und das „chronisch psychosoziale Stress“-Modell. Das

„Resident-Intrudor“-Modell beinhaltet zwei Akteure: den „Residenten“, der ein dominantes, männliches Individuum ist und seinen bekannten Heimkäfig als sein Territorium besetzt. Zum anderen ist der „Intrudor“ ein jüngeres Tier, der aus seinem Heimkäfig entnommen und in das Territorium des „Residenten“ eingebracht wird. Das Ergebnis ist, dass der „Resident“ um dieses Territorium kämpft, solange, bis sich der „Intrudor“ unterwürfig zeigt und eine typische Unterwürfigkeitsgeste („*submissive posture*“) zeigt. Die Konfrontation erfolgt in der Regel für etwa zehn Minuten bis zwei Stunden und wird über mehrere Tage hinweg einmal pro Tag durchgeführt. Nach Beendigung wird der „Intrudor“ in seinen Heimkäfig zurückgesetzt. Im „sensorischen Kontakt“-Modell werden zwei sich unbekannte Tiere zwei Tage lang in einem Käfig zusammen gehalten und sind durch ein Netz voneinander separiert. Mehrfach am Tag wird dieses Netz entfernt, solange, bis eines der beiden Tiere unterwürfig wird. Dieses unterwürfige Tier wird dann einmal pro Tag in einen neuen Käfig mit einem neuen, unbekannten dominanten Tier zusammengesetzt und wird erneut unterworfen. Das „chronisch psychosoziale Stress“-Modell beinhaltet einen dominanten „Residenten“ sowie einen zu unterwerfenden „Intrudor“. Der männliche „Resident“ wird zunächst eine Woche allein gehalten, so dass er sein Revier einnehmen kann. Im Anschluss wird ein „Intrudor“ zu ihm in den Käfig gesetzt, wobei jedoch beide Tiere durch ein Gitter voneinander getrennt sind. Dieses Gitter bietet jedoch noch die Möglichkeit des visuellen und olfaktorischen Kontaktes. Einmal pro Tag wird dieses Gitter entfernt und der „Resident“ hat die Möglichkeit, sein Revier direkt zu verteidigen und den „Intrudor“ zu unterwerfen. Ist dies erfolgt, wird das Gitter zwischen beiden Tieren wieder eingeführt.

1.11.2 Chronic Subordinate Colony Housing

Um die Auswirkungen von chronischem Stress zu untersuchen, etablierte Stefan Reber ein Modell für chronischen psychosozialen Stress an männlichen Mäusen (25-32). In diesem „*chronic subordinate colony housing*“ (CSC)-Modell werden vier junge, männliche C57Bl/6 „Intrudor“-Mäuse (Gewicht: zwischen 19 und 23g) zu einem dominanten, größeren „Residenten“ in den Käfig gesetzt. Wie oben bereits beschrieben, verteidigt dieser „Resident“ sein Revier vor den eindringenden „Intrudor“-Tieren und attackiert diese Tiere solange, bis diese eine typische Unterwürfigkeitsgeste zeigen. Wichtig bei der Wahl der „Residents“ ist es, nur solche Tiere zu verwenden, die nicht beißen. Bissige Tiere werden im Vorfeld ausselektiert. Die „Intrudor“-Tiere werden während des Versuches ununterbrochen und ohne Abtrennung mit dem „Residenten“ im gleichen Käfig zusammen gehalten und, um einen Gewöhnungseffekt auszuschließen, werden die vier „Intrudor“-Tiere nach einer bzw. nach zwei Wochen zu einem neuen, unbekannten „Residenten“ gesetzt. Der ganze Versuch wird nach 19 Tagen bzw., wenn gewünscht, an einem früheren Zeitpunkt beendet und immunologische sowie physiologische Parameter werden untersucht. 2006 zeigten Reber et al., dass Tiere nach 19d chronischem Stress weniger Gewicht hatten, das Thymus-Gewicht

reduziert, das Nebennieren-Gewicht erhöht war und dass darüber hinaus diese Tiere eine spontane, milde Colitis entwickelten (gezeigt an dem histologischen Score am Colon-Gewebe) (25). Weitere Ergebnisse waren, dass CSC-gestresste Tiere ein erhöhtes Angstverhalten zeigten und deren Nebennieren nach ACTH-Restimulation *in vitro* eine geringere Corticosterone-Sekretion aufwiesen im Vergleich zu „*single housed control*“ (SHC)-Tieren. Ein weiteres Ergebnis ist, dass nach chronischem Stress Milzzellen eine Glucocortikoid Resistenz aufwiesen (25). 2007 wurde in diesem Modell gezeigt, dass, wenn man im Anschluss an den 19d CSC-Stress eine chemisch-induzierte, akute Colitis mit „*Dextran sodium sulphate*“ (DSS) induziert, gestresste Tiere eine gesteigerte Inflammation im Colon aufwiesen (30). Um zu verstehen, warum sich nach 19d CSC-Stress eine spontane Colitis entwickelte, untersuchte Reber die Mechanismen und zeigte, dass sich schon in der frühen Phase von CSC (nach zehn Stunden) Defizite in der Barriere-Funktion des Colons manifestierten und sich eine generelle Immunsuppression im Colon-Gewebe zeigte (29). Im gleichen Jahr zeigten Peters und Reber, dass CSC gestresste Tiere ein erhöhtes Risiko aufwiesen, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (32). Im Jahre 2009/ 2010 untersuchte der Autor dieser Arbeit, Dominic Schmidt, immunologische Veränderungen in T-Zellen nach CSC-Stress in peripheren Lymphknoten („*lymphnode*“; LN) (33). Gezeigt wurden eine systemische Aktivierung des Immunsystems und die Entwicklung von inflammatorischen T_H-Zellen. Nach 19d CSC-Stress waren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den peripheren LN (pLN) prozentual erniedrigt, T_H-Zellen produzierten jedoch mehr IFN γ und IL-17. Die T_H2 Zytokinproduktion (IL-4) konnte durch GC nicht mehr unterdrückt werden und zeigte somit eine GC-Resistenz nach CSC.

1.12 Zielsetzung dieser Arbeit

Bereits veröffentlichte Daten zeigen, dass Stress und GC das Immunsystem beeinflussen und die Zusammensetzung von Leukozyten verändern (23, 24, 34-36). Seit Jahren ist bekannt, dass GC für T- und B-Zellen in hohen Dosen toxisch ist. Dies macht man sich zu Nutze in Form von Cortison/Dexamethason, einem synthetischen GC, um entzündliche oder Autoimmun-Krankheiten zu therapieren. Neuere Daten zeigen, dass GC Lymphozyten supprimiert, wohingegen es positiv auf myeloide Zellen wirkt. So zeigte Varga 2008, dass GC-aktivierte anti-inflammatorische Monozyten induziert, die MDSC ähneln (34). Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Wirkung von chronischem psychosozialen Stress auf myeloide Zellen und deren Relevanz zu untersuchen. Dazu sollten sowohl in primären als auch in sekundären lymphatischen Organen myeloide Zellen untersucht und quantifiziert werden und zusätzlich Erkrankungen untersucht werden, in denen diese Zellen eine Rolle spielen könnten, wie z.B. bei Tumor oder Colitis ulcerosa (UC).

2. Material und Methoden

2.1 Antikörper/ Konjugate

Verwendung	Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
Durchflusszytometrie	CD3	FITC	17A2	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD4	FITC	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	FITC	53-6.7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	FoxP3	FITC	FJK-16s	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD11b	AlexaFluor®488	M1/70	eBiosciences
Durchflusszytometrie	Ly6C	FITC	AL-21	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	B220	PE	RA3-6B2	AbD serotec
Durchflusszytometrie	CD3	PE	17A2	BioLegend
Durchflusszytometrie	CD4	PE	RM4-5	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	PE	53-6.7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD11b	PE	M1/70	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD11c	PE	HL3	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD62L	PE	MEL-14	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	FoxP3	PE	FJK-16s	eBiosciences
Durchflusszytometrie	Ly6G	PE	1A8	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD11b	APC	M1/70	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD44	APC	IM7	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD4	PacificBlue™	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	Ly6G	V450	1A8	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	Alexa Fluor®700	53-6.7	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD45R (B220)	PerCP-eFluor®710	RA3-6B2	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD4	PerCP-eFluor®710	RM4-5	eBiosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	PerCP-eFluor®710	53-6.7	eBiosciences
Stimulation <i>in vitro</i>	CD3e		145-2C11	BD Biosciences
Stimulation <i>in vitro</i>	CD28		37.51	eBiosciences
Durchflusszytometrie	Streptavidin	PacificOrange™		Invitrogen
Histologie	CD31		MEC13.3	BD Biosciences
Histologie	Meca-32	Biotin	MECA-32	BD Biosciences
Histologie	Streptavidin	Alexa Fluor®546		Invitrogen
Histologie	goat α rat	Alexa Fluor®647		Molecular Probes®
Histologie		DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)		Molecular Probes®

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche C57Bl/6N-Mäuse, die von Charles River (Sulzfeld) und Janvier (Le Genest, Frankreich) mit einem Alter von 6 Wochen bezogen wurden. TNF^{-/-} und TNFR2^{-/-} wurden unter SPF(*specific pathogen free*)-Bedingungen selbst im Uniklinikum Regensburg gezüchtet. Den Tieren standen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Versuche wurden nach den Haltungsrichtlinien der Regierung der Oberpfalz durchgeführt.

2.2.1 Behandlung mit 6-OH Dopamin (Oxydopamin)

Um gezielt das SNS in einem Stressversuch abzuschalten, wurden in einigen Experimenten Tiere mit dem Neurotoxin 6-OH Dopamin behandelt. Diese Substanz zerstört noradrenerge und dopaminerige Neurone und wird vor allem durch sogenannte „*reuptake transporter*“ in Neurone aufgenommen. Vorgegangen wurde analog Härtle et al. (37). Vor jedem Stressversuch wurden die Tiere dreimal mit 6-OH Dopamin behandelt: Injiziert wurden 80 mg/ kg i.p. an den Tagen -8, -7 und -6 vor dem Experiment sowie am Tag 14 während des Experimentes. Gelöst war 6-OH Dopamin in PBS/ 0,1 % Acetylsalicylsäure. Kontrolltiere waren Tiere, denen nur die Trägersubstanz (PBS/ 0,1 % Acetylsalicylsäure) injiziert wurde.

2.2.2 Behandlung mit RU-486 (Mifepriston)

Um Wirkung der HPA-Achse zu unterbinden, wurden Tiere mit dem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist RU-486 (Mifepriston) behandelt. RU-486 wurde als Antagonist für den Progesteron-Rezeptor entwickelt und wird in der Klinik als „*Abtreibungspille*“ eingesetzt. In der Stressforschung wird er jedoch vor allem als ein Blocker der HPA-Achse verwendet. In einem Vor-Experiment wurde die Substanz den Tieren durch eine dreimalige Injektion mit einer Spritze s.c. verabreicht. Das Problem bestand darin, dass RU-486 eine Halbwertszeit von nur knapp 18 Stunden besitzt, wohingegen ein Stress-Experiment 19 Tage läuft und somit die Substanz nicht kontinuierlich während eines Versuches gleich wirken kann. Dazu entschloss man sich zu einer Lösung, bei der es möglich ist, ohne Eingriff des Experimentators während eines Experimentes eine bestimmte Substanz in einer gleichen Konzentration im Tier zu verabreichen. Dazu gab es zwei Alternativen: 1) „ALZET® Osmotic Pumps“ von Charles River, die aufgrund eines osmotischen Drucks ein bestimmtes Volumen Substanz in einem Zeitintervall abgeben 2) „*Time-release*“ Pellets von *Innovative Research of America*. Für die weiteren Experimente wurden die Pellets gewählt. Diese Pellets sind so konstruiert, dass sie jede gewünschte Substanz in einer gewünschten Zeit und in einer gewünschten Menge in den Metabolismus eines Tieres abgeben. Designt wurde ein Pellet, das in einem Zeitraum von 26 Tagen 1 mg RU-486 pro Tier und pro Tag abgibt. Für ein Stress-Experiment sind das 7 Tage Erholungs- und Gewöhnungsphase nach dem Transport /der Operation plus 19 Tage chronischer Stress. Demzufolge wurde ein Pellet mit 26 mg RU-

486 erworben, das innerhalb von 26 Tagen seinen Wirkstoff abgibt. Kontroll-Pellets waren Placebo-Pellets, die nur die Träger-Matrix enthalten und wirkstofffrei sind. Vor dem Experiment wurde den Tieren bei Ankunft (Tag -7) ein „*Time-release*“-Pellet s.c. implantiert, um die Tiere 7 Tage mit Substanz abzudecken. Implantiert wurden die Pellets nach Herstellerangaben, ohne Verwendung von organischen Lösungsmitteln oder Alkohol, um Schnittwunden/Operationsbesteck bei der Operation zu sterilisieren (deutliche Angabe des Pellet-Herstellers!!!). Dazu wurden die Tiere mit Ketamyin/Xylacin betäubt, die Augen der Tiere mit einer Augensalbe bedeckt (Trocknungsschutz) und lokal der Rücken mit einem Rasierapparat von Haaren befreit. Im Bereich zwischen den Schulterblättern wurde ein kleiner, ca. 5 mm langer Schnitt gemacht, mit einem Löffelspatel lateral an der linken Flanke des Tieres eine kleine Tasche geformt und das Pellet in diese eingebracht. Vernäht wurde die Wunde mit zwei Stichen.

2.2.3 Behandlung mit Dexamethason

Um den stressinduzierten Anstieg an Corticosteron nach Exposition mit einem dominanten *Resident*-Tier zu imitieren, wurden naive Tiere akut oder chronisch mit Dexamethason behandelt. Dazu wurden zwei Modelle verwendet. Als Kontrolltiere dienten Tiere, denen nur PBS als Vehikel injiziert wurde. Alle Injektionen erfolgten i.p.

- a) Akute Behandlung: Eine einmalige Injektion von 4 mg/ kg Dexamethason, gelöst in PBS, und Organentnahme nach 16 bis 18 Stunden (Wirkdauer: über Nacht)
- b) Chronische Behandlung: Drei Injektionen von Dexamethason über 19 Tage. Injektion zu Beginn (d0; 4 mg/ kg)), nach 1 Woche (7 d; 4 mg/ kg) und nach 2 Wochen (14 d; 1 mg/ kg). Organentnahme erfolgte nach 19 Tagen.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

6-OH Dopamin	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
BD FACS Lysis Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Dexa 4mg inject JENAPHARM®	Mibe GmbH, Brehna
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälbererum (FCS)	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
HEPES	Sigma-Aldrich, München
Maus Serum	Selbst hergestellt aus Blut von C57Bl/6 Mäusen
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphat-gepufferte Salinenlösung (PBS)	PAA Laboratories, Pasching
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching
RU-486 „time-release“ Pellets	<i>Innovative Research of America</i> , Sarasota, Florida, USA
Thermo Scientific™ Lab Vision™ PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific, Inc., Schwerte
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München

2.4 Kits

Anti-Ly-6G MicroBead Kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD FACS Lysis Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBiosciences, Frankfurt

2.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Cryotom	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Inkubatoren/ Brutschränke	Heraeus, Hanau
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Labor-Plastik Verbrauchsmaterial	Sarstedt, Nümbrecht
Laminar Flow HB 2448-Sterilbank	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
LSR-II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
MACS-Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Objektträger, SuperFrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter; 0,45 µm	PALL, Ann Arbor, USA
TissueFAXS	TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich
Waagen: Sartorius R16OP & L2200S	Sartorius, Göttingen
Zellsiebe (35 µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugen: Eppendorf 5810R & 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.6 Stressmodell: Chronic Subordinate Colony housing (CSC)

Die Versuchstiere wurden mit Hilfe des von Stefan Reber etablierten CSC-Modells chronischem Stress unterzogen (25). Nach Ankunft wurden den Tieren zur Identifikation Ohrmarken gesetzt und die Tiere wurden eine Woche einzeln gehalten, damit sie sich von einem möglichen Transport-Stress erholen konnten. Direkt vor Beginn des CSC-Stress-Versuches wurden die Tiere gewogen und in zwei Gruppen zu jeweils vier Tieren mit gleichem Gewichtsmittelwert eingeteilt. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe (*single housed controls*; SHC); die andere wurde unter CSC-Bedingungen chronischem Stress unterzogen. SHC-Kontrolltiere wurden während des Stress-Versuches einzeln gehalten und, abgesehen von dem einwöchigen Wechsel des Einstreus, ungestört belassen. CSC behandelte Mäuse wurden in Gruppen aus jeweils vier Tieren zu einem größeren, dominanten und nicht bissigen Männchen (*Resident*) gesetzt. Dieser betrachtete diese als Eindringlinge (*Intrudors*) in sein Revier und versuchte sein Revier vor diesen zu verteidigen.

Ein *Resident* sollte die *Intrudors* solange attackieren, bis diese eine typische Unterwürfigkeitsgeste zeigten. Sobald dies der Fall war, musste dieser die Attacke beenden. Die Gruppe wurde mindestens 30 min bei dem Einsetzen der Tiere beobachtet. Im Falle, dass ein *Resident* ein übersteigertes bzw. ein zu geringes aggressives Verhalten zeigte, wurde die CSC-Gruppe zu einem anderen *Resident* gesetzt. Ausgeschlossen wurden auch hier bissige *Residents*. 48 Stunden nach der ersten Konfrontation mit einem *Resident* wurden SHC- und CSC-Tiere gewogen, um die Entwicklung des Körpergewichtes zu beobachten. Um einen Gewöhnungseffekt auszuschließen, wurde nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen die CSC-Gruppe zu einem neuen, unbekannten *Resident* gesetzt. Das reguläre CSC-Modell besteht aus 19 Tagen konsekutiver Stress-Exposition. In einigen Experimenten wurden auch Zwischenzeitpunkte analysiert, um den Verlauf der Stress-Effekte zu untersuchen. Am Ende jedes Versuches wurden durch CO₂-Narkose sediert, dekapiert, Blut in EDTA beschichteten Monovetten aufgefangen und die Milz und der linke Femur entnommen und bis zur Zellisolation in Pufferlösung auf Eis gelagert.

2.7 Durchflusszytometrie und Zell Isolationen

2.7.1 Präparation der Milz und Erstellung von Milzzellsuspensionen

Um Einzelzellsuspensionen zu erstellen, passierte man die Milz mit Hilfe eines Stempels einer 2 ml Spritze durch ein 35 µM *Cell-strainer* und wusch zweimal mit 10 ml FACS Puffer (PBS/ 2 % FCS). Danach wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 300 g), der Überstand über dem Zellpellet vorsichtig dekandiert und dann wurde dieses in 5 ml hypotoner Lösung (Erylyse-Puffer: 0,17 M NH₄Cl + 20 mM HEPES) resuspendiert, um Erythrozyten zu lysieren. Man inkubierte dies 10 min bei 37°C im Wasserbad und gab 20 ml FACS Puffer auf diese Lösung, um die hypotone Lösung zu verdünnen und den Vorgang abzustoppen, dann pelletierte man Zellen durch Zentrifugation und wusch erneut mit 10 ml FACS Puffer und filtrierte die Lösung nochmals über ein Zellsieb (*Cell-strainer*). Zum Schluss nahm man das Pellet in 20 ml FACS Puffer auf und bestimmte die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer.

2.7.2 Präparation des Femurs und Erstellung von Knochenmarkszellsuspensionen

Aus dem linken Femur (Oberschenkelknochen) sollten Knochenmarks-Zellen isoliert werden. Um sie äußerlich zu desinfizieren, wurden diese für 1 min in ein Petri-Schälchen mit 70 % Ethanol (EtOH) und anschließend 1 min in eines mit PBS gelegt. Die Epikondylen wurden mit einer spitzen, sterilen Schere abgeschnitten und die Diaphyse mit 5 ml PBS durchgespült. Dazu nahm man PBS in einer Spritze mit einer feinen Kanüle auf und stach vorsichtig in den Röhrenknochen und spülte das rötliche Knochenmark in ein vorbereitetes Röhrchen (Tube), bis nur noch die weiße Kalk-Substanz des Röhrenknochens zurück blieb. Die Zellen in der Suspension wurden durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 300 g), in 10 ml FACS Puffer aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.7.3 Durchflusszytometrische Färbungen von Milz- und Knochenmarks-Zellen

Ziel hierbei war es, Milz- und Knochenmarkszellen mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern zu markieren, um eine Aussage über die Zellzusammensetzung in Suspension in einer durchflusszytometrischen Analyse zu treffen. Aus den Einzelzellsuspensionen wurden $1 \cdot 10^6$ Milz- bzw. Knochenmarkszellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS) gewaschen. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 300 g) und der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Um unspezifische Bindung von Antikörpern mit ihrem FcTeil an FcRezeptoren auf Leukozyten zu blockieren, resuspendierte man das Pellet in 30 μ l Block-Puffer (10 % Mausserum, 10 % FCS in PBS) und inkubierte dies 15 min im Kühlschrank bei 4°C. Im Anschluss gab man ohne einen weiteren Waschschritt 30 μ l einer Färbelösung mit den primären Antikörpern (gelöst in FACS-Puffer) in das FACS-Röhrchen und inkubierte 30 min bei 4 °C im Kühlschrank. Wichtig dabei war es zu beachten, dass die zuvor ermittelten optimalen Konzentrationen der Antikörper auf 60 μ l Endvolumen berechnet waren und man somit eine doppelt-konzentrierte Färbelösung auf die Blocklösung applizierte. In einigen Versuchen verwendete man biotinylierte Primär-Antikörper, die noch mit einem sekundären Konjugat aus Streptavidin und einem Fluorochrom gekoppelt wurden. Dazu wusch man die Zellen erneut durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer, zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet (5 min, 300 g) und dekantierte den Überstand ab. Auf das Pellet gab man 50 μ l einer sekundären Färbelösung, in der ein Streptavidin-Konjugat in FACS-Puffer gelöst war. Nach dem Resuspendieren der Zellen in dieser Lösung inkubierte man für 20 min bei 4°C im Kühlschrank. Im Anschluss wusch man mit 2 ml FACS-Puffer, zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet (5 min, 300 g) und fixierte die Zellen durch Resuspension 400 μ l Fixierlösung (2 % Paraformaldehyd in PBS).

2.7.4 Durchflusszytometrische Färbungen von Gesamt-Blut

Im Anschluss an die meisten Experimente wurde wie oben beschrieben Gesamt-Blut in EDTA-beschichteten Monovetten aufgefangen. Das EDTA verhindert dabei die Agglutination des Blutes und zelluläre Bestandteile verkleben nicht durch dessen Gerinnungsbestandteile. Dies ermöglicht eine durchflusszytometrische Analyse von Gesamt-Blut. Würde man Blut in Behälter ohne EDTA-Vorlage aufnehmen, wäre dies aufgrund einer Agglutination aller Zellen nicht mehr möglich. Um eine Analyse der zellulären Zusammensetzung des Blutes zu erstellen, wurden nach Dekapitierung der Tiere und der Blutentnahme 80 μ l EDTA-Gesamt-Blut in jeweils 1 FACS-Tube vorsichtig vorgelegt. Im Gegensatz zu einer Färbung von Milz-Zellsuspensionen wird die Lyse von Erythrozyten erst nach der Antikörper-Färbung durchgeführt. Man gab zur Färbung der zellulären Bestandteile des Blutes 20 μ l Antikörper-Färbelösung in die Blut-Vorlage und mischte sie vorsichtig auf einem Vortex. Die Antikörperfärbelösung ist dabei so kalkuliert, dass alle Antikörper-Verdünnungen und

Mengen auf 100 µl Endvolumen berechnet sind. Man gibt demzufolge einen 5-fach konzentrierten Antikörper-Cocktail auf das Blut. Alle Antikörper werden wie oben beschrieben in FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS) aufgenommen. Inkubiert wurde 30 min im Kühlschrank bei 4°C. Im Anschluss gab man 1 ml einer einfachen „BD FACS Lysis Solution“ in jedes FACS-Tube und mischte es erneut auf einem Vortex. Diese Lösung fungiert sowohl als hypotone Lösung, um Erythrozyten zu lysieren, als auch als Fixierlösung mit Paraformaldehyd der Antikörper auf der Zelloberfläche. Inkubiert wurde 10 min, dunkel bei Raumtemperatur (RT). Man zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet (5 min, 300 g) und dekantierte den Überstand vorsichtig ab, wusch mit 2 ml FACS-Puffer und pelletierte die Zellen erneut (5 min, 300 g). Am Ende wurde das Pellet in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und es stand somit bereit für die durchflusszytometrische Analyse.

2.8 Isolation von PMN- und MO-MDSC

Um funktionelle Analysen von myeloiden Suppressorzellen zu erstellen, wurden aus Milzzell- und Knochenmarkszell-Suspensionen PMN- (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) mittels der MACS-Methode (*magnetic-activated cell sorting*) isoliert. Das Prinzip besteht darin, Zellen an spezielle MicroBeads zu binden und diese aus der Suspension abzutrennen. MicroBeads sind 50 nm große superparamagnetische Partikel, die mit hoch spezifischen Antikörpern konjugiert sind. Nach der Bindung der Antikörper an das gerichtete Epitop sind die Zellen somit an die MicroBeads gebunden und können mittels eines Magneten aus der Suspension isoliert werden. Man unterscheidet weiterhin die Art, wie man Zellen reinigt. Dabei können Zellen durch eine Positiv- oder eine Negativ-Selektion ausgesondert werden. In der Positiv-Selektion werden die gesuchten Zellen direkt an MicroBeads gebunden und von den nicht gesuchten Zellen separiert. In der Negativ-Selektion dagegen werden alle nicht gesuchten Zellen aus der Suspension entfernt (depletiert), so dass die gesuchte Population an Zellen zurück bleibt.

2.8.1 Isolierung von CD11b⁺ Zellen

Um PMN- und MO-MDSC einzeln auf zu reinigen, waren dabei mehrere Schritte notwendig. In einem ersten Schritt wurden CD11b⁺ Zellen durch eine Negativ-Selektion vorgereinigt. Unerwünschte T- und B-Lymphozyten wurden in zwei Schritten indirekt an MicroBeads gebunden und aus der Suspension depletiert. Nach der Aufarbeitung von Milz- und Knochenmarkszellen wurde eine bestimmte Zellzahl mit MACS-Puffer (PBS; 0,5 % BSA und 2 mM EDTA) gewaschen und die Zellen wurden dann zu einem Pellet zentrifugiert (300 g, 5 min). Auf das Pellet gab man pro $1 \cdot 10^7$ Zellen 100 µl Antikörperfärbelösung. In dieser Färbelösung waren folgende Antikörper in MACS-Puffer gelöst:

- α CD3 - PE
- α CD4 – PE
- α CD8 – PE
- α B220 – PE
- α CD11c – PE

Gelagert wurde dies 30 min bei 4 °C im Kühlschrank. Überschüssige Antikörper wurden durch Zugabe von MACS-Puffer und durch Zentrifugation zu einem Pellet abgewaschen. Das Pellet resuspendierte man in einer α PE MicroBeads-Lösung:

- 80 μ l MACS Puffer pro 10^7 Zellen
- 20 μ l α PE MicroBeads pro 10^7 Zellen

Man inkubierte 15 min bei 4 °C im Kühlschrank, wusch mit MACS-Puffer, zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet und nahm es nach Abkippen des Überstandes in 500 μ l MACS-Puffer auf. Die gekoppelten Zellen applizierte man auf eine LD-Säule (*large depletion*) und spülte dreimal mit 1 ml MACS-Puffer. Da die LD-Säulen speziell für eine Depletion von Zellen gebaut sind, bleiben die markierten und unerwünschten Zellen in der Säule hängen, wohingegen unmarkierte, gewünschte Zellen unten aus der Säule rausfließen. Dieser erste Vorräumigungsschritt bringt eine Reinheit von etwa 60 bis 80 %, die durch eine durchflusszytometrische Kontrollanalyse ermittelt wurde.

2.8.2 Isolation von PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int})

Nach der Gewinnung der vorgereinigten CD11b⁺ Zellen wurden PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) in einer Positiv-Selektion durch α Ly6G MicroBeads isoliert. CD11b⁺ Zellen wurden durch Zentrifugation (300 g, 5 min) pelletiert und in einer α Ly6G MicroBeads-Lösung resuspendiert:

- 20 μ l MACS Puffer pro 10^7 Zellen
- 5 μ l α Ly6G Biotin pro 10^7 Zellen

Inkubiert wurde 10 min bei 4 °C im Kühlschrank. Im Anschluss gab man ohne einen weiteren Waschschritt die α Biotin MicroBead-Lösung hinzu:

- 15 μ l MACS Puffer pro 10^7 Zellen
- 10 μ l α Biotin MicroBeads

Man inkubierte 15 min bei 4 °C im Kühlschrank, wusch mit MACS-Puffer, zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet und nahm es nach Abkippen des Überstandes in 500 μ l MACS-Puffer

auf. Die Zellsuspension wurde abhängig von der Zellzahl auf eine MS-Säule (*middle separation*) oder LS-Säule (*large separation*) geladen und dann spülte man dreimal mit MACS-Puffer. Durchgespülte Ly6G⁻ Zellen wurden aufgefangen und beiseite gestellt, da dort die später zu isolierenden MO-MDSC enthalten waren. Eluiert wurden PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) aus der Säule mit 1 ml bzw. 5 ml MACS-Puffer. Mit diesem Schritt erhält man gewöhnlich eine Reinheit von über 95 %, die durch eine durchflusszytometrische Kontrollanalyse ermittelt wurde.

2.8.3 Isolation von MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺)

Der Durchfluss aus der Selektion von Ly6G⁺ Zellen enthielt immer noch ungebundene PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}), die in einer neuen LD-Säule ausgesondert wurden. Diese mussten rückstandlos entfernt werden, um später hochreine MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) zu erhalten. Dazu wusch man mit MACS-Puffer, zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet und nahm es nach Abkippen des Überstandes in 500 µl MACS-Puffer auf. Die Zellen applizierte man auf eine LD-Säule und spülte dreimal mit 1 ml MACS-Puffer. Der Durchfluss wurde aufgefangen und ergab die vorgereinigten MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺). Der letzte Schritt bestand in einer Positiv-Selektion von CD11b⁺ Zellen. Die Zellen, die unten aus der LD-Säule herausflossen, wurden durch Zentrifugation (300 g, 5 min) pelletiert und in einer αCD11b MicroBeads-Lösung resuspendiert:

- 90 µl MACS Puffer pro 10⁷ Zellen
- 10 µl αCD11b MicroBeads

Man inkubierte 15 min bei 4 °C im Kühlschrank, wusch mit MACS-Puffer, zentrifugierte die Zellen zu einem Pellet und nahm es nach Abkippen des Überstandes in 500 µl MACS-Puffer auf. Die Zellsuspension wurde auf eine MS-Säule (*middle separation*) geladen und dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Eluiert wurden MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) mit 1 ml MACS-Puffer. Mit dieser Methode erhält man über 95 % reine CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺ Zellen. Diese Methode lässt aber nicht zu, zwischen Ly6G^{int} und Ly6C^{high} zu unterscheiden. Dies wäre nur durch FACS-Sorting auf dem BD FACS-Aria II (ansässig im Institut für Pathologie) möglich.

2.8.4 MDSC:T-Zell Suppression Assay

Um die suppressive Aktivität von PMN- und MO-MDSC auf proliferierende T-Zellen zu messen, wurden MDSC in unterschiedlicher Anzahl zusammen mit einer festen Anzahl an αCD3/ αCD28- stimulierten Gesamt-Milzzellen einer naiven, ungestressten Maus inkubiert (C57Bl/6N; weder SHC, noch CSC Tier; Herkunft: D4 im Uniklinikum Regensburg). Der erste Schritt bestand darin, PMN- und MO-MDSC am Tag der Organentnahme mittels der MACS-Methode zu isolieren und sie in unterschiedlicher Anzahl in eine 96-Loch-Rundbodenplatte

auszusähen, wobei die Zellen in 100 μ l Kulturmedium (RPMI 1640, 10 % FCS, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 100 U/ ml Penicillin, 100 U/ ml Streptomycin) vorlagen. Die Zellen wurden über Nacht in einem Brutschrank inkubiert. Am Folgetag gab man 200.000 CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)-gelabelte Gesamt-Milzzellen (in 100 μ l Kulturmedium) in jeweils 1 Loch zu den PMN- und MO-MDSC. Aus einer naiven C57Bl/6 Maus wurde dazu die Milz entnommen, eine Einzelzellsuspension gewonnen und eine bestimmte Anzahl CFSE gelabelt. Es wurde die gewünschte Zellzahl in dem Labeling-Puffer (PBS/ 1 % FCS) vorgelegt, dann zentrifugierte man die Zellen zu einem Pellet und gab pro 10^7 Zellen 1 ml Labeling-Cocktail auf das Pellet und mischte es durch Resuspendieren: 3 μ M CFDA (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) in Labeling-Puffer. CFDA ist die Vorstufe von CFSE und besitzt im Gegensatz zu CFSE die Eigenschaft, durch die Zellwand in Zellen zu diffundieren. Intrazelluläre Esterasen spalten CFDA in CFSE und dieses ist somit kovalent intrazellulär gebunden und kann aus der Zelle nicht mehr entweichen. Inkubiert wurden die Zellen 8 min bei 37 °C dunkel im Wasserbad. Man stoppte den Vorgang durch Zugabe des fünffachen Volumens an FACS-Puffer ab und zentrifugierte dies zu einem Pellet (5 min, 300 g). Gelabelte Zellen wurden in 10 ml FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl wurde erneut bestimmt. Am Ende stellte man die Zell-Konzentration mit Kulturmedium auf $2 \cdot 10^6$ / ml ein und säte 100 μ l (entspricht 200.000 Zellen) in je ein Loch zu den MDSC. Es wurde stets eine feste Anzahl an CFSE-gelabelten Milzzellen zu MDSC gegeben: 200.000 in 100 μ l Kulturmedium. Variiert wurde die Anzahl der MDSC, die man am Vortag in unterschiedlicher Anzahl in 100 μ l Kulturmedium ausgesät hatte, um unterschiedliche Verhältnisse von CFSE-markierten Responder-Zellen: MDSC einzustellen. Ein Beispiel ist hier gezeigt:

Responder-Zelle: MDSC

1: 0,05 entspricht: 200.000 CFSE gelabelte Milzzellen + 10.000 MDSC

1: 0,01 entspricht: 200.000 CFSE gelabelte Milzzellen + 20.000 MDSC

1: 0,2 entspricht: 200.000 CFSE gelabelte Milzzellen + 40.000 MDSC

1: 1 entspricht: 200.000 CFSE gelabelte Milzzellen + 200.000 MDSC

Nachdem MDSC und Responder-Milzzellen zusammen in 200 μ l Kulturmedium vorlagen, gab man 20 μ l von löslichen α CD3/ α CD28 Antikörpern, gelöst in Kulturmedium, hinzu die spezifisch T-Zell-Proliferation stimulierten:

- α CD3: 0,5 μ g/ Loch (entspricht eine Endkonzentration: 0,11 μ g/ ml bzw. 110 ng/ ml)
- α CD28: 0,1 μ g/ Loch (entspricht eine Endkonzentration: 0,022 μ g/ ml bzw. 22 ng/ ml)

Inkubiert wurde dieser Assay 72 Stunden im Inkubator. Im Anschluss wurde der Überstand über den Kulturen auf – 20 °C konserviert, die Zellen wurden jeweils in ein FACS tube/ Loch gelegt und es erfolgte eine standardmäßige durchflusszytometrische Oberflächenfärbung:

- α CD4- APC
- α CD8-PerCP

Am Ende fixierte man die Zellen durch Resuspension von 400 μ l Fixierlösung (2 % Paraformaldehyd in PBS + 2000 unmarkierten Zähl-Beads).

Analyse: Analysiert wurde die Proliferation anhand des CFSE-Signals von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen relativ zu einer Positiv-Kontrolle, die keine MDSC enthielt. In der Positiv-Kontrolle wurden 200.000 CFSE-gelabelte Milzzellen mit α CD3/ α CD28-Antikörpern stimuliert und - abgesehen von dem Fehlen der MDSC (ersetzt wurde das Volumen durch 100 μ l Kulturmedium) - gleich behandelt/geerntet und gefärbt. In der Positiv-Kontrolle wurde anhand der unmarkierten Zähl-Beads die totale Anzahl proliferierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen pro Loch ermittelt. Wichtig war hier, quantitativ alle Zellen aus den Löchern der Kulturplatte herauszuwaschen. Es wurde eine bestimmte Menge an Probe pro Loch im Durchflusszytometer aufgenommen und anhand der eingesetzten Beads zurück gerechnet, wie viele CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen pro Loch total proliferiert hatten. Dazu wurden bei der FACS-Analyse die Beads im Durchflusszytometer gezählt und es wurde ein Faktor erstellt, der auf das ganze Loch der Kulturplatte zurück rechnete.

Beispiel: Man nahm z.B. 1000 Beads im Durchflusszytometer auf: 2000 eingesetzte / 1000 aufgenommene Beads = Faktor 2. Man muss nun die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, welche proliferiert haben, *2 nehmen. Am Ende wurde noch die Positiv-Kontrolle auf relative Proliferation von 1 gesetzt und davon abhängig wurden dann die Kulturen ausgerechnet, die unterschiedliche Mengen an MDSC enthielten.

2.9 Histologie von Tumor-Schnitten

2.9.1 Erstellen von Semi-Dünnschnitten

Nach dem Einbetten von Tumorgewebe in ein mit TissueTek befülltes Cryomold und dem Konservieren bei -80 °C wurden 8 µm dicke Schnitte des Tumorgewebes auf SuperFrost® - Plus-Objekträger aufgezogen und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

2.9.2 Färben von histologischen Schnitten des Tumorgewebes

1. Nach der Trocknung wurden die Schnitte zunächst in -20 °C kaltem Aceton für 10 min fixiert und anschließend luftgetrocknet. Die fixierten Schnitte wurden mit einem hydrophoben Fettstift umrandet, um somit einen Bereich zu bilden, an dem später Antikörper-Färbelösungen appliziert werden konnte.
2. Nach der Trocknung dieses Randes wurde zweimal im Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween 20) für 5 min in einer Küvette gewaschen. Die Objekträger wurden aus den Küvetten horizontal in eine feuchte, dunkle Kammer gelegt und dann erfolgte ein Blockierschritt mit Block-Puffer (10 % Maus Serum, 10 % FCS in PBS), um unspezifische Bindung von Antikörpern zu blocken. Inkubiert wurde 15 min bei Raumtemperatur.
3. Nach einem zweimaligen Waschschritt mit Waschpuffer in einer Küvette wurden die Objekträger erneut horizontal in die feuchte Kammer gelegt und es wurde 50 µl des primären Antikörper-Cocktails auf die Schnitte gegeben (gelöst in Färbepuffer: 10 %FCS in PBS):
 - CD31 unlabelled (rat α mouse)
4. Inkubiert wurde 30 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschritt mit Waschpuffer in einer Küvette, die Objekträger wurden erneut horizontal in die feuchte Kammer gelegt und es wurde 50 µl des sekundären Antikörper-Cocktails auf die Schnitte gegeben (gelöst in Färbepuffer: 10 %FCS in PBS):
 - Goat α rat Alexa Fluor®647
5. Inkubiert wurde 30 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschritt mit Waschpuffer in einer Küvette, die Objekträger wurden erneut horizontal in die feuchte Kammer gelegt und es wurde 50 µl eines zweiten Block-Puffers aufgetragen (10 % Ratten Serum, 10 % FCS in PBS).
6. Inkubiert wurde 15 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein Waschschritt mit Waschpuffer in einer Küvette, die Objekträger wurden erneut horizontal in die feuchte Kammer gelegt und es wurde 50 µl des sekundären Antikörper-Cocktails auf die Schnitte gegeben (gelöst in Färbepuffer: 10 %FCS in PBS):
 - MECA32-Biotin

7. Inkubiert wurde 20 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschnitt mit Waschpuffer in einer Küvette, die Objektträger wurden erneut horizontal in die feuchte Kammer gelegt und es wurde 50 µl Streptavidin-Konjugat/ DAPI auf die Schnitte gegeben (gelöst in Färbepuffer: 10 %FCS in PBS):
 - Streptavidin-Alexa Fluor®546
 - DAPI
8. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschnitt mit Waschpuffer in einer Küvette und die Objektträger wurden mit Hilfe eines Eindeckel-Mediums mit Deckglässchen versehen.

2.9.3 Analyse von histologischen Tumor-Schnitten mit TissueFAXS

Das „TissueFAXS“ ist eine Kombination aus einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop mit einer dazugehörigen intelligenten Software, die automatisch gefärbte Marker in einem gefärbten histologischen Schnitt automatisch erkennt. Dazu wird eine reguläre immun-histochimische oder Immun-fluoreszenz-Färbung von Gewebe durchgeführt und an dem Mikroskop abfotografiert. In der dabei liegenden Software ist es möglich, dem Programm zu definieren, was z.B. eine Zelle ist (anhand einer Zellkern-Färbung). Darüber hinaus bietet es viele weitere messbare Parameter wie die Größen-Erkennung oder eine automatische Zählung von erkannten positiven Signalen auf einem Schnitt. Der Vorteil ist hierbei, dass das Gerät objektiv und nicht subjektiv ein Ergebnis erstellt.

Gefärbt wurden Tumor-Schnitten mit CD31 und MECA-32. Im Folgenden ist gezeigt, wie für diesen Versuch Gefäße quantifiziert und dessen Fläche analysiert wurden. Hier ist exemplarisch ein Graph gezeigt, der CD31 anhand des Cy-5-Signals erkennt. Hierbei ist die Intensität gegen die Fläche des Cy-5-Signals aufgetragen. Indem man ein „Gate“ um dieses erkannte Signal legt, werden CD31⁺ Zellen erkannt.

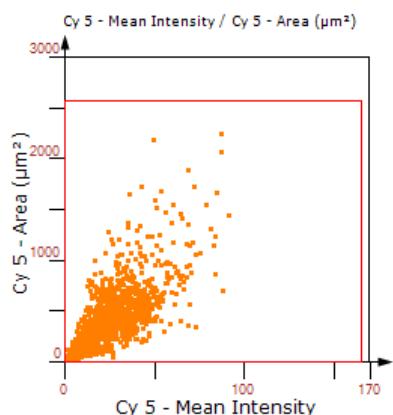


Abbildung 2.1: Gezeigt ist ein Dot-Plot-Diagramm aus der Analysen-Software von TissueGnostics „TissueQuest“, um Cy5⁺ Zellen auf einem Objektträger zu analysieren. Im orangen Quadrat sind alle Cy5⁺ Zellen abgebildet, wobei jeder Punkt ein positives Signal darstellt.

Man kann diese automatisch erkannten Zellen auch im histologischen Schnitt zurückverfolgen. Dabei steht jeder einzelne Punkt in dem „*Dot Plot*“ für eine positive Zelle. Im Folgenden sind zwei Bilder gezeigt, die zum einen das ursprüngliche Bild zeigen und zum anderen ein Bild nach der digitalen Erkennung von CD31⁺ Zellen. Dabei sind die erkannten, roten CD31⁺ Zellen mit einem weißen Kreis umrandet. Für die statistische Analyse erstellt der Computer eine Excel-Datei, in der alle Ergebnisse und Werte angegeben sind, und man kann diese direkt in ein Graphik-Programm importieren, um dazugehörige Graphen zu generieren.

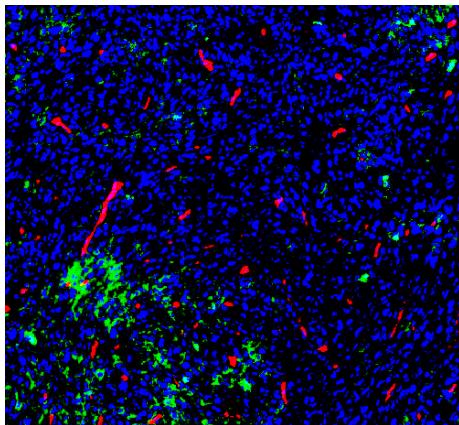
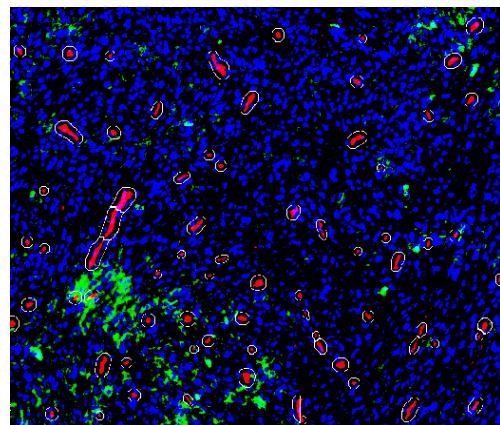
A**B**

Abbildung 2.2: Gezeigt ist ein repräsentativer histologischer Schnitt von BFS1-Tumoren am Tag neun nach Inokulation. Gefärbt wurden die Schnitte mit zwei Antikörpern, die gegen CD31 (rot), Meca 32 (weiß; nicht auf dieser Abbildung dargestellt) und mit DAPI (blau). In A) zeigt das Bild vor der automatischen Analyse der „TissueQuest“-Software, wohingegen in B) CD31+ Zellen automatisch vom Computer erkannt wurden und weiß umrandet wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Chronisch psychosozialer Stress und die Auswirkungen auf das Immunsystem

3.1.1 Auswirkung von chronischem Stress auf Lymphozyten

Nachdem in der Bachelor-Arbeit im CSC-Modell T-Zellen in Lymphknoten (inguinal, axial und brachial) untersucht wurden, sollten in der Masterarbeit myeloide Zellen in Milz und Knochenmark analysiert werden. Dazu wurden in Milz und Blut Lymphozyten quantifiziert.

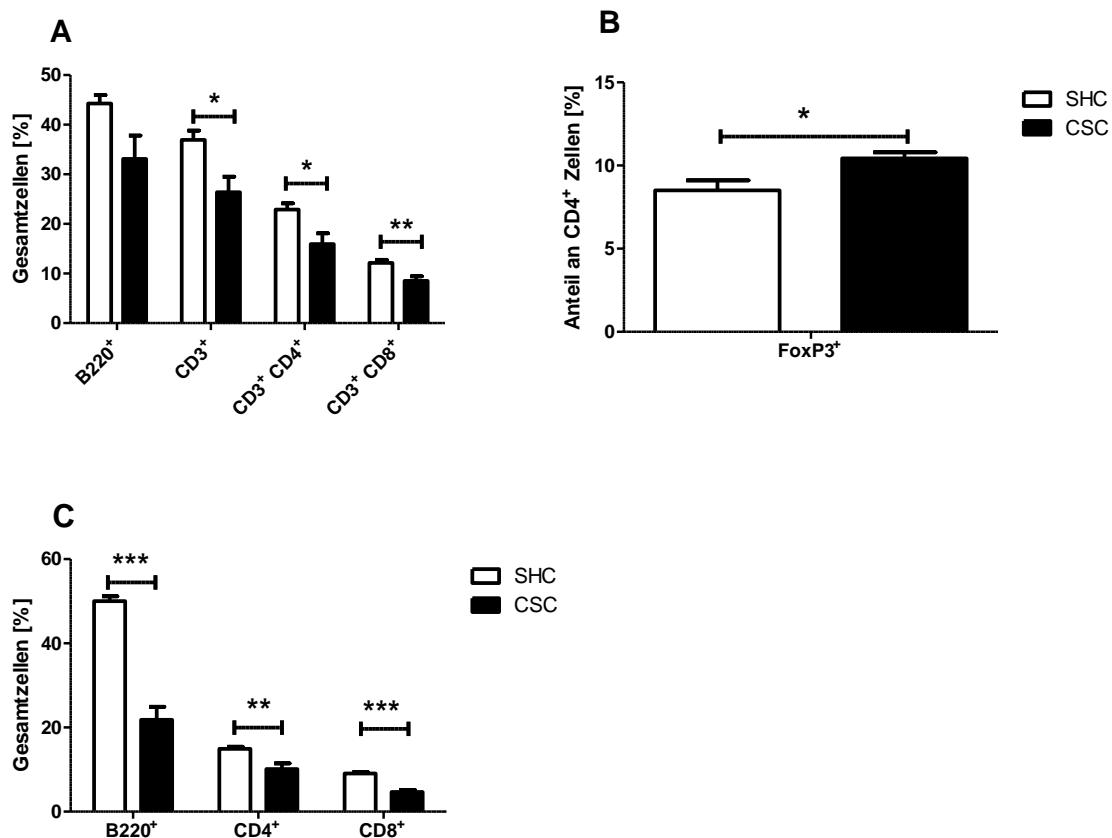


Abbildung 3.1: Lymphozyten-Zusammensetzung in Milz (A und B) und Blut (C) nach 19d CSC: Nach 19d CSC wurden die Milzen (A und B) und Blut (C) von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen und die Zusammensetzung von B-Zellen ($B220^+$) und T-Zellen ($CD3^+$) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) wurden anhand des Anteils des intrazellulär gemessenen FoxP3 innerhalb der $CD4^+$ Zell-Population analysiert (B). n: 4-8 SHC vs. 4-8 CSC (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; ungepaarter t-Test).

Untersucht wurden $B220^+$ B-Zellen und $CD3^+$ T-Zellen in Milz und Blut nach 19d CSC (Abbildung 3.1). Nach chronischem Stress waren sowohl $CD4^+$ T_H -Zellen als auch $CD8^+$

zytotoxische T-Zellen (CTL) prozentual in Milz (Abbildung 3.1 A) und Blut (Abbildung 3.1C) reduziert. Eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen in der Milz zeigte sich in allen Versuchen, jedoch ohne statistisch signifikant zu sein ($p = 0,0562$). Dagegen reduzierte sich prozentual der Anteil an B-Zellen im Blut um die Hälfte (Abbildung 3.1C). Ein Anstieg an FoxP3⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen wurde in der Milz nachgewiesen und zeigt somit einen prozentualen Anstieg an T_{Reg} innerhalb der CD4⁺ T-Zellen an (Abbildung 3.1B).

3.1.2 Auswirkung von chronischem Stress auf myeloide Zellen

Im Folgenden wurden myeloide Zellen in Milz und Blut genauer untersucht. Im Speziellen lag das Hauptinteresse auf MDSC. MDSC unterteilen sich in CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int} PMN-MDSC und CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high} MO-MDSC.

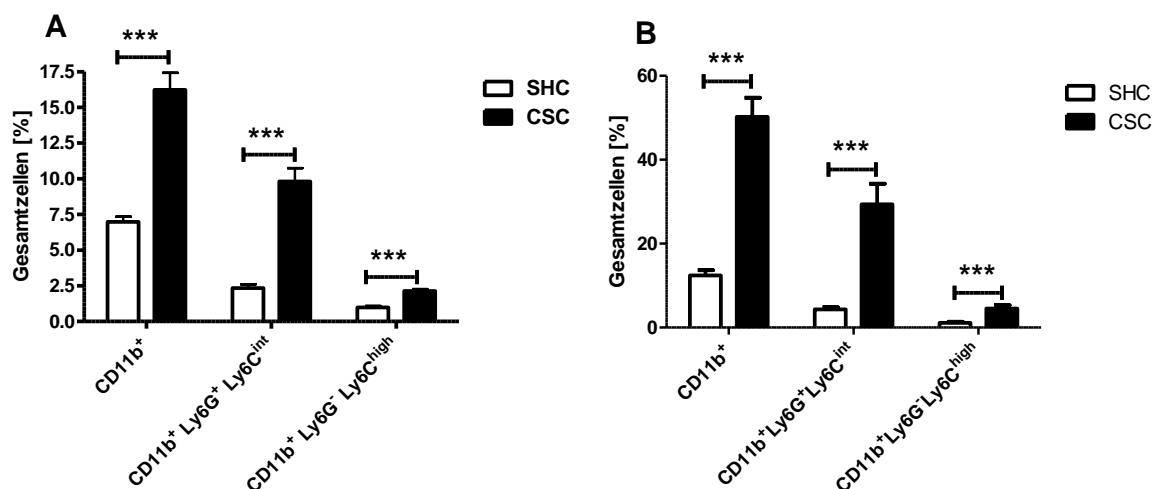


Abbildung 3.2: Zusammensetzung an myeloiden Zellen in Milz (A) und Blut (B) nach 19d CSC: Nach 19d CSC wurden die Milzen (A) und Blut (B) von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen und die Zusammensetzung mittels Durchflusszytometrie untersucht. n: 4-8 SHC vs. 4-8 CSC (***: $p < 0,001$; ungepaarter t Test).

Neben einem generellen Anstieg an CD11b⁺ Zellen zeigt Abbildung 3.2, dass sowohl PMN-MDSC, als auch MO-MDSC in Milz (Abbildung 3.2 A) und Blut (Abbildung 3.2 B) nach 19d CSC im Vergleich zu SHC-Kontrolltieren erhöht waren. Der Anteil an PMN-MDSC verdreifachte sich durch CSC, wohingegen der MO-MDSC-Anteil sich nahezu verdoppelte. Myeloide Zellen kommen, wie bereits die Etymologie andeutet, aus dem Knochenmark [griechisch: *myelós* = »Mark«]. Nachdem myeloide Zellen in Milz und Blut prozentual angestiegen waren, wurde untersucht, ob dies auch im Knochenmark der Fall ist.

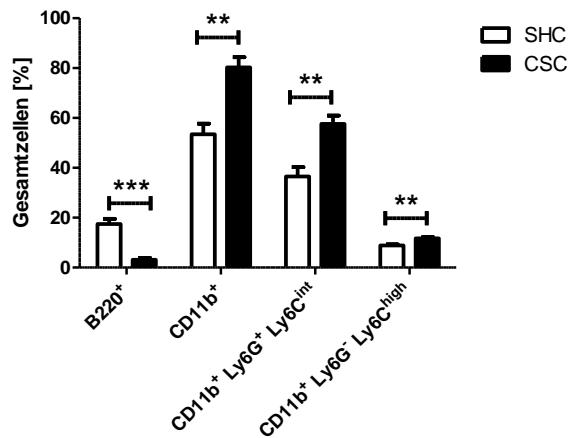


Abbildung 3.3: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen im Knochenmark nach 19d

CSC: Nach 19d CSC wurden der linke Femur von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen, Knochenmarkszellen isoliert und die Zusammensetzung mittels Durchflusszytometrie untersucht n: 4 SHC vs. 4 CSC (**: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

Im Knochenmark wurde nach 19d CSC eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen und ein Anstieg an CD11b⁺ myeloiden Zellen festgestellt (Abbildung 3.3). PMN-MDSC und MO-MDSC waren analog wie in Milz und Blut prozentual erhöht. Der Anstieg dieser beiden Populationen fiel jedoch geringer aus als in Milz und Blut (siehe Abbildung 3.2).

3.2 Funktionelle Charakteristika von MDSC

Myeloide Suppressorzellen zeichnen sich vor allem durch ihre suppressive Wirkung gegenüber T-Zellen aus. Dies ist, wie bereits oben erwähnt, hauptsächlich durch iNOS, Arg1, ROS und RNS vermittelt. Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei dem durch CSC induzierten Anstieg an CD11b⁺ Zellen um MDSC handelt und nicht nur um gewöhnliche Granulozyten oder Monozyten, wurde (wie in der Masterarbeit) das suppressive Verhalten von PMN-MDSC und MO-MDSC getestet. Dazu wurden aus Milz- und Knochenmarkzell-Suspensionen von SHC-Kontrolltieren und 19d CSC-gestressten Tieren PMN-MDSC und MO-MDSC isoliert und ihr suppressives Verhalten gegenüber α CD3/ α CD28-stimulierten T-Zellen getestet. Das suppressive Verhalten von PMN-MDSC und MO-MDSC aus dem Knochenmark und der Milz wurde in der Masterarbeit bereits getestet und die folgenden Daten damit bereits veröffentlicht. Sie werden jedoch hier nochmals gezeigt, um zu verdeutlichen, dass CSC T-Zell-suppressive myeloide Zellen induziert.

PMN-MDSC aus der Milz supprimierten T-Zellen nicht und MO-MDSC aus der Milz nur in hoher Anzahl und ausschließlich von CSC gestressten Tieren (Daten nicht gezeigt).

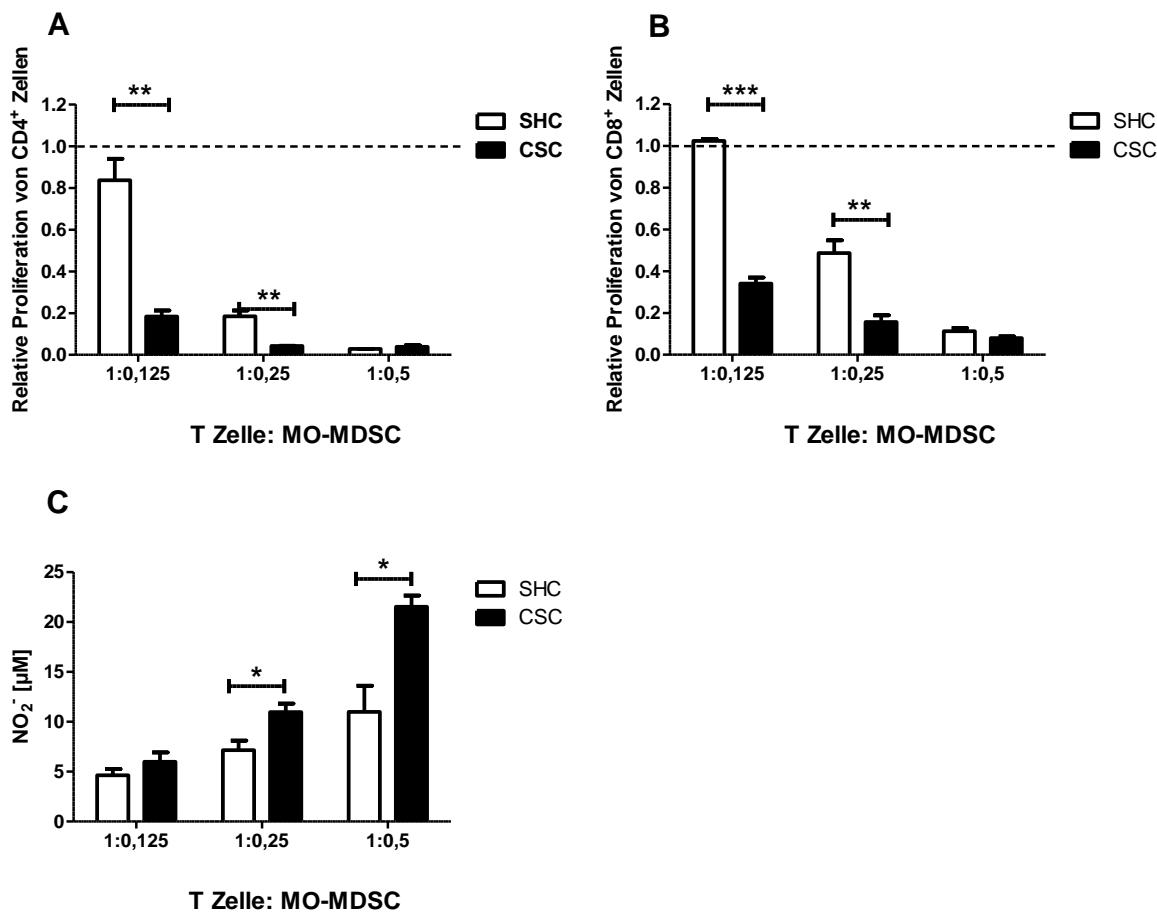


Abbildung 3.4: Analyse des suppressiven Verhaltens von MO-MDSC aus dem Knochenmark auf proliferierende T Zellen: Aus Knochenmarkzellen wurden MO-MDSC isoliert (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) und ihre Suppressivität auf CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen untersucht. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von MO-MDSC. Im Kulturüberstand der Suppression-Assays wurde NO₂⁻ gemessen (C). n: 4 SHC vs. 4 CSC (*: p<0,05, **: p<0,01; ungepaarter t Test).

MO-MDSC aus dem Knochenmark besitzen gegenüber MO-MDSC aus der Milz ein höheres suppressives Potenzial. Nach 19d CSC ist ihre Suppressivität gegenüber CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.4 A) und CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.4 B) im Vergleich zu solchen aus SHC-Kontrolltieren deutlich verstärkt. Zu erkennen ist dies daran, dass bereits in niedriger Konzentration (1:0,125 entspricht 1 MO-MDSC gegenüber 8 T-Zellen) die Proliferation von T-Zellen um 60 bis 80 % reduziert war. Vermittelt wurde die Suppression u.a. durch das Enzym iNOS, welches Stickmonoxid-Radikale generiert, was man als Nitrit (NO₂⁻) im Kulturüberstand messen kann (Abbildung 3.4 C). Kulturen mit CSC-MO-MDSC wiesen dabei stets nahezu doppelt so viel NO₂⁻ auf, wie solche von SHC-Tieren.

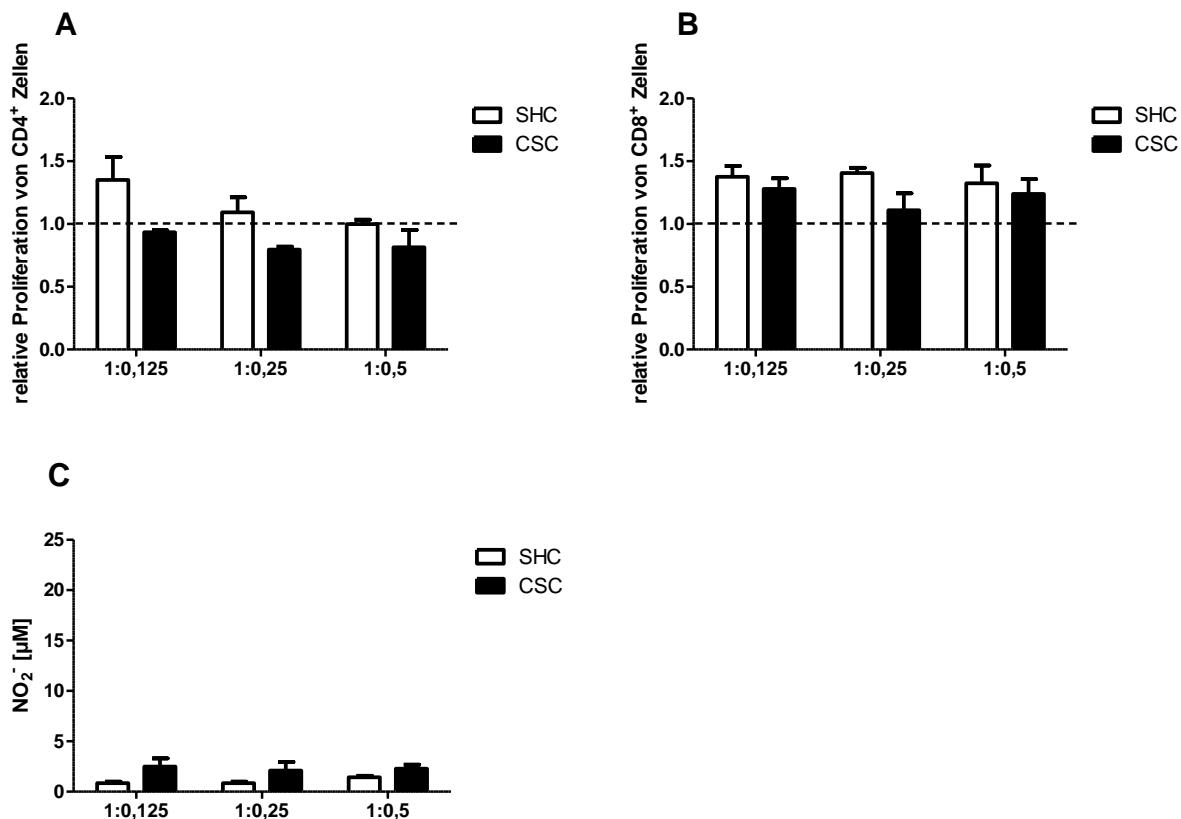


Abbildung 3.5: Analyse des suppressiven Verhaltens von PMN-MDSC aus dem Knochenmark auf proliferierende T Zellen: Aus Knochenmarkzellen wurden von SHC-Kontrolltieren und 19d CSC-gestressten Tieren PMN-MDSC isoliert (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und ihr suppressives Verhalten gegenüber polyklonal stimulierten CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen untersucht. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Abwesenheit von PMN-MDSC. Im Kulturüberstand der Suppression-Assays wurde NO₂⁻ gemessen (C) n: 4 SHC vs. 4 CSC

Analog wurden PMN-MDSC aus dem Knochenmark isoliert und ihre Suppressivität gegenüber CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.5 A) und CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.5 B) gemessen. Weder PMN-MDSC von SHC-Tieren, noch von CSC-Tieren unterdrückten die Proliferation von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurden vernachlässigbare geringe Mengen an Nitrit in den Kulturen gefunden. Sie unterstützen somit die Literaturangaben, dass PMN-MDSC kein iNOS exprimieren.

3.3 Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von CD11b⁺ Zellen in Milz und Knochenmark

Nach Charakterisierung und funktioneller Analyse solcher MDSC nach 19d CSC-Stress wurde der zeitliche Verlauf ihres Auftretens in Milz und Knochenmark untersucht. Dazu wurden fünf Zeitpunkte nach CSC Beginn untersucht und der Gehalt an B220⁺ und CD11b⁺ myeloiden Zellen untersucht. Im Speziellen wurde 10h, 48h, 8d, 15d nach Beginn der CSC und der Endzeitpunkt nach 19d untersucht.

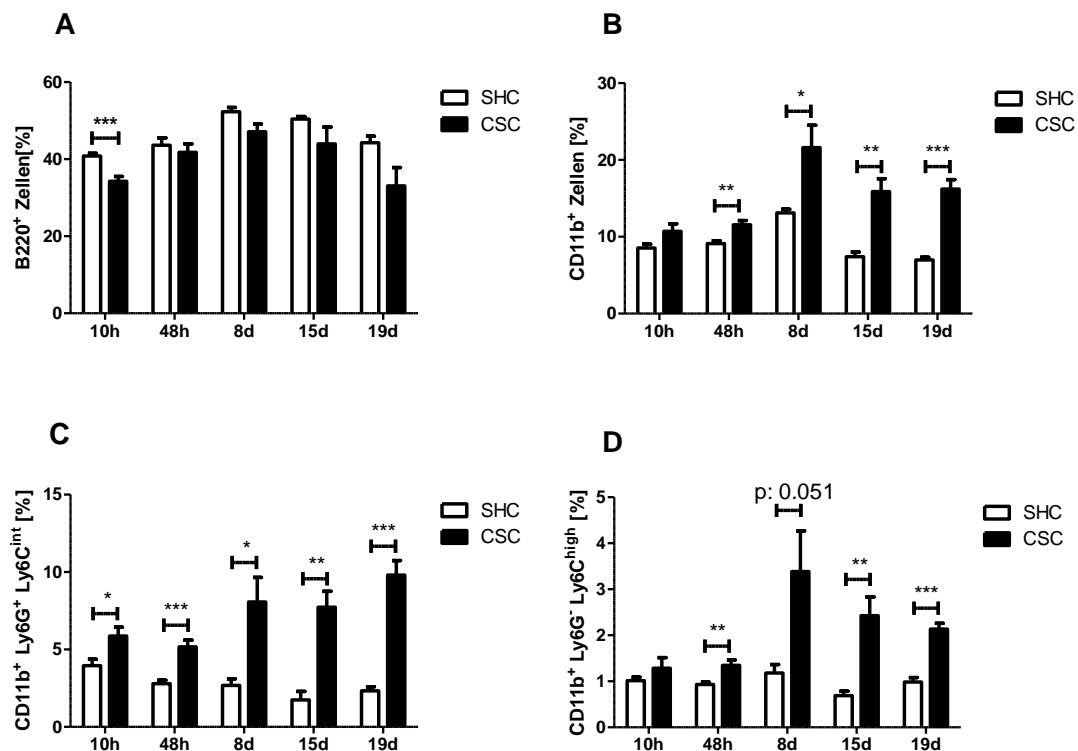


Abbildung 3.6: Zelluläre Zusammensetzung der Milz im Lauf eines 19d CSC-Stress-Versuches: Von SHC-Kontrolltieren und CSC-Tieren wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach CSC-Beginn die Milz entnommen und die Zellzusammensetzung untersucht. Analysiert wurden B220⁺ Zellen (A), CD11b⁺ Zellen (B), PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) (C) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) (D). n: 4-14 SHC vs. 4-16 CSC (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

In Abbildung 3.6 ist der zeitliche Verlauf der Zell-Zusammensetzung in der Milz während eines 19d CSC-Experimentes abgebildet. Nach 10h CSC kann man einen starken relativen Rückgang an B220⁺ B-Zellen erkennen (Abbildung 3.6 A). Auch zu allen späteren Zeitpunkten waren B-Zellen reduziert. CD11b⁺ Zellen und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) waren beginnend mit 48h für den Rest des 19d CSC-Versuches prozentual in der Milz erhöht (Abbildung 3.6 B und D) und PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) zu allen Zeitpunkten erhöht (Abbildung 3.6 C). Weiterhin konnte bei PMN-MDSC festgestellt werden, dass sie im Lauf des 19d CSC-Experimentes zunehmend anteilmäßig mehr wurden und in der Milz akkumulierten.

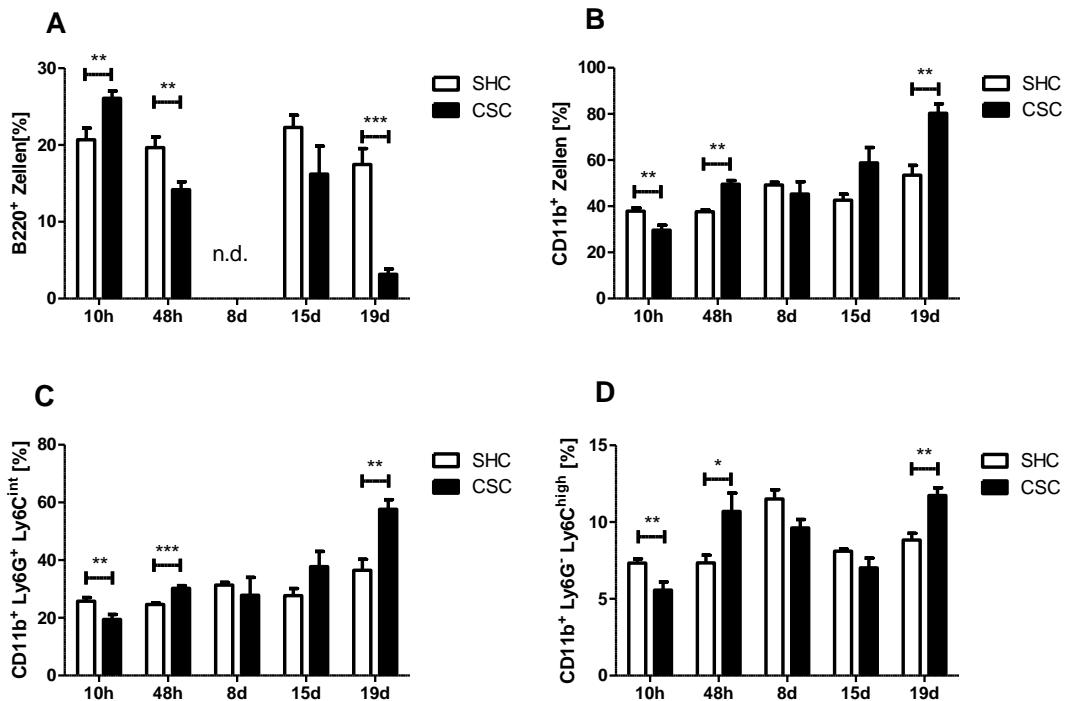


Abbildung 3.7: Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks im Lauf eines 19d CSC-Stress-Versuches:

Von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CSC-Beginn der linke Femur entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zellzusammensetzung untersucht. Analysiert wurden B220⁺ Zellen (A), CD11b⁺ Zellen (B), PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) (C) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) (D). (n.d.: *not determined* (nicht gemessen)); n: 4-14 SHC vs. 4-16 CSC (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

Analog zur Milz wurde der Gehalt an B220⁺ B-Zellen und CD11b⁺ myeloiden Zellen im Knochenmark untersucht (Abbildung 3.7). 10h CSC induzierte einen Rückgang an CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) (Abbildung 3.7 B-D), wohingegen B220⁺ Zellen prozentual erhöht waren (Abbildung 3.7 A). Dieser Effekt drehte sich jedoch schnell um, CD11b⁺ Zellen und beide MDSC-Populationen waren nach 48h und 19d erhöht und B220⁺ B-Zellen reduzierten sich anteilmäßig bis zum Ende des 19d CSC-Versuches um die Hälfte (Abbildung 3.7 A-D). Generell zeigt sich also ab 48h CSC ein ähnliches Bild im Knochenmark wie in der Milz.

3.4 Mechanismen, die zur Akkumulation von CD11b⁺ Zellen in der Milz führen

Im Folgenden wurden Mechanismen und Gründe untersucht, welche die stressinduzierte Akkumulation von CD11b⁺ Zellen in Knochenmark, Blut und Milz erklären könnten. Im Speziellen wurden die Rolle inflammatorischer Zytokine sowie die der beiden Haupt-Stress-Hormone Adrenalin und Corticosteron untersucht.

3.4.1 Die Rolle von IL-6 auf stressinduzierte myeloide Zellen

IL-6 ist ein sowohl pro- als auch anti-inflammatorisches Zytokin, welches von einer Vielzahl von Zelltypen produziert wird. Produzenten sind u.a. Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mast-Zellen und T-Zellen. IL-6 spielt eine wichtige und zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen, ist ein Pyrogen, stimuliert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen als auch die Generierung von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark. Aus diesem Grund sollte in dem folgenden Experiment untersucht werden, ob IL-6 bei dem stressinduzierten Anstieg an CD11b⁺ Zellen eine Rolle spielt. Dazu wurden IL-6^{-/-} Tiere einem regulären 19d CSC-Stress unterzogen und mit SHC-Kontrolltieren verglichen.

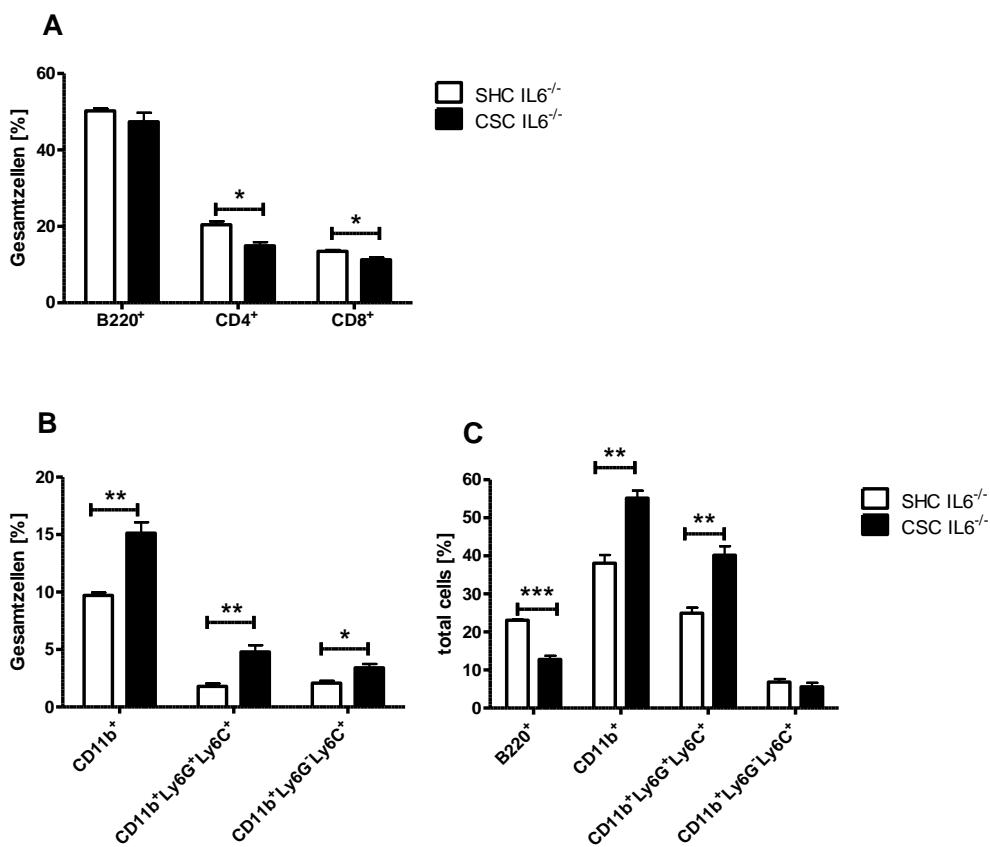


Abbildung 3.8: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen nach 19d CSC in Milz und Knochenmark von IL-6^{-/-} Tieren: Nach 19d CSC wurden die Milzen von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten IL-6^{-/-} Tieren entnommen und deren zelluläre Zusammensetzung untersucht (A und B). Nach 19d CSC wurden der linke Femur von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung untersucht (C). n: 3 SHC vs. 4 CSC (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

In Abbildung 3.8 ist gezeigt, dass IL-6^{-/-} Mäuse, vergleichbar den C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen, auf 19d CSC reagieren (siehe Abbildung 3.1 bis Abbildung 3.3). Im Speziellen waren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen prozentual in der Milz reduziert (Abbildung 3.8 A), CD11b⁺ Zellen und PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) in Milz (Abbildung 3.8 B) und Knochenmark (Abbildung

3.8 C) angestiegen, ebenso wie MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) in der Milz (Abbildung 3.8 B). Da in diesem Experiment jedoch keine SHC- und CSC-Wildtyp-Mäuse untersucht wurden, kann man somit keine Aussage treffen, ob IL-6^{-/-} Mäuse stärker oder schwächer auf chronischen Stress reagierten.

3.4.2 Die Rolle von TNF auf stressinduzierte myeloide Zellen

TNF ist zusammen mit IL-1 eines der ersten Zytokine, die nach Exposition mit bakteriellen Bestandteilen von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen produziert werden. TNF bewirkt die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen, stimuliert Phagozytose-Funktionen von Makrophagen und ist chemotaktisch für neutrophile Granulozyten. Im Gegenzug aktiviert TNF Makrophagen und neutrophile Granulozyten. In der vorangegangenen Masterarbeit wurde bereits die Expression von IL-6, TNF und IL-10 in der Milz mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) nach 19d CSC gemessen (38). Dabei wurde festgestellt, dass neben IL-6 die Expression von TNF in den Milzen der CSC-Tiere erhöht war. Aus diesem Grund wurde die Rolle dieses wichtigen Zytokins in dem stressvermittelten Anstieg an CD11b⁺ Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen untersucht.

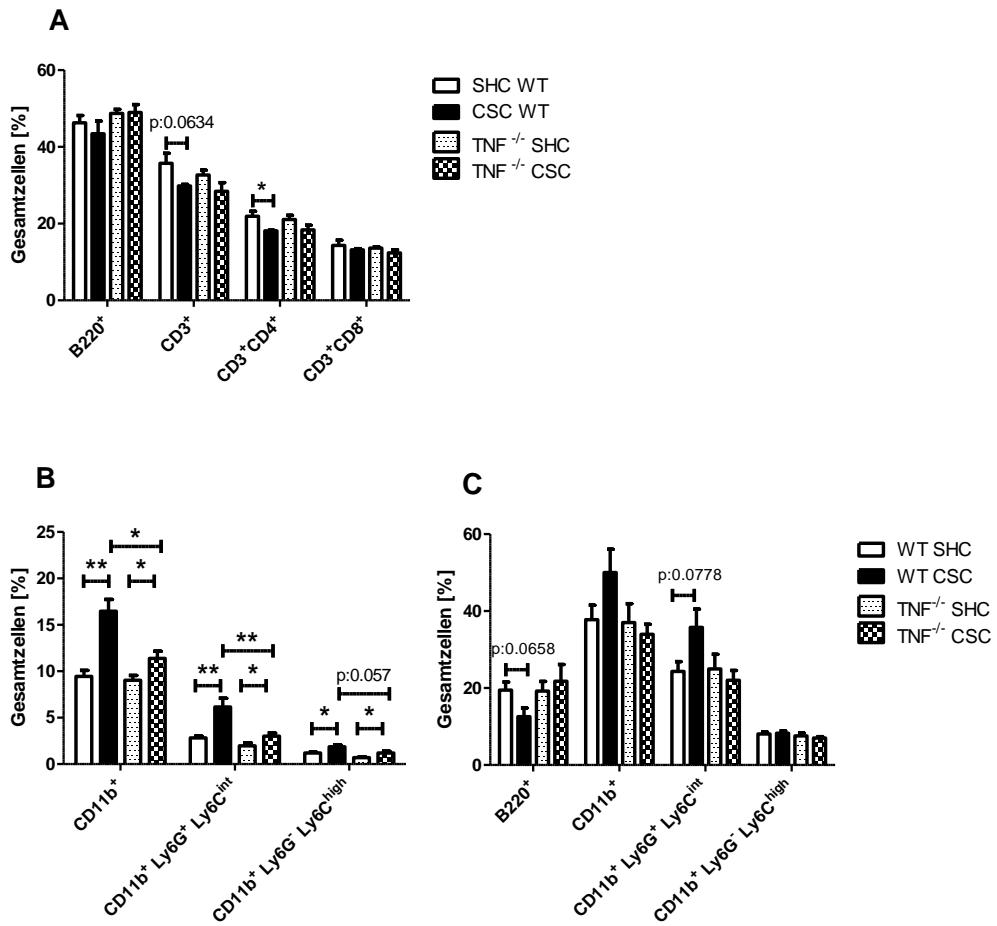


Abbildung 3.9: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen nach 19d CSC in Milz und Knochenmark von Wildtyp- und $\text{TNF}^{-/-}$ Tieren: Nach 19d CSC wurden die Milzen von Wildtyp und $\text{TNF}^{-/-}$ Tieren entnommen und die Zusammensetzung von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren untersucht (A und B). Nach 19d CSC wurden der linke Femur von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung untersucht (C). Gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten, die beide das gleiche Resultat hervorbrachten: n: 8 SHC vs. 8 CSC (*: p<0,05; **: p<0,01; ungepaarter t Test).

Um die Rolle von TNF in dem Stress vermittelten Anstieg an CD11b⁺ Zellen in Milz und Knochenmark zu untersuchen, wurden Wildtyp- und $\text{TNF}^{-/-}$ Mäuse in einem 19d CSC-Stress miteinander verglichen. Dazu wurde die Zellzusammensetzung in Milz (Abbildung 3.9 A und B) und Knochenmark (Abbildung 3.9 C) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich der prozentuale Anteil der CD3⁺ Zellen bzw. CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Milz nur bei Wildtyp-Tieren im Vergleich zu SHC-Tieren reduzierte (Abbildung 3.9A). CD11b⁺ Zellen bzw. PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) waren in beiden Mauslinien nach CSC prozentual erhöht, wobei der Effekt bei $\text{TNF}^{-/-}$ Tieren deutlich geringer ausfiel (Abbildung 3.9 B). MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) waren durch CSC in der Milz ebenso in beiden Mauslinien erhöht; der Unterschied zwischen den beiden Genotypen fiel jedoch zu

gering aus, um Relevanz zu erlangen. Die Zellzusammensetzung im Knochenmark ist mit vorherigen Ergebnissen (Abbildung 3.3) bei Wildtyp-Tieren vergleichbar und es zeigte sich ein Trend zur Reduktion an B-Zellen und einen Anstieg von CD11b⁺ Zellen bzw. PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}). Statistische Signifikanz ergab sich jedoch nicht. Gestresste TNF^{-/-} Tiere dagegen zeigten keine Veränderung in der Zellzusammensetzung im Knochenmark.

3.4.3 Die Rolle von TNFR2 für stressinduzierte myeloide Zellen

In kürzlich erschienenen Publikationen wird angedeutet, dass die Akkumulation von MDSC TNFR2-abhängig ist (39, 40). Weiterhin zeigte sich in Abschnitt 3.4.2 bzw. in Abbildung 3.9, dass TNF^{-/-} Tiere einen geringeren Anstieg an CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC und MO-MDSC nach 19d CSC-Stress aufwiesen als Wildtyp-Mäuse. Dies gab Anlass zu überprüfen, ob dieser stressinduzierte Anstieg an myeloiden Zellen TNFR2 abhängig ist. Analog der Abbildung 3.9 wurden Wildtyp- mit TNFR2^{-/-} Tieren für 19d in einem CSC-Versuch gestresst und immunologische Parameter in primären und sekundären lymphatischen Organen im Anschluss untersucht.

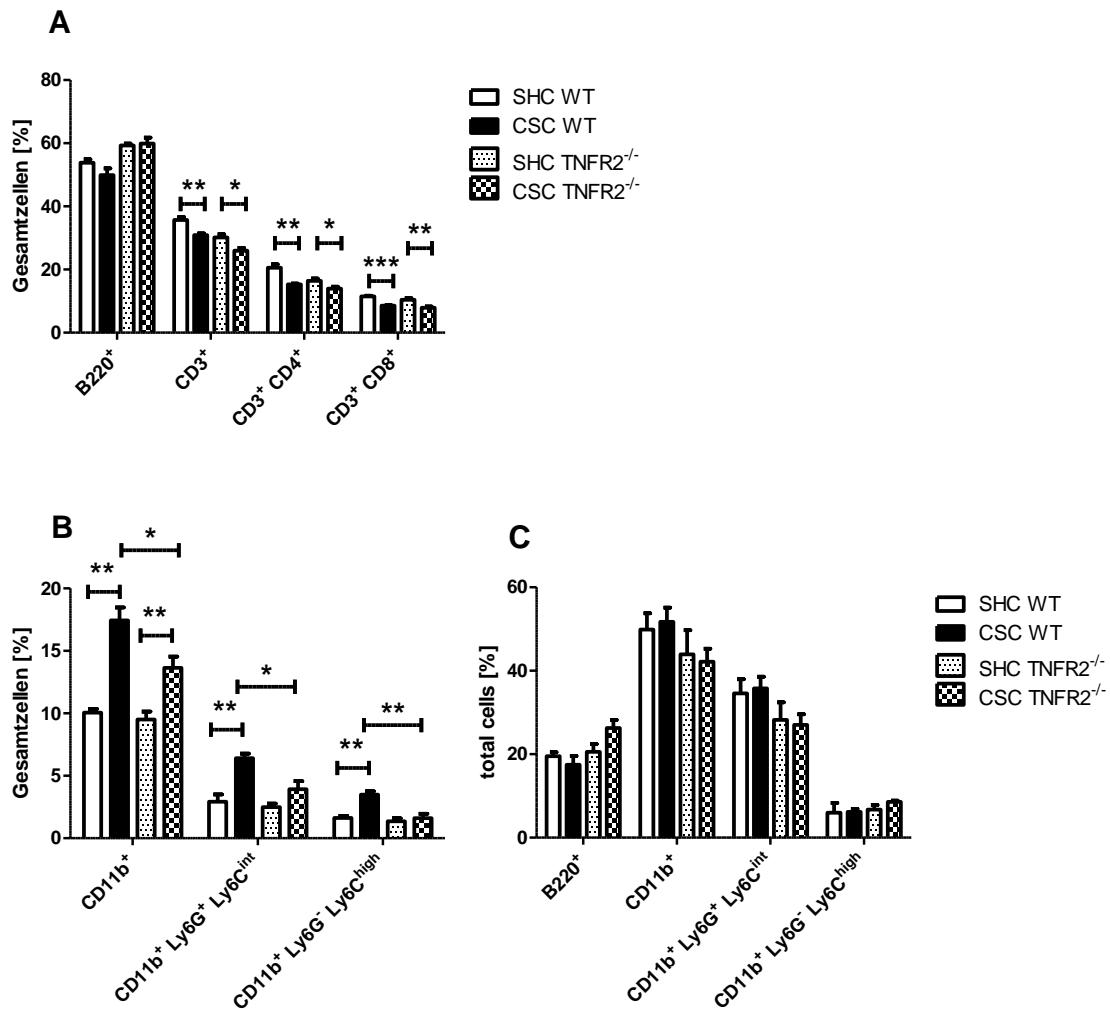


Abbildung 3.10: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen nach 19d CSC in Milz und Knochenmark von Wildtyp- und TNFR2^{-/-} Tieren: Nach 19d CSC wurden die Milzen von Wildtyp- und TNFR2^{-/-} Tieren entnommen und die Zusammensetzung von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren untersucht (A und B). Außerdem wurden der linke Femur von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung mittels Durchflusszytometrie untersucht (C). n: 4 SHC vs. 4 CSC (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

Nach 19d CSC reduzierte sich sowohl in Wildtyp- als auch in TNFR2^{-/-} Tieren der prozentuale Anteil an CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Milz (Abbildung 3.10 A). Gleichzeitig induzierte 19d CSC einen Anstieg an CD11b⁺ myeloiden Zellen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{high}) in den Milzen beider Mauslinien (Abbildung 3.10 B). Der Effekt fiel jedoch in TNFR2^{-/-} Tieren deutlich geringer aus und somit zeigten TNFR2^{-/-} Tiere einen geringeren Anstieg an myeloiden Zellen nach 19d CSC-Stress. Da TNF^{-/-} Tiere analog TNFR2^{-/-} Tieren auf 19d chronischen Stress reagierten, kann man somit festhalten, dass „TNF-signalling“ über TNFR2 eine bedeutende Rolle beim stressvermittelten Anstieg an myeloiden Zellen spielt (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Im

Knochenmark zeigten sich keine nachweisbaren stressvermittelten Änderungen in der zellulären Zusammensetzung der beiden Mauslinien (Abbildung 3.10 C).

3.4.4 GM-CSF und G-CSF induziert Granulozyten bzw. Monozyten/ Makrophagen

GM-CSF und G-CSF sind zwei verwandte Wachstumsfaktoren, die innerhalb kürzester Zeit Granulozyten und Monozyten/Makrophagen bzw. DC aus myeloiden Vorläuferzellen („*common myeloid progenitor*“; CMP) im Knochenmark ausdifferenzieren und in den Blutkreislauf austreten lassen. In der Literatur wird der Vorgang eines rapiden Anstiegs dieser beiden Zytokine nach z.B. der Bindung von LPS an TLR4 auch als „*emergency granulopoiesis*“ bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, dass GM-CSF/G-CSF die Lebensdauer und Effektor-Funktionen von Granulozyten verlängert bzw. steigert und chemotaktisch wirkt. Ziel einer erhöhten Ausschüttung von GM-CSF und G-CSF ist es, innerhalb kürzester Zeit Phagozyten in die Peripherie zu mobilisieren, um eine drohende Infektion mit Bakterien zu unterbinden bzw. ihr entgegenzuwirken. Weiterhin werden Behandlungen mit GM-CSF und G-CSF in den Kliniken bei neutropenischen Patienten nach z.B. einer Chemotherapie eingesetzt. Wie in den vorhergehenden Abbildungen bereits gezeigt, induziert 19d CSC einen Anstieg an myeloiden Zellen in Milz und Knochenmark. Um einen möglichen kausalen Zusammenhang für diese Beobachtung zu erlangen, wurde untersucht, welchen Gehalt das Serum an GM-CSF und G-CSF nach unterschiedlichen Zeiten im CSC-Modell besitzt: Untersucht wurden sowohl Zeitpunkte in der frühen Phase des CSC-Modells nach 10h und 48h (akuter Stress), als auch zu späteren Zeitpunkten bzw. am Ende nach 8, 15 und 19 Tagen (chronischer Stress).

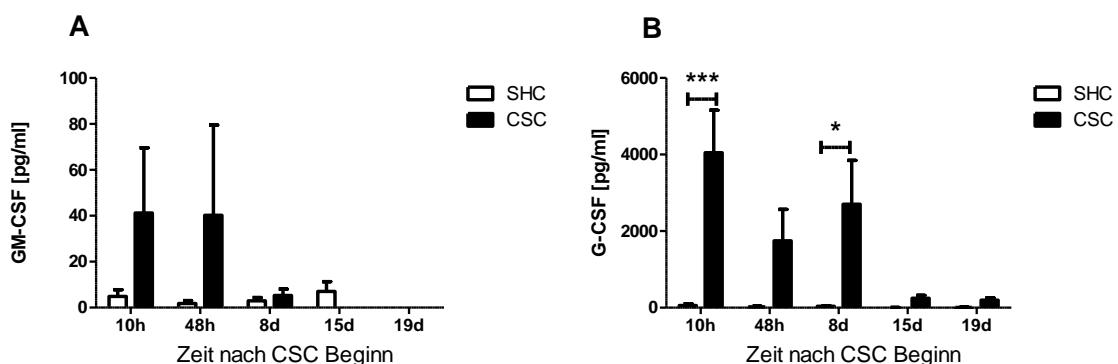


Abbildung 3.11: Der zeitliche Verlauf von GM-CSF und G-CSF im Serum im Lauf der Zeit des Stress-Modelles: GM-CSF (A) und G-CSF (B) wurden im Blut zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn des CSC-Modells im Vergleich zu SHC-Kontrolltieren gemessen. Nach der angegebenen Zeit wurde den Mäusen Blut entnommen und die Seren wurden auf GM-CSF und G-CSF untersucht n: 7-16 SHC vs. 8-18 CSC (*:p<0,05; ***: p<0,001; two-way-ANOVA + Bonferroni posttest).

In Abbildung 3.11 ist der zeitliche Verlauf von GM-CSF (Abbildung 3.11 A) und G-CSF (Abbildung 3.11 B) im Serum im Verlauf des 19d CSC-Stress-Versuches gezeigt. Dabei ist

zu erkennen, dass es zu einem kleinen Anstieg an GM-CSF im Serum nach 11h und 48h in CSC-gestressten Tieren kommt (Abbildung 3.11A), wohingegen G-CSF zwischen 10h und 8d um ein Vielfaches gegenüber SHC-Tieren erhöht ist (Abbildung 3.11 B).

3.5 Die Rolle des sympathischen Nervensystems für stressinduzierte Myelopoese

In einer akuten Stresssituation werden, wie bereits genannt, zwei Haupt-Stress-Achsen aktiviert. Das ist zum einen das sympathische Nervensystem (SNS) und zum anderen die HPA-Achse. Nach Aktivierung des SNS werden innerhalb weniger Momente Adrenalin und Noradrenalin von den chromaffinergen Zellen des Nebennierenmarkes in den Blutkreislauf entlassen, wohingegen nach Aktivierung der HPA-Achse nach ein paar Minuten letztendlich Glucocorticoide aus der Nebennierenrinde entlassen werden. Beide Systeme wurden getrennt blockiert bzw. untersucht, um eine Aussage darüber machen zu können, welches der beiden Systeme für den stressinduzierten Anstieg an CD11b⁺ Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen verantwortlich ist.

Um einen Einfluss des SNS im 19d CSC-Modell auszuschließen, wurden vor dem Versuch durch Injektion von 6-OH-Dopamin sympathische und dopaminerige Neurone von Wildtyp-Mäusen zerstört und die Tiere einem 19d CSC-Stress unterzogen. Kontrollgruppen waren SHC- und CSC-Tiere ohne 6-OH-Dopamin-Behandlung.

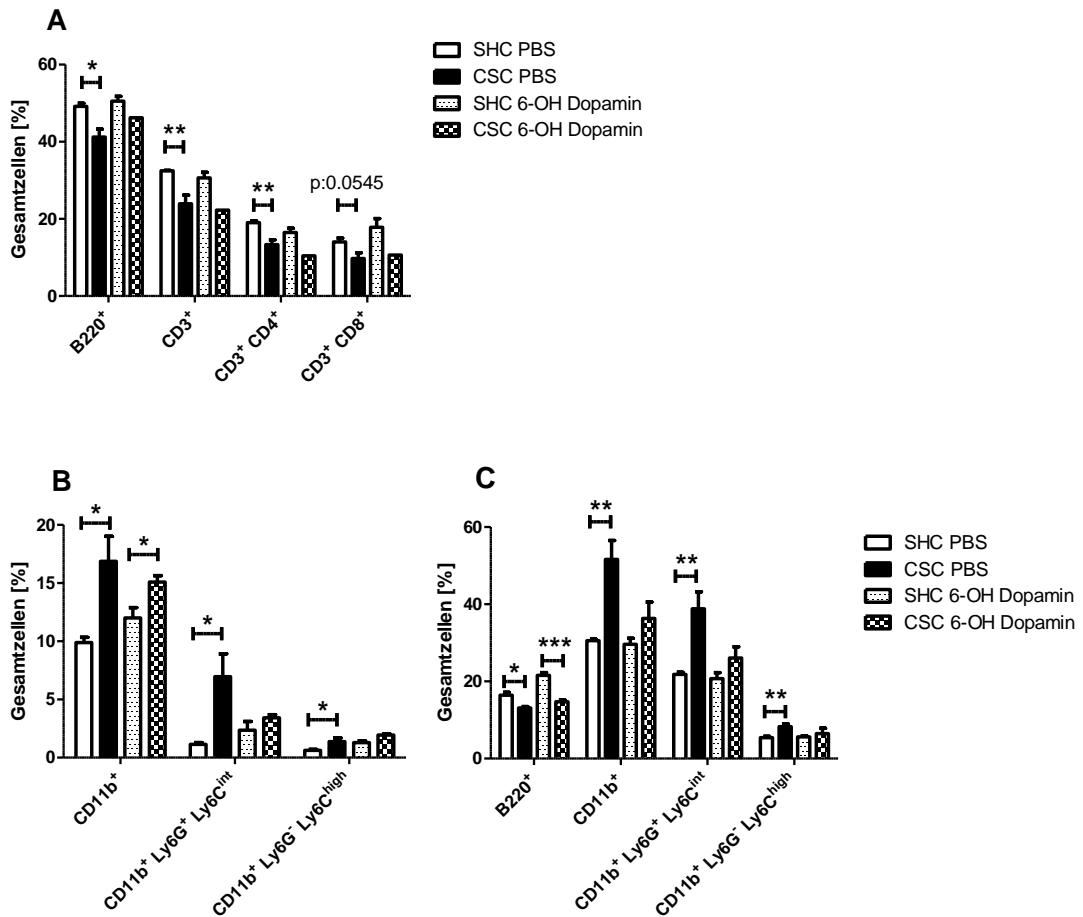


Abbildung 3.12: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen nach 19d CSC in Milz und Knochenmark von 6-OH-Dopamin behandelten Wildtyp-Tieren: Nach 19d CSC wurden die Milzen von PBS- bzw. 6-OH-Dopamin-vorbehandelten SHC- und CSC-Wildtyp-Mäusen entnommen und die Zusammensetzung untersucht (A und B). Zusätzlich wurde der linke Femur von SHC-Kontrolltieren und CSC-gestressten Tieren entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung untersucht (C). n: 8 SHC vs. 8 CSC (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

PBS-behandelte CSC-Tiere zeigten einen typischen Phänotyp nach 19d CSC. Dabei konnte eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen, CD3⁺ und CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.12 A) sowie ein Anstieg an CD11b⁺ myeloiden Zellen (Abbildung 3.12 B) in den Milzen festgestellt werden. Beide myeloide Populationen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}), stiegen prozentual in PBS-behandelten gestressten Tieren an. 6-OH-Dopamin-behandelte Tiere reagierten auf CSC in ähnlicher Weise wie PBS-behandelte CSC-Tiere, mit dem Unterschied, dass alle CSC-vermittelten Effekte wesentlich geringer ausfielen, bzw. nicht eintraten. Eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen, CD3⁺ und CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 3.12 A), eine Erhöhung an CD11b⁺ myeloiden Zellen fiel geringer aus und ein Anstieg an PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) blieb nach CSC komplett aus. Als Resultat lässt

sich somit festhalten, dass Aktivierung des SNS für das Akkumulieren myeloider Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen nach chronischem Stress mitverantwortlich ist.

3.6 Die Rolle der HPA-Achse für stressinduzierte Myelopoese

In der gängigen Literatur und in vielen Publikationen wird der HPA-Achse in Bezug auf psychologischen und psychosozialen Stress große Beachtung gewidmet. Daher wurde die Rolle der HPA-Achse und der Glucocorticoide in diesem Modell untersucht. Glucocorticoide sind potente Modulatoren des Immunsystems und werden in der Klinik oft als Immunsuppressiva bei Autoimmunerkrankungen, allergischen Reaktionen oder bei Organtransplantationen eingesetzt. Reber et al. veröffentlichten zuerst 2006 Daten im CSC-Modell, die zeigten, dass 24h nach CSC-Beginn Plasma-Corticosteron-Werte im Vergleich zu SHC-Tieren erhöht sind (25). Demgegenüber war an Tag 3, 7, 14 und 20 (d.h. nach 2, 6, 13 und 19 Tagen CSC) keine Erhöhung des Corticosteron-Gehaltes feststellbar. Uschold-Schmidt et al. zeigten 2013, dass der primäre Anstieg an Corticosteron ausschließlich nach 10h CSC zu detektieren war, wohingegen nach 48h CSC Plasma-Corticosteron wieder auf Basalniveau zurückkehrte (26). Diese beiden Publikationen begründen ihre Beobachtung damit, dass der Körper nach dem initialen Corticosteron-Peak eine Art Schutzmechanismus gegen einen schädlichen Hyper-Corticoismus entwickelt. Was jedoch hier unbeachtet bleibt, ist, dass für die Corticosteron-Bestimmung keine Zeitpunkte direkt nach dem ersten oder zweiten Wechsel zu einem neuen, unbekannten Residenten analysiert wurden, sondern ausschließlich Zeitpunkte 24 Stunden vor dem Wechsel (Tag 7 und 14). Aus diesem Grund wurde der Gehalt an Corticosteron im Serum jeweils 24 Stunden nach einem Wechsel zu einem neuen Residenten untersucht, um zu analysieren, ob CSC-gestresste Tiere immer noch mit einer Corticosteron-Ausschüttung reagieren.

3.6.1 Konfrontation mit einem zweiten und dritten Residenten induziert jeweils einen Anstieg an Corticosteron im Blut

Um die beiden Zeitpunkte, 24 Stunden nach dem ersten und zweiten Resident-Wechsel zu untersuchen, wurde CSC gestartet, wurden CSC-Tiere nach sieben bzw. 14 Tagen zu einem zweiten bzw. dritten Residenten gesetzt und wurde genau 24 Stunden im Anschluss Serum gewonnen, um den Gehalt an Corticosteron zu ermitteln.

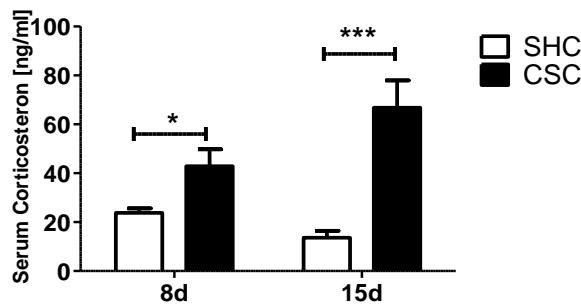


Abbildung 3.13: Gehalt an Corticosteron im Serum nach 8d und 15d: Gezeigt ist der Gehalt an Corticosteron im Serum, 24 Stunden nach dem ersten (8d) bzw. zweiten (15d) Resident-Wechsel: jeweils 8 SHC vs. 8 CSC Tiere pro Zeitpunkt (*: p<0,05; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

Es wurde festgestellt, dass CSC-gestresste Tiere immer noch mit einem Anstieg an Corticosteron im Blut nach Exposition zu einem neuen, unbekannten Residenten reagieren (Abbildung 3.13). Dies war sowohl nach 8 Tagen zu beobachten, wo zuvor der Wechsel zum zweiten, unbekannten Residenten erfolgt war, als auch nach 15 Tagen, nach dem Wechsel zum dritten. Als Resultat ist hier festzuhalten, dass es innerhalb eines 19 Tage CSC-Stress-Versuches zu mindestens drei Corticosteron-Peaks kommt: Am ersten Tag, direkt nach dem Beginn, am siebten Tag, nach dem Wechsel auf den zweiten bzw. am vierzehnten Tag, nach dem Wechsel auf den dritten Residenten.

3.6.2 Akute Behandlung mit Glukokortikoiden imitiert akuten CSC-Stress

Im Weiteren wurde die akute Wirkung von Glucocorticoiden in Bezug auf den stressinduzierten Anstieg an myeloiden Zellen untersucht. Hypothese ist hier, dass Glucocorticoide CD11b⁺ Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen anteilmäßig ansteigen lassen. Dabei wurde Dexamethason als potentes, synthetisches Glukokortikoid in naive, unbehandelte Mäuse injiziert, um eine kurzzeitige, akute Ausschüttung von Glucocorticoiden zu imitieren. In den vorherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass bereits 10 oder 48 Stunden andauernder CSC-Versuch genügten, um myeloide Zellen in der Milz anteilmäßig ansteigen zu lassen. Ziel dieses Experimentes war es hier zu untersuchen, ob man durch eine einmalige Gabe von Dexamethason gleiche Effekte beobachten kann. Dazu wurden Mäuse mit PBS als Kontrolle bzw. mit Dexamethason injiziert und nach 18 Stunden wurden immunologische Parameter in Milz, Blut und Knochenmark gemessen.

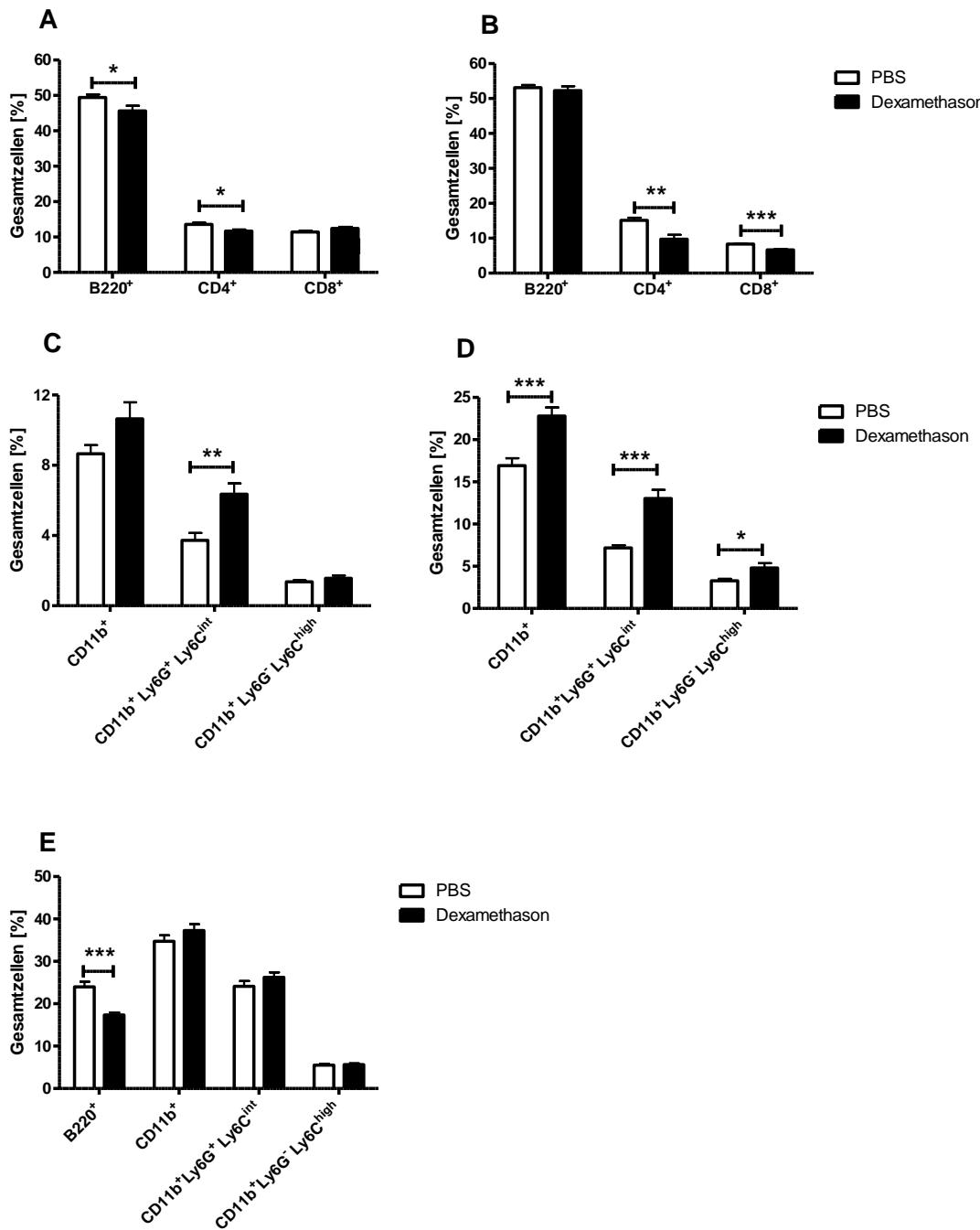


Abbildung 3.14: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen in Milz, Blut und Knochenmark nach akuter Behandlung mit Dexamethason von Wildtyp-Tieren: 18h nach Dexamethason-Behandlung wurden die Milzen (A und C) und Blut (B und D) von PBS- bzw. dexamethason-behandelten Wildtyp-Mäusen entnommen und die zelluläre Zusammensetzung untersucht. Außerdem wurden der linke Femur der Tiere entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung untersucht (E). n: 12 PBS vs. 12 Dexamethason (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

Eine einmalige Behandlung mit Dexamethason induzierte vergleichbare Ergebnisse wie man sie zuvor bei akutem Stress von 10 Stunden erzielte (siehe Abbildung 3.6). Dabei wurde festgestellt, dass in den Milzen von dexamethason-behandelten Tieren B220⁺ B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen relativ reduziert waren, wohingegen PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int})

angestiegen waren (Abbildung 3.14 A und C). Im Blut waren prozentual CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen reduziert, wohingegen CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) erhöht waren (Abbildung 3.14 B und D). Im Knochenmark wurde ein Rückgang an B220⁺ B-Zellen ermittelt (Abbildung 3.14 E).

3.6.3 Chronische Behandlung mit Glukokortikoiden imitiert 19 Tage CSC

Wie zuvor im Abschnitt 3.6.1 bzw. in Abbildung 3.13 gezeigt wurde, kommt es nach der Exposition der vier Intrudor-Mäuse zu einem neuen, unbekannten Residenten zu einem Anstieg an Corticosteron im Blut und man erhält demzufolge drei Peaks an Glukokortikoiden innerhalb eines 19 Tage CSC-Versuches. Diese Anstiege ereignen sich am ersten Tag, nach sieben und nach 14 Tagen. In einem weiteren Versuch sollte nun geklärt werden, ob man diesen Effekt durch eine dreimalige Behandlung mit Dexamethason von naiven Tieren imitieren kann. Dafür wurden Wildtyp-Mäuse mit Dexamethason bzw. mit PBS als Kontrolle an den gleichen Tagen behandelt, an denen auch ein Wechsel des Residenten stattfinden sollte, und nach 19 Tagen wurden immunologische Parameter ermittelt.

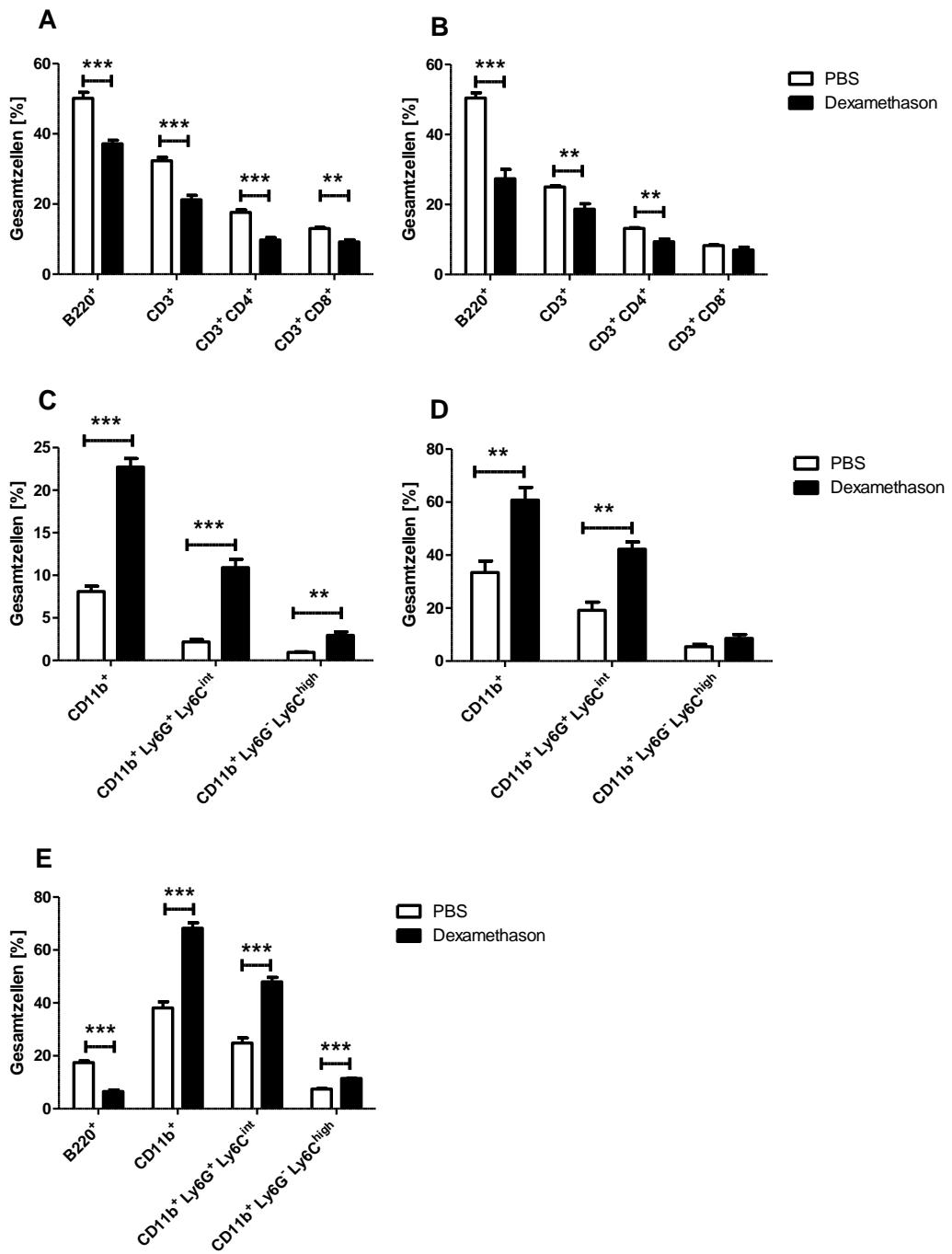


Abbildung 3.15: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen in Milz, Blut und Knochenmark nach chronischer Behandlung mit Dexamethason von Wildtyp-Tieren: 19 Tage nach dreimaliger Behandlung mit Dexamethason wurden die Milzen (A und C) und Blut (B und D) von PBS- bzw. dexamethason-behandelten Wildtyp-Mäusen entnommen und die zelluläre Zusammensetzung untersucht. Außerdem wurden der linke Femur der Tiere entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung untersucht (E). n: 4 PBS vs. 4 Dexamethason (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test).

Nach der chronischen Behandlung mit hohen Dosen an Glukokortikoiden konnten qualitativ die gleichen Ergebnisse wie in einem regulären 19d CSC-Stress-Versuch festgestellt werden. In der Milz waren nach dreimaliger Dexamethason-Behandlung B220⁺ B-Zellen, CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺, sowie CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen prozentual reduziert (Abbildung 3.15 A). Mit

Ausnahme der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen waren im Blut die gleichen Effekte wie in der Milz zu erkennen (Abbildung 3.15B). In Milz und Blut erhöhten sich CD11b⁺ Zellen und PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) sowie die MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) in der Milz (Abbildung 3.14 C und D). Im Knochenmark reduzierten sich B220⁺ B-Zellen, wohingegen CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) nach Dexamethason-Behandlung anstiegen (Abbildung 3.15 E).

3.6.4 Glukokortikoide induzieren einen Anstieg an G-CSF im Serum

Wie bereits im Abschnitt 3.4.4 und in Abbildung 3.11 gezeigt wurde, kommt es in der frühen Phase des CSC-Versuches zwischen zehn und 48 Stunden nach Beginn zu einem enormen Anstieg an G-CSF im Serum. Im folgenden Experiment sollte analysiert werden, ob man diesen stressinduzierten Effekt durch eine einmalige Behandlung mit Dexamethason imitieren kann. Dazu wurde C57Bl/6-Mäusen Dexamethason injiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Gehalt an G-CSF im Serum analysiert. Um einen zusätzlichen Stresseffekt durch wiederholte Entnahme von Blut zu vermeiden, wurde jedes Tier nur an einem Zeitpunkt analysiert bzw. dem Tier Blut abgenommen. Man erhält somit sechs verschiedene Gruppen an Tieren, die zwischen null und 24 Stunden nach Dexamethason-Behandlung analysiert wurden.

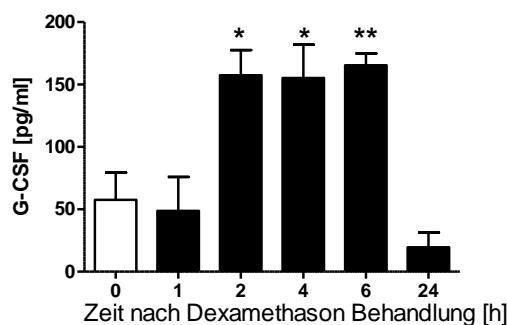
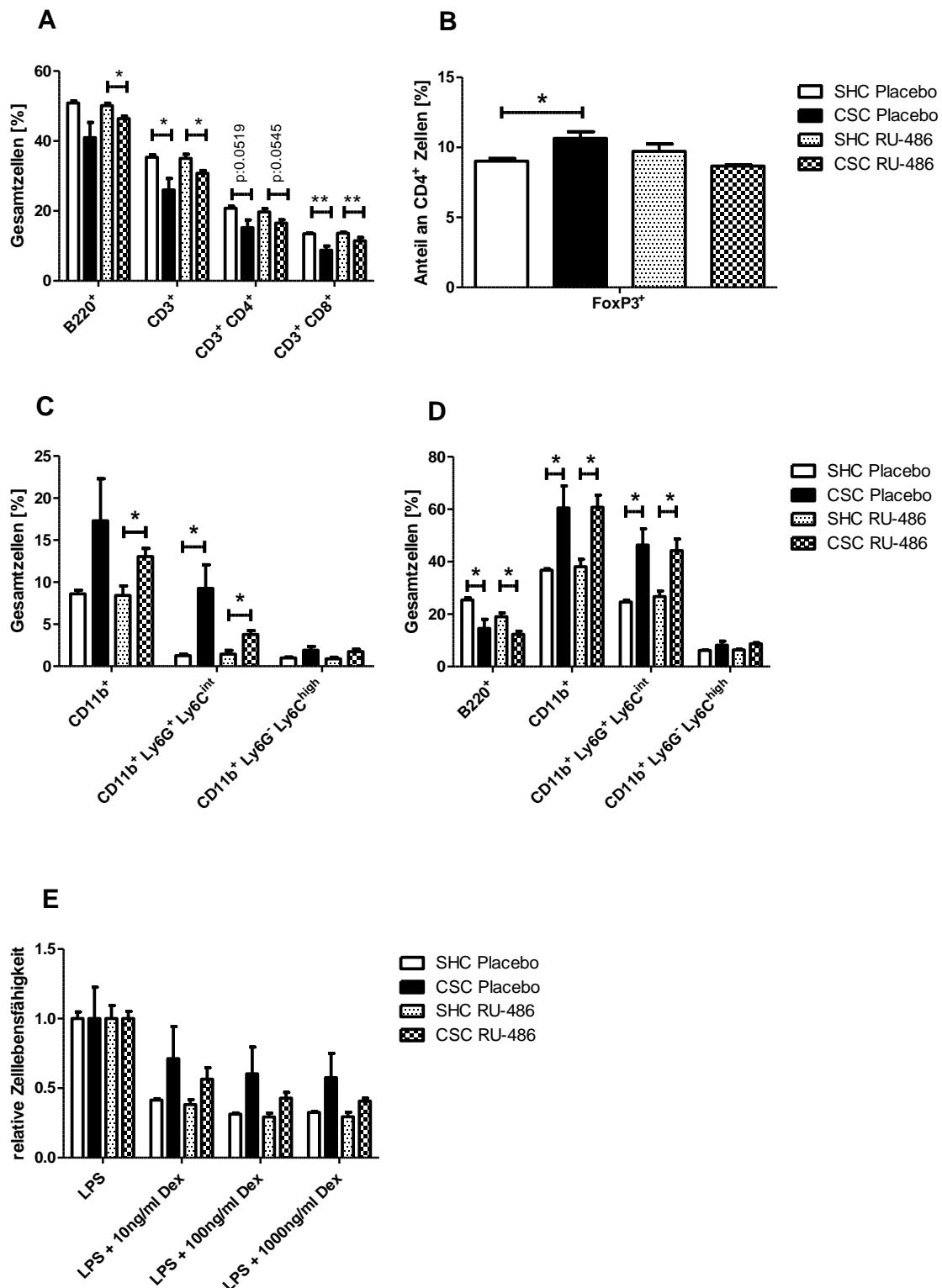


Abbildung 3.16: Der Gehalt an G-CSF im Serum nach einmaliger Gabe von Dexamethason: Naive männliche Mäuse wurden mit Dexamethason behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten hinsichtlich des Gehalts an G-CSF im Serum analysiert. Verglichen wurde der Gehalt an G-CSF von dexamethason-behandelten (schwarze Balken) mit unbehandelten Tieren (weißer Balken). n: 4 Tiere pro Zeitpunkt (*: p<0,05; **: p<0,01; ungepaarter t Test).

Im Ergebnis zeigte sich, dass es zwischen zwei und sechs Stunden nach Dexamethason-Behandlung zu einem Anstieg an G-CSF im Serum kam. Dabei verdreifachte sich der G-CSF- Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Zeitpunkt null). Die Höhe des erzielten Peaks an G-CSF fiel jedoch weit geringer aus als zuvor im CSC-Modell gemessen wurde (Abbildung 3.11).

3.6.5 Blockade der HPA-Achse mit einem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten

In einer physiologischen Stress-Antwort des Körpers werden u.a. die beiden Haupt-Stress-Systeme aktiviert: Das ist zum einen das SNS und zum anderen die HPA-Achse. Im Abschnitt 3.5 bzw. in der Abbildung 3.12 wurde durch Injektion von 6-OH-Dopamin die Wirkung des SNS unterbunden und man konnte als Effekt eine reduzierte immunologische Stress-Antwort feststellen. Dieses Ergebnis zeigt eine relevante Beteiligung des SNS an der stressvermittelten Myelopoese. Im Weiteren sollte nun näher auf die HPA-Achse eingegangen werden: Ziel war es, analog Abschnitt 3.5 die Wirkung der HPA-Achse zu unterbinden, um eine Aussage treffen zu können, in welchem Maß Glucocorticoide an den stressvermittelten Veränderungen des Immunsystems beteiligt sind. In den vorangegangenen Abschnitten 3.6.2 bis 3.6.4 wurde eine Aktivierung der HPA-Achse durch Injektion von Dexamethason imitiert. Das folgende Experiment sollte nun durch ein Ausschlussverfahren die aktive Beteiligung beweisen. Zu diesem Zweck wurde der Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist RU-486 (Mifepriston) als „*time-release Pellet*“ in Mäuse implantiert. Der Grund, warum ein „*time-release Pellet*“ in diesem Experiment verwendet wurde, ist, dass es zu vermeiden gilt, täglich von neuem RU-486 zu injizieren und die Tiere so unnötigem Stress auszusetzen. Der Vorteil von solch einem Pellet ist es, dass es kontinuierlich eine gewünschte Substanz in einer definierten Menge an den Organismus abgibt und als eine Art Depot wirkt. Dazu wurde ein 26 Tage-Pellet entwickelt, das nach Implantation während des gesamten CSC-Experiments (sieben Tage Erholungsphase plus 19 Tage CSC) 1 mg/Tag entlässt. Demzufolge wurde ein 26 Tage-Pellet mit 26 mg Wirkstoff für dieses Experiment gewählt. Kontroll-Tiere waren SHC- und CSC-Tiere mit einem Placebo- Pellet, welches keinen Wirkstoff, sondern nur die Matrix des Pellets enthielt. Somit ergaben sich vier Gruppen mit jeweils vier Tieren pro Gruppe. Dieses Experiment wurde unabhängig zweimal durchgeführt.



F**G**

Abbildung 3.17: Zusammensetzung an Lymphozyten und myeloiden Zellen nach 19d CSC in Milz und Knochenmark von RU-486-behandelten Wildtyp-Tieren: Sieben Tage vor einem 19 Tage CSC-Versuch wurde der Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist RU-486 (Mifepriston) als 26 Tage-„time-release pellet“ bzw. ein Placebo-Pellet ohne Wirkstoff s.c. in naive Mäuse implantiert. Ein regulärer 19 Tage CSC-Versuch wurde durchgeführt und im Anschluss wurden die Milzen (A bis C) entnommen und die zelluläre Zusammensetzung untersucht. Außerdem wurden der linke Femur der Tiere entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und die Zusammensetzung untersucht (D). Nach Beendigung des 19 Tage CSC-Versuches wurde die Glucocorticoid-Resistenz von LPS-stimulierten Gesamt-Milzzellen *in vitro* für 48h anhand der Lebendzellzahl gemessen (E). Repräsentative Bilder von placebo-implantierten Tieren (F) bzw. RU-486-Pellet-implantierten Tieren (G) sind gezeigt, die das verbleibende Placebo- bzw. RU-486-Pellet nach 19d CSC zeigen. n: 8 SHC vs. 8 CSC (*: p<0,05; ungepaarter t Test).

Nach 19 Tagen CSC wurden jedoch in beiden Pellet-Gruppen stressvermittelte Veränderungen in primären und sekundären lymphatischen Organen festgestellt. In den Milzen von CSC-gestressten Placebo- und RU-486-Tieren wurde ein prozentualer Rückgang an CD3⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen registriert (Abbildung 3.17 A). Während sich B220⁺ B-Zellen in RU-486-Tieren relativ reduziert zeigten, stiegen FoxP3⁺ T_{Reg} innerhalb der CD4⁺ Population nur bei Placebo-Tieren an und waren bei RU486-behandelten Tieren nicht erhöht (Abbildung 3.17 B). Bezuglich myeloider Zellen waren anteilmäßig CD11b⁺ Zellen in RU-486-implantierten CSC-Tieren erhöht, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) in der Milz waren dagegen sowohl in der Placebo- als auch in der RU-486-Gruppe erhöht (Abbildung 3.17 C). Im Knochenmark reduzierten sich in beiden Gruppen B220⁺ B-Zellen, wohingegen CD11b⁺ Zellen und PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) nach CSC erhöht waren (Abbildung 3.17 D). Reber et al. stellten 2006 fest, dass nach 19 Tagen CSC-gestresste Tiere eine Glucocorticoid-Resistenz entwickeln (25). Darunter ist zu verstehen, dass die Lebensfähigkeit von LPS-stimulierten Milz-Zellen gestresster Tiere nicht mehr durch Glucocorticoide verringert werden kann bzw. diese Zellen sich langsamer/weniger supprimieren lassen als solche Zellen, die aus nicht-gestressten Tieren stammen.

Glucocorticoide wirken in hohen Dosen toxisch auf Lymphozyten und verringern deren Lebensfähigkeit. Dieser Test wurde in diesem Experiment durchgeführt, weil im Voraus nicht sicher war, ob das RU-486-Pellet funktionieren und ob die Substanz in die Tiere wie gewünscht freigesetzt würde. Bei funktionierendem Pellet sollte sich keine Resistenz von LPS-stimulierten Milz-Zellen in dieser Gruppe mehr entwickeln können, da Glucocorticoid-Wirkung aufgrund der besetzten Rezeptoren nicht eintreten kann. In Abbildung 3.17 E ist gezeigt, dass sowohl die gestresste Placebo- als auch die gestresste RU-486-Gruppe eine Glucocorticoid-Resistenz aufweisen, die sogar bei den RU486-behandelten Tieren stärker zu sein scheint. Somit scheint es fraglich, ob das RU-486-Pellet tadellos funktionierte. In Abbildung 3.17 F und Abbildung 3.17 G sind jeweils ein repräsentatives Placebo- bzw. RU-486-Pellet abgebildet, das nach Beendigung des Versuches in den geöffneten Tieren fotografiert wurde. Dabei ist zu erkennen, dass das Placebo-Pellet sich komplett bis auf eine verbleibende Matrix aufgelöst hat (Abbildung 3.17 F), wohingegen das RU-486-Pellet unverändert scheint (Abbildung 3.17 G). Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt, wobei sich das gleiche Ergebnis in beiden Experimenten einstellte.

3.7 Die Rolle von stressinduzierten MDSC in sekundären Erkrankungen nach CSC

Im Weiteren wurde untersucht, welche Rolle die stressinduzierten myeloiden Zellen für sekundäre Erkrankungen im Anschluss nach CSC-Stress spielen. Myeloide Zellen und im Speziellen MDSC wurden, wie bereits oben erwähnt, ursprünglich vermehrt in Patienten gefunden, die an einem Tumor erkrankt sind. Es hat sich gezeigt, dass diese Zellen eine entscheidende Rolle in der Verhinderung einer adäquaten Anti-Tumor-Immunantwort spielen. Dies gab Anlass, die Relevanz dieser induzierten myeloiden Zellen nach CSC-Stress zu untersuchen, wenn Tumorzellen in SHC-Kontrolltiere bzw. CSC-gestresste Mäuse transplantiert werden.

3.7.1 Der Einfluss von Stress auf Tumorwachstum (23 Tage)

Es wurde ein 19 Tage CSC-Versuch durchgeführt, die SHC- und CSC-Tiere wurden einzeln gesetzt und die zelluläre Zellzusammensetzung im Blut wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert, um eine Aussage darüber zu treffen, ob CSC-gestresste Mäuse eine erhöhte Anzahl an myeloiden Zellen im Blut besitzen. Am Folgetag wurden den Mäusen Fibrosarkoma-Zellen unter die Haut injiziert, um ein Tumorwachstum zu initiieren. Das Tumorwachstum wurde während der folgenden 23 Tage verfolgt und die Größe während dieser Zeit laufend festgehalten.

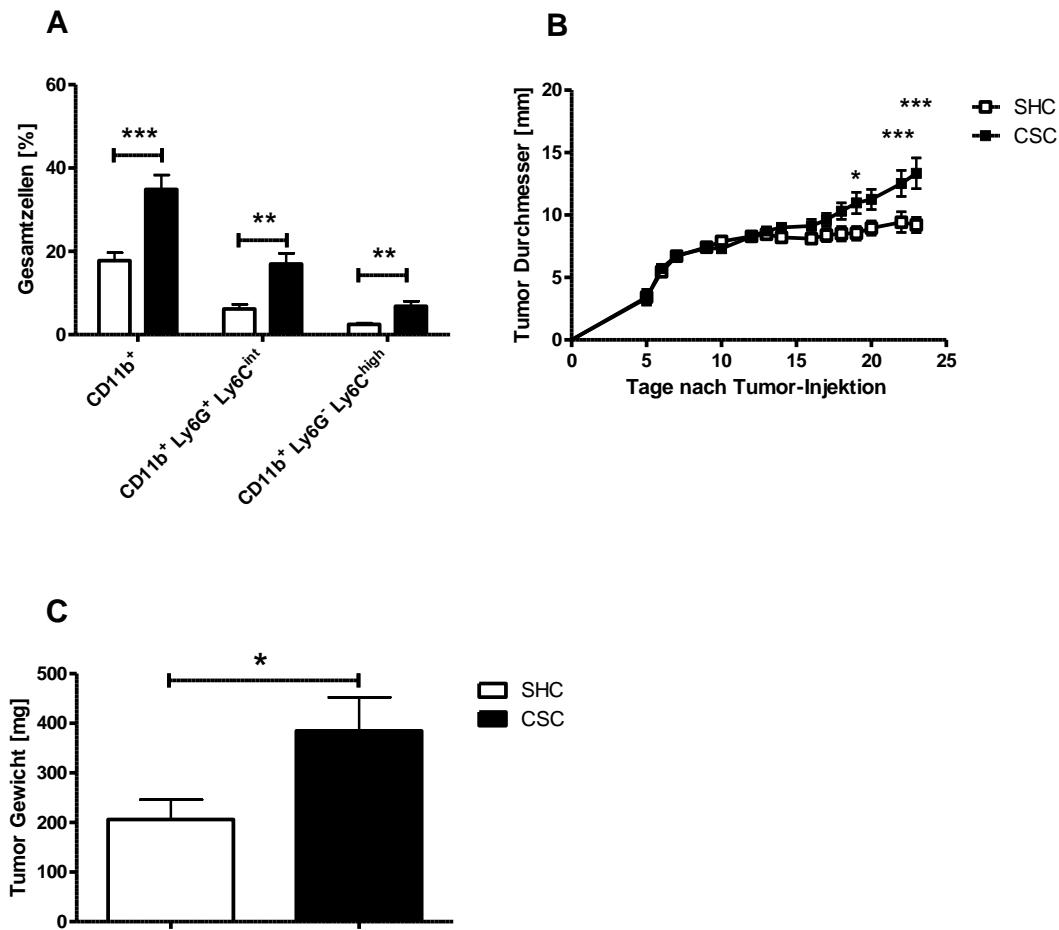


Abbildung 3.18: Der Einfluss von 19d CSC-Stress auf das Wachstum eines Fibrosarkoms: Nach 19d CSC wurden SHC- und CSC-Tiere einzeln gesetzt, die Zellzusammensetzung des Blutes mittels Durchflusszytometrie untersucht und am Folgetag Tumorzellen („C57Bl/6 fibrosarcoma-1“-Zellen, BFS1) unter die Haut injiziert. Myeloide Zellen wurden im Blut nach 19d CSC quantifiziert, um eine Aussage über einen erfolgreichen CSC-Versuch zu treffen (A). Der mittlere Tumordurchmesser wurde an den angegebenen Tagen nach Tumorinjektion ermittelt (B). Nach 23 Tagen Tumorwachstum wurde das Tumorgewebe isoliert und das Gesamtgewicht ermittelt (C). n: 7 SHC vs. 8 CSC (A und C: *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ungepaarter t Test) (B: *:p<0,005; ***:p<0,001; 2 way ANOVA + Bonferroni posttest).

Die zelluläre Analyse im Blut direkt nach 19d CSC zeigte einen gewohnten Anstieg an myeloiden Zellen (Abbildung 3.18 A). Dabei waren CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) sowie MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) im Blut von CSC-Tieren um nahezu das Doppelte erhöht. Bezuglich des darauffolgenden Tumorwachstums wurde festgestellt, dass Tumore aus CSC-Tieren in einem Zeitraum von über 23 Tagen deutlich an Größe im Vergleich zu solchen aus SHC-Tieren zunahmen (Abbildung 3.18 B). Das Tumorwachstum war in den ersten Tagen nach Inoculum in beiden Gruppen vergleichbar. Jedoch zwischen 15 und 20 Tagen nach Injektion begannen Tumore aus CSC-Tieren schneller zu wachsen und nahmen bis zum Ende des Versuches deutlich an Größe zu. Die gesteigerte Größe der Tumore korrelierte mit dem Gesamtgewicht des Tumorgewebes, das man nach 23 Tagen Wachstum aus SHC- und CSC-Tieren isolierte (Abbildung 3.18 C).

3.7.2 Funktionelle Analyse von MDSC, isoliert nach Tumor (23 Tage)

Aus den Milzen von SHC- und CSC-Tieren, denen Tumorzellen gesetzt und die 23 Tage lang beobachtet wurden, wurden PMN-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{int}$) und MO-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^+$) isoliert und deren suppressive Wirkung auf proliferierende T-Zellen analysiert. Der Grund, warum MDSC aus der Milz isoliert wurden ist, dass diese Zellen in naiven Tieren nur eine geringe suppressive Wirkung aufweisen (38). Ziel war es zu untersuchen, ob der Stress-Status zusammen mit dem Tumorwachstum Auswirkungen auf funktionelle Charakteristika der myeloiden Zellen der Milz hat. Weiterhin wurde die zelluläre Zusammensetzung der Milz nach 19 Tage CSC plus 23 Tagen Tumorwachstum untersucht.

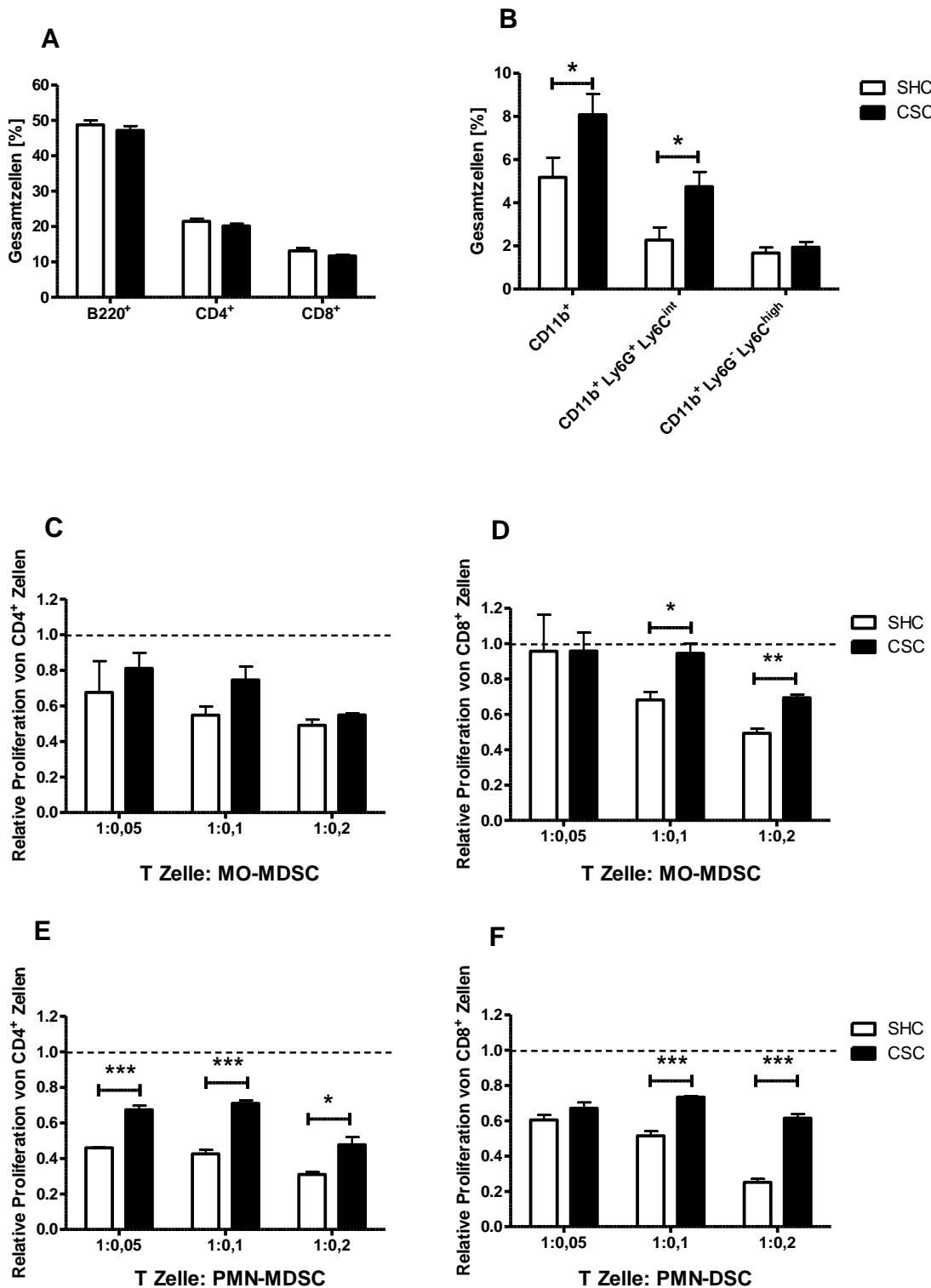


Abbildung 3.19: Zelluläre und funktionelle Analyse von Milz-Zellen 23 Tage-lang tumortragender SHC- und CSC-Tiere: Die Milzen von tumortragenden SHC- und CSC-Tieren wurden nach 23 Tagen Tumorwachstum isoliert, die zelluläre Zusammensetzung bestimmt und MDSC isoliert. Lymphozyten (A) und myeloide Zellen (B) wurden in Milzzellsuspensionen von tumortragenden SHC- und CSC-Tieren quantifiziert. MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺) wurden aus der Milz isoliert und ihre supressive Aktivität auf CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Zellen analysiert. Analog wurden PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) aus der Milz auf ihre Supressivität gegenüber CD4⁺ (E) und CD8⁺ (F) T-Zellen untersucht. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Proliferation von CD4⁺

und CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von MO-MDSC bzw. PMN-MDSC. n: 7 SHC vs. 8 CSC Tiere (*:p<0,005; **:p<0,001; ungepaarter t Test).

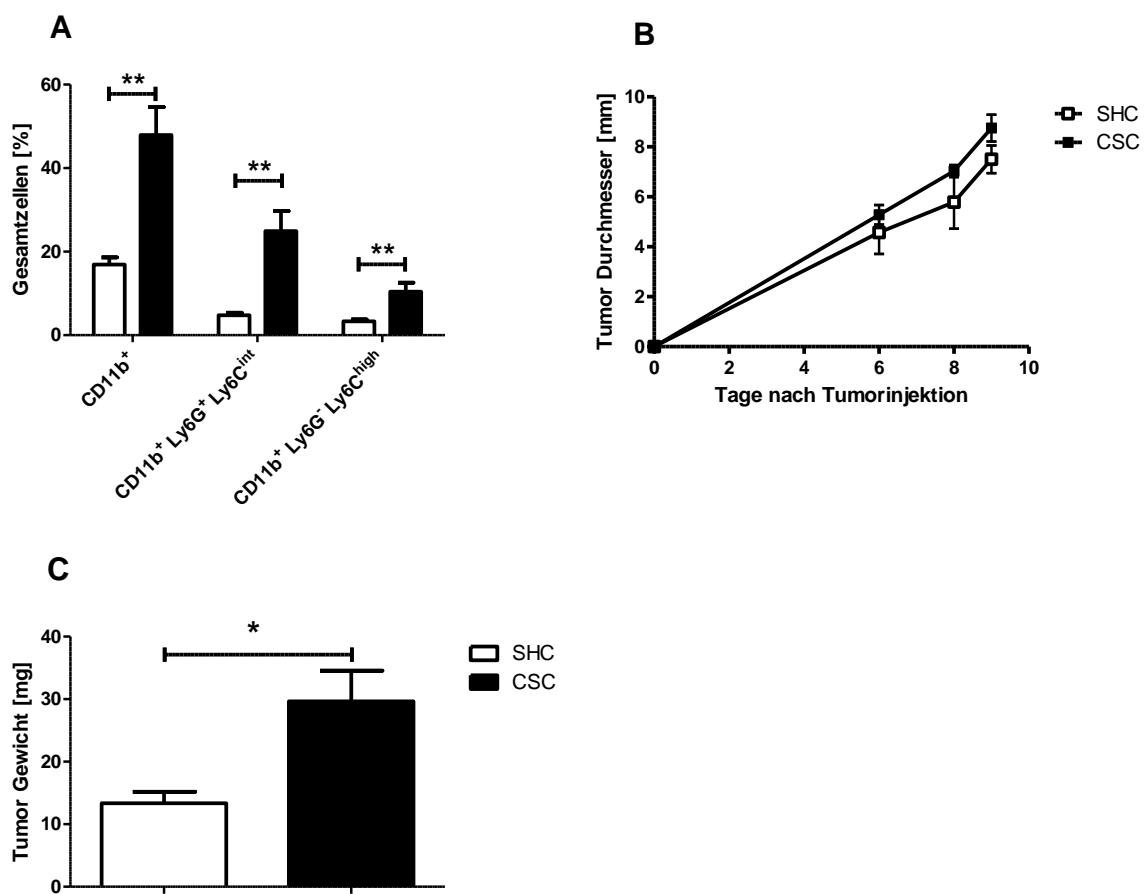
Eine durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung von Milzen tumortragender SHC- und CSC-Tiere zeigte gleiche Mengen an B220⁺ B-Lymphozyten sowie eine unveränderte Menge an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 3.19 A). Betrachtet man demgegenüber myeloide Zellen, so waren in CSC-gestressten Tieren CD11b⁺ Zellen sowie PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) prozentual vermehrt (Abbildung 3.19 B). Funktionell zeigten sich sowohl PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) als auch MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) aus der Milz stressunabhängig suppressiv gegenüber proliferierenden T-Zellen (Abbildung 3.19 C bis F), wobei MDSC aus SHC-Tieren suppressiver waren als solche aus CSC-Tieren.

3.7.3 Untersuchung der CSC-induzierten tumorfördernden Mechanismen

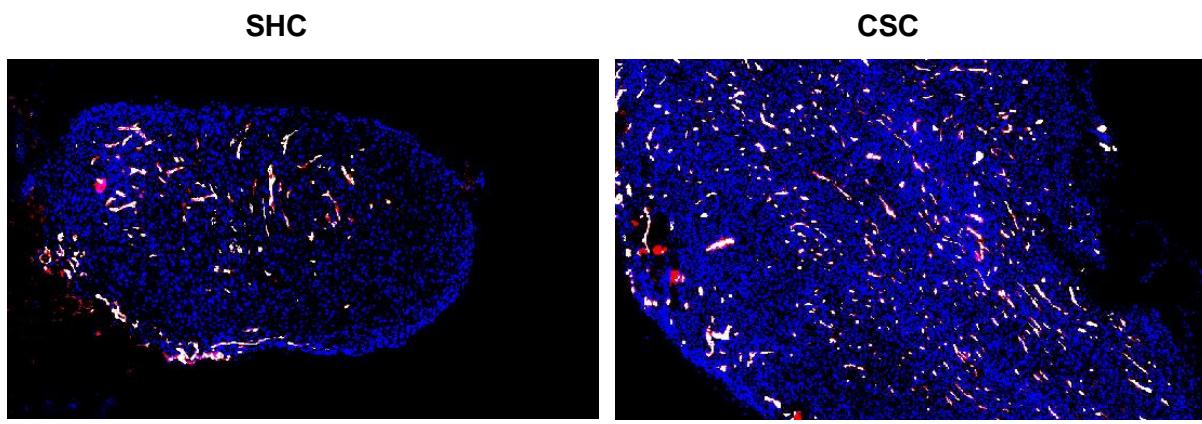
Im Weiteren stellte sich die Frage nach den Mechanismen, die nach 19d CSC injizierte Tumorzellen schneller zu einem soliden Tumor wachsen lassen. Aus der Tumorforschung ist bekannt, dass das Tumorwachstum rapide zunimmt, sobald die „Angiogenese“ abgeschlossen ist. Dieser Vorgang beschreibt die Versorgung des Tumorgewebes durch Anlegen neuer Blutgefäße. Gefördert wird dieser Vorgang vor allem durch VEGF, FGF („*fibroblast growth factor*“), TGF- β , eNOS („*endothelial nitric oxide synthases*“) und COX2 („*cyclooxygenase-2*“). Wachsende Krebszellen sind aufgrund ihrer hohen Teilungsrate abhängig von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Diese werden durch neu gebildete Gefäße in das primäre Tumorgewebe eingebracht und somit sind die wenigen Krebszellen in der Lage zu expandieren und bei soliden Tumoren ein großes Tumorgewebe zu bilden.

Um nun Ursachen zu untersuchen, die in CSC-gestressten Tieren zu einem schnelleren und gesteigerten Tumorwachstum führen, wurde ein früherer Zeitpunkt als der des 23 Tage-Tumorwachstums gewählt, um Angiogenese-Parameter zu untersuchen. Im Speziellen wurde ein Zeitpunkt untersucht, an dem die Tumor-Angiogenese beginnt. Dazu wurden Mäuse 19 Tage CSC unterzogen bzw. als SHC-Kontrolltiere gehalten und nach 20 Tagen wurden ihnen Tumorzellen wie oben beschrieben unter die Haut gesetzt. Wie in Abbildung 3.18 B zu erkennen ist, ist eine deutliche Beschleunigung des Wachstums der Tumore bei CSC-Tieren zwischen zehn und 15 Tage nach Injektion der Tumorzellen zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt sollte eine erhöhte Angio(neo)genese in CSC-gestressten Tieren stattfinden bzw. stattgefunden haben. In diesem Experiment wurde neun Tage nach Tumorsetzen das Tumorgewebe entfernt und histologisch hinsichtlich Vaskularisierung untersucht.

Hier wurde die Expression von CD31, auch bekannt als „*Platelet endothelial cell adhesion molecule*“ (PECAM-1), und MECA-32 in Tumoren von SHC- und CSC-Tieren untersucht. PECAM-1 ist Protein, welches weit verbreitet auf unreifen und reifen Endothel-Zellen ist, aber auch auf der Oberfläche von Blut-Plättchen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und einigen T-Zellen exprimiert wird. MECA-32 ist ein Antikörper-Klon, welcher das „*plasmalemma vesicle associated protein*“ (PLVAP) erkennt, ein Marker für Endothel-Zellen, der ein kationisches membran-integriertes Glykoprotein ist. Weiterhin ist PLVAP ein Protein, das auf den Diaphragmata von fenestrierten Endothelzellen vorkommt.



D



DAPI CD31 MECA-32

E

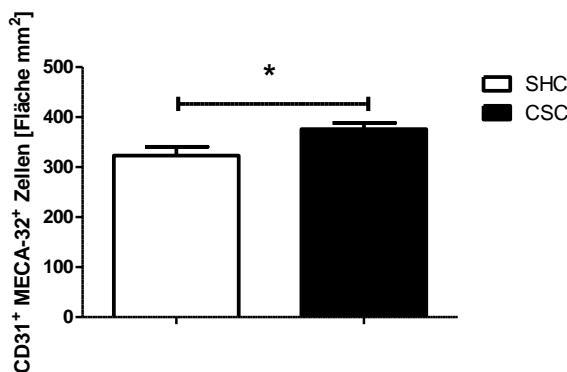


Abbildung 3.20: Der Effekt von chronischem Stress auf die Vaskularisierung eines Tumors: Nach 19 Tagen CSC wurden SHC- und CSC-Tiere einzeln gesetzt, Zellzusammensetzung des Blutes untersucht und am Folgetag Tumorzellen („C57Bl/6 fibro-sarcoma 1“ Zellen, BFS1) unter die Haut injiziert. Myeloide Zellen wurden im Blut nach 19 Tagen CSC quantifiziert, um eine Aussage über einen erfolgreichen CSC-Versuch zu treffen (A). Der mittlere Tumordurchmesser wurde an den angegebenen Tagen nach Tumorinjektion ermittelt (B). Nach neun Tagen Wachstum wurde das Tumorgewebe isoliert und das Gesamtgewicht ermittelt (C). Gezeigt sind zwei repräsentative Abbildungen von histologischen Tumor-Schnitten von SHC- und CSC-Tieren nach neun Tagen Tumorgewicht (D). Gefärbt wurde mit Antikörpern, die gegen CD31 (rot) und MECA-32 (gelb) gerichtet sind. Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Mit Hilfe von TISSUE-FAXS wurde die Fläche von CD31⁺ MECA-32⁺ Zellen pro Fläche in Tumoren von SHC- und CSC-Tieren ermittelt (E). (E). n: 7 SHC vs. 8 CSC (A, C und E): *: p<0,05; **: p<0,01; ungepaarter t Test) .

Es zeigte sich erneut, dass 19 Tage CSC myeloide Zellen im Blut erhöht (Abbildung 3.20 A). Im Speziellen waren CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) sowie MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) im Blut von CSC-Tieren im Vergleich zu SHC-Tieren anteilmäßig um mehr als das Doppelte angestiegen. Im Anschluss an den erfolgreich durchgeföhrten CSC-Versuch wurde erneut durch Injektion von Tumorzellen das Tumorgewicht induziert und das Wachstum für neun Tage beobachtet (Abbildung 3.20 B). Es zeigte sich, dass bereits zwischen acht und neun Tagen nach Tumor-Inokulation, Tumore aus CSC-Tieren

größer wurden als von SHS-Tieren. Dies korreliert auch mit dem Gewicht des Tumorgewebes, das nach neun Tagen Wachstum isoliert wurde (Abbildung 3.20 C). In histologischen Schnitten von solchen Tumoren wurden die beiden Gefäßmarker CD31 und MECA-32 zusammen mit Zellkernen durch Verwendung von DAPI visualisiert. In Abbildung 3.20 D sind je ein repräsentativer histologischer Schnitt von Tumoren aus SHC- und CSC-Tieren nach neun Tagen Wachstum gezeigt. Zu erkennen ist, dass die Anzahl sowie die Fläche von CD31⁺ MECA-32⁺ Zellen pro definierter Fläche in Tumoren von CSC-Tieren erhöht waren. Dies konnte durch eine objektive Analyse mit Hilfe der TISSUE-FAXS-Technologie bestätigt werden (Abbildung 3.20 E). Diese Daten zeigen, dass in CSC-gestressten Tieren ein erhöhtes Maß an Angiogenese stattfand und somit eine erhöhte Anzahl und Größe von Endothelzellen im Tumor-Gewebe sich bilden konnte. Diese erhöhte Vaskularisierung erklärt die vorangegangene Beobachtung aus Abbildung 3.18 B, dass das 23 Tage-Wachstum von Tumoren in CSC-gestressten Tieren erhöht war und sich mehr Tumorgewebe bilden konnte.

3.7.4 Funktionelle Analyse von MDSC, isoliert nach Tumor (9 Tage)

Im Weiteren wurde analog Abschnitt 3.7.2 eine zelluläre und funktionelle Analyse der Milzen von 9 Tage tumortragenden SHC- und CSC-Tieren durchgeführt (Abbildung 3.21).

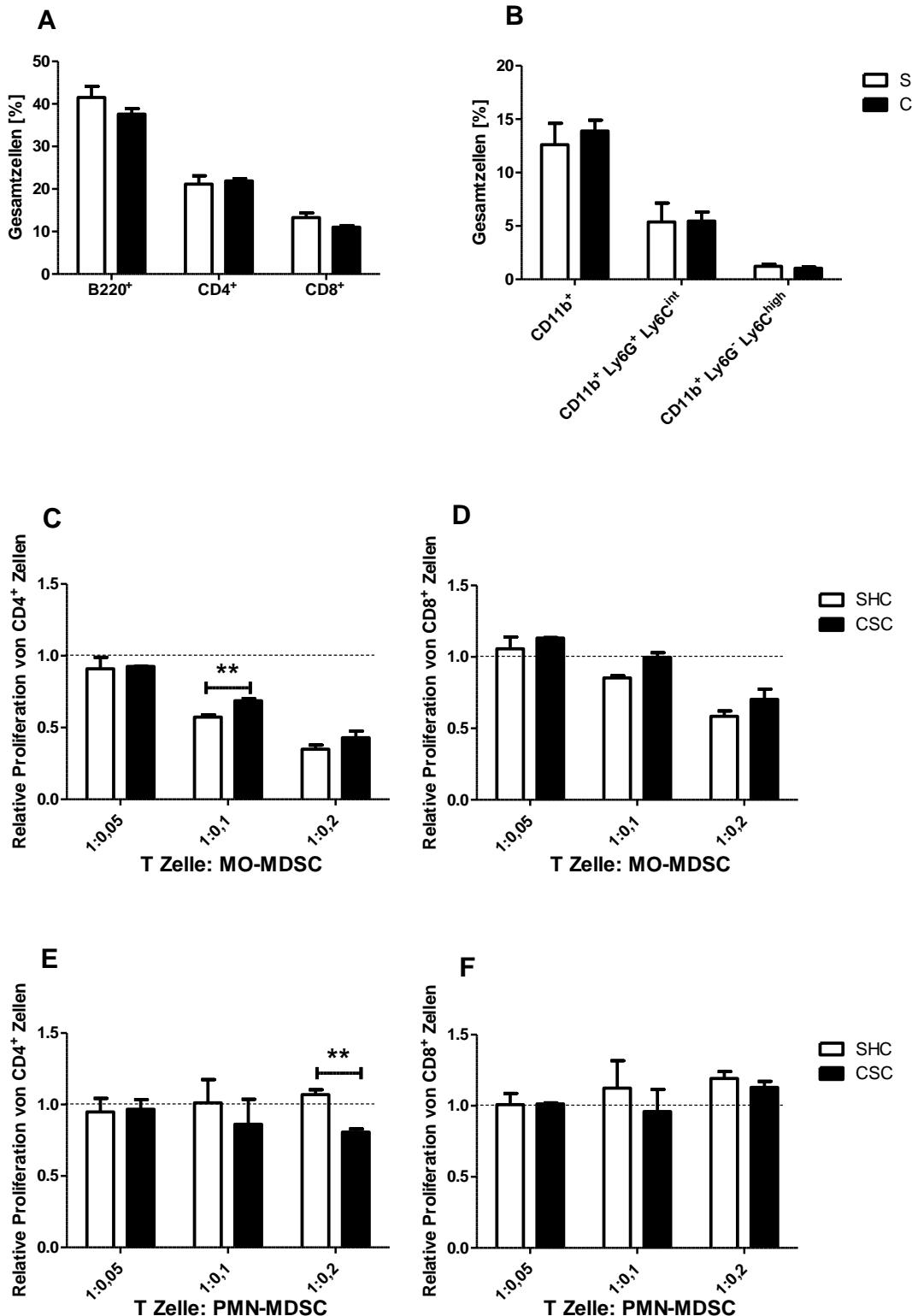


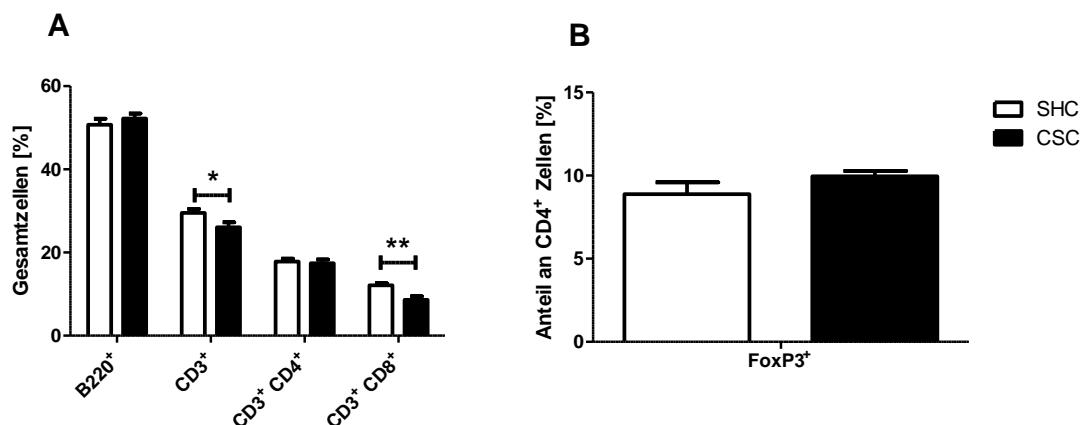
Abbildung 3.21: Zelluläre und funktionelle Analyse von Milz-Zellen aus SHC- und CSC-Tieren 9 Tage nach Tumorsetzen: Die Milzen von tumortragenden SHC- und CSC-Tieren wurden nach 9 Tagen Tumorwachstum isoliert, die zelluläre Zusammensetzung bestimmt und MDSC isoliert. Lymphozyten (A) und myeloide Zellen (B) wurden in Milzzellsuspensionen von tumortragenden SHC- und CSC-Tieren quantifiziert. MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺) wurden aus der Milz isoliert und ihre suppressive Aktivität auf CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Zellen

analysiert. Analog wurden PMN-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{int}$) aus der Milz auf ihre Suppressivität gegenüber $CD4^+$ (E) und $CD8^+$ (F) T-Zellen untersucht. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Abwesenheit von MO-MDSC bzw. PMN-MDSC. n: 7 SHC vs. 8 CSC (A, C und E: **: p<0,01; ungepaarter t Test)

Nach 9 Tagen Tumorwachstum konnten bezüglich der zellulären Zusammensetzung der Milzen keine stressvermittelten Änderungen in der Lymphozyten- (Abbildung 3.21 A) und myeloiden Zellfraktion (Abbildung 3.21 B) mehr festgestellt werden. Um die Funktionalität von MO-MDSC (Abbildung 3.21 C und D) und PMN-MDSC (Abbildung 3.21 E und F) aus der Milz zu testen, wurden beide MDSC-Populationen isoliert und ihr suppressives Verhalten gegen $CD4^+$ (Abbildung 3.21 C und E) und $CD8^+$ (Abbildung 3.21 D und F) T-Zellen analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass MO-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^+$) die $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zell-Proliferation in hoher Anzahl unterdrückten, und zwar hauptsächlich, wenn sie von nichtgestressten Tieren stammten. PMN-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{int}$) zeigten keine relevante Suppression auf $CD8^+$ T-Zellen, wohingegen in hoher Anzahl PMN-MDSC aus CSC-Tieren Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen unterdrückten.

3.7.5 Untersuchung der CSC-induzierten Veränderungen 9 Tage nach Beendigung von chronischem Stress

In den vorherigen Versuchen wurden immunologische Veränderungen direkt nach 19 Tagen CSC-Stress analysiert (siehe u.a. Abschnitt 3.1 bzw. Abbildung 3.1 bis 3.3). In dem folgenden Experiment wurde untersucht, wie stabil bzw. langanhaltend CSC-vermittelte Änderungen auf Lymphozyten und myeloide Zellen sind. Dazu wurde ein 19 Tage CSC-Versuch durchgeführt und analog Abschnitt 3.7.3 wurden die Tiere nach Beendigung einzeln gesetzt. Im Gegensatz zu Abschnitt 3.7.3 wurde kein Tumor gesetzt, ansonsten wurde gleich vorgegangen. Neun Tage darauf wurden immunologische Parameter in Milz und Knochenmark gemessen.



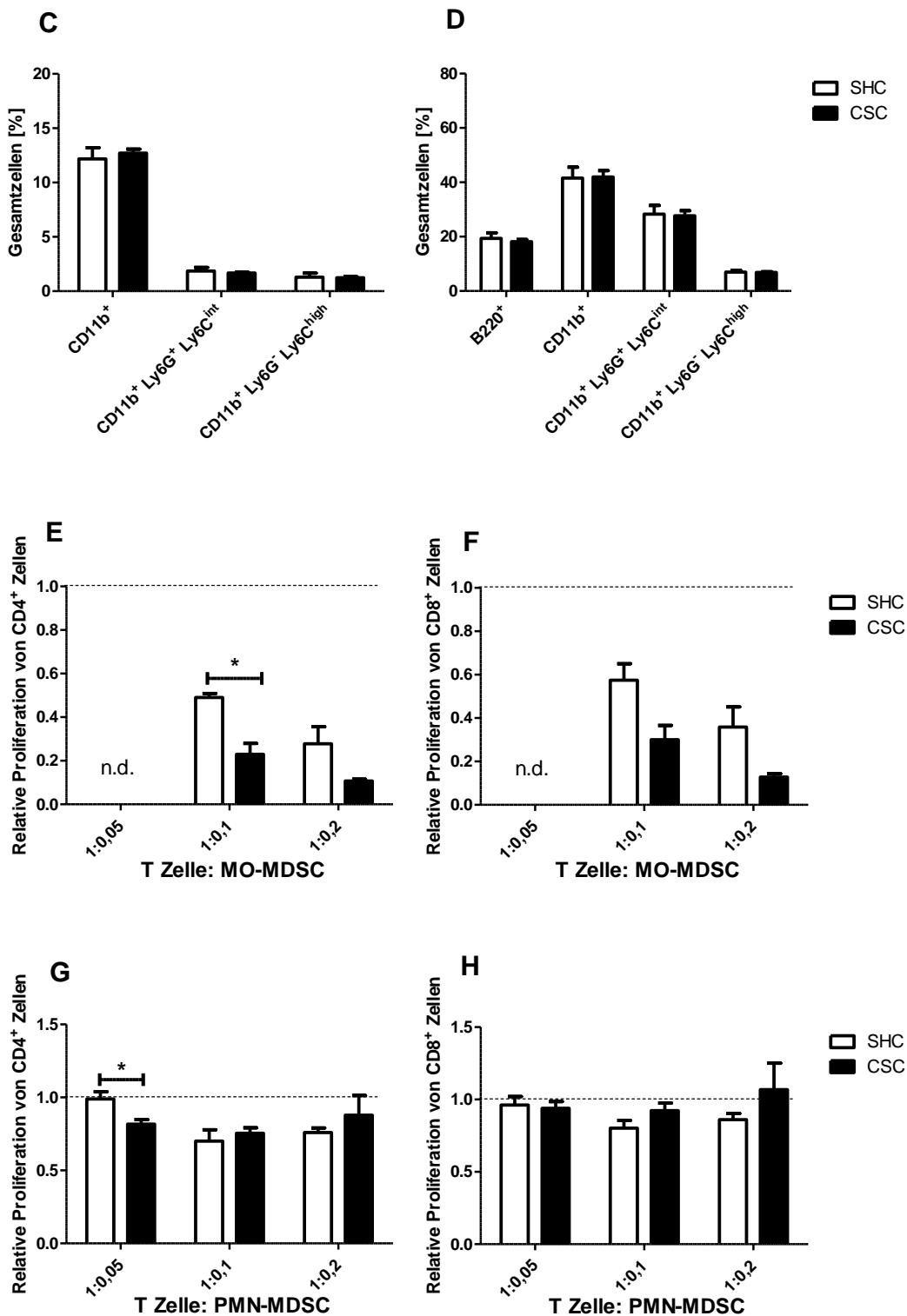


Abbildung 3.22: Zelluläre und funktionelle Analyse von Milz- und Knochenmark-Zellen aus SHC- und CSC-Tieren 9 Tage nach dem Absetzen von chronischem Stress: Nach 19 Tagen CSC wurden alle CSC-Tiere einzeln gesetzt und für 9 weitere Tage ungestört belassen. Im Anschluss wurden die Milzen (A bis C) und das Knochenmark (D) entnommen und die Zusammensetzung untersucht. Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) wurden anhand des Anteils des intrazellulär gemessenen FoxP3 innerhalb der CD4⁺ Zell-Population analysiert (B). MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) wurden aus der Milz isoliert und ihre supressive Aktivität auf CD4⁺ (E) und CD8⁺ (F) T-Zellen analysiert. Analog wurden PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) aus der Milz auf ihre Supressivität

gegenüber CD4⁺ (G) und CD8⁺ (H) T-Zellen untersucht. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von MO-MDSC bzw. PMN-MDSC. (n.d.: *not determined* (nicht gemessen)); n: 8 SHC vs. 8 CSC (*: p<0,05; ungepaarter t Test)

Es zeigte sich, dass nach 19 CSC-Stress plus neun weiteren Tagen Einzelhaltung (*single housing*) CD3⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen in den Milzen zuvor gestresster Tiere immer noch prozentual leicht reduziert waren (Abbildung 3.22 A), wohingegen T_{Reg} auf gleichem Niveau innerhalb der CD4⁺ T-Zellen waren (Abbildung 3.22 B). Der zelluläre Anteil an CD11b⁺ Zellen, PMN-MDSC und MO-MDSC war sowohl in Milz (Abbildung 3.22 C) als auch im Knochenmark (Abbildung 3.22 D) unverändert. Um die Funktionalität von MO-MDSC (Abbildung 3.22 E und F) und PMN-MDSC (Abbildung 3.22 G und H) aus der Milz zu testen, wurden beide MDSC-Populationen isoliert und ihr suppressives Verhalten gegen CD4⁺ (Abbildung 3.22 E und G) und CD8⁺ (Abbildung 3.21 F und H) T-Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass MO-MDSC generell ein hohes suppressives Verhalten gegenüber CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen besitzen und dass solche, die aus CSC-Tieren isoliert wurden, ein noch stärkeres Potenzial als MO-MDSC aus SHC-Tieren haben. PMN-MDSC zeigten wie in den vorherigen Versuchen kein suppressives Verhalten auf proliferierende T-Zellen.

3.7.6 Der Einfluss chronischer Behandlung mit Dexamethason auf das Tumorwachstum (20 Tage)

Wie in Abschnitt 3.6.3 und in Abbildung 3.15 gezeigt wurde, können myeloide Zellen durch eine dreimalige Gabe von Dexamethason in primären und sekundären lymphatischen Organen anteilmäßig ansteigen. Diese dreimalige Gabe an Dexamethason imitiert die im 19 Tage CSC-Modell vorzufindenden Peaks an Corticosteron und ergibt gleiche zelluläre Effekte wie 19 Tage CSC. Weiterhin wurde im Abschnitt 3.7.1 bzw. in Abbildung 3.18 gezeigt, dass 19 Tage CSC-Tumorwachstum im Vergleich zu SHC-Tieren begünstigt. In dem folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob eine dreimalige Gabe von Dexamethason als Imitation von chronischem Stress gleiche Effekte wie 19 Tage CSC bezüglich des Tumorwachstums induziert. Dazu wurde naiven Mäusen dreimal Dexamethason bzw. PBS als Kontrollbehandlung appliziert und analog Abbildung 3.18 Tumorzellen injiziert, um Tumorwachstum zu induzieren. Das Wachstum der Tumore wurde über 20 Tage beobachtet, Tumorgewebe isoliert und es wurden zelluläre und funktionelle Analysen mit den Milzzellen tumortragender Tiere durchgeführt.

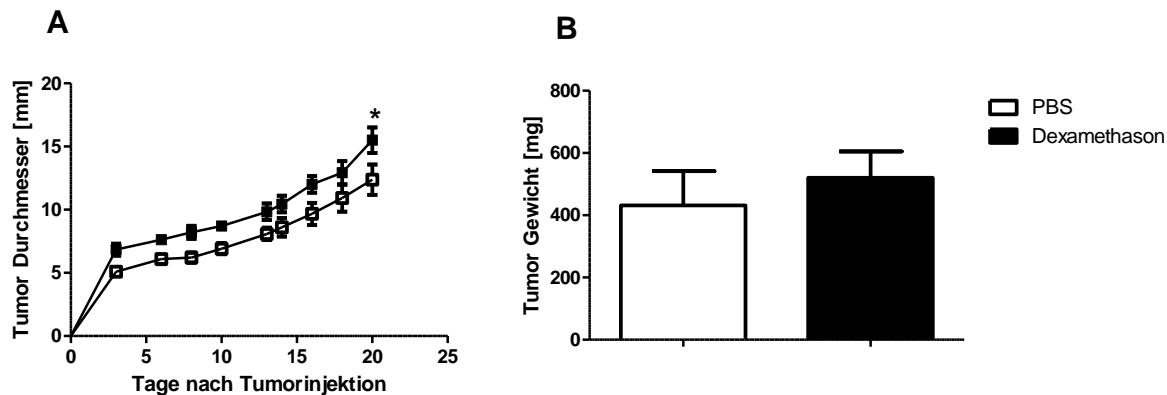


Abbildung 3.23: Die Effekte wiederholter Behandlung mit Dexamethason und deren Auswirkungen auf Tumorwachstum: Nach 19 Tagen und dreimaliger Behandlung mit Dexamethason wurden Tumorzellen („C57Bl/6 fibro-sarcoma 1“ Zellen, BFS1) unter die Haut von PBS- und dexamethason-behandelten Tieren injiziert und das Tumorwachstum für 20 Tage beobachtet (A). Nach 20 Tagen Tumorwachstum wurde das Tumorgewebe isoliert und dessen Gewicht bestimmt (B). n: 6 PBS vs. 6 Dexamethason (B: *:p<0,005; 2 way ANOVA + Bonferroni posttest).

Im Anschluss an 20 Tage Tumorwachstum nach Dexamethason-Behandlung zeigte sich, dass zwischen der PBS-Kontrollgruppe und dexamethason-behandelten Tieren kaum Unterschiede bzgl. des Tumorwachstums festzustellen waren (Abbildung 3.23 A). Tumore von dexamethason-behandelten Tieren wiesen dabei stets geringfügig größere Tumore auf. Statistische Signifikanz war lediglich nach 20 Tagen zu vermerken. Auch im Gewicht des Tumorgewebes zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abbildung 3.23 B).

3.7.6 Funktionelle Analyse von MDSC, isoliert von dexamethason-behandelten Tieren nach Tumor (20 Tage)

Im Weiteren wurde analog Abschnitt 3.7.2 und 3.7.4 eine zelluläre und funktionelle Analyse der Milzen von 20 Tage lang tumortragenden PBS- und dexamethason-behandelten Tieren durchgeführt (Abbildung 3.23).

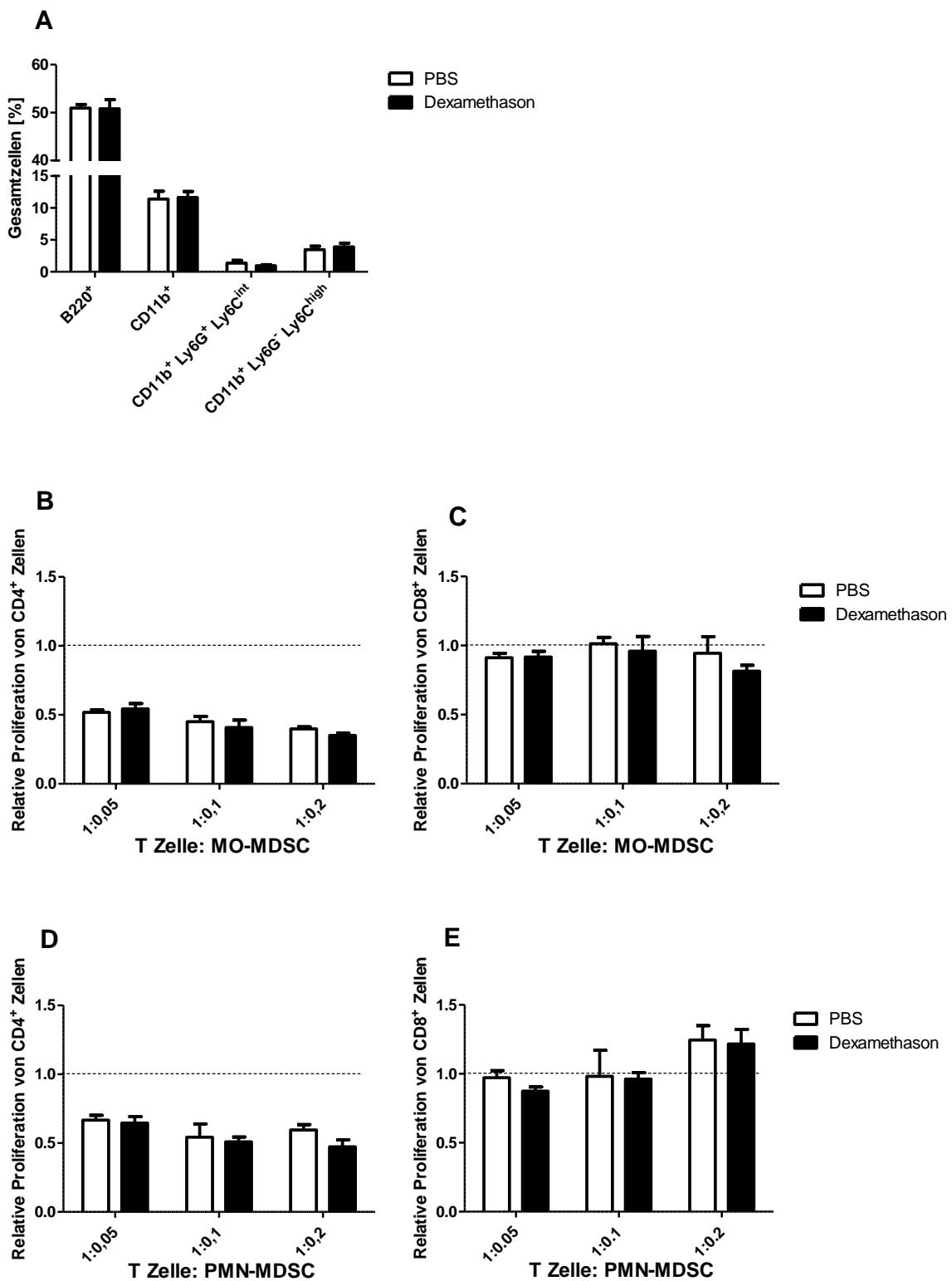


Abbildung 3.24: Zelluläre und funktionelle Analyse von Milz-Zellen von 20 Tage lang tumortragenden Tieren, die mit PBS bzw. Dexamethason behandelt wurden: Die Milzen der tumortragenden Tiere wurden nach 20 Tagen Tumorwachstum isoliert, die zelluläre Zusammensetzung bestimmt und MDSC isoliert. B220⁺ B-Zellen und myeloide Zellen in Milzzellsuspensionen tumortragender Tiere wurden quantifiziert (A). MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) wurden isoliert und ihre supressive Aktivität auf CD4⁺ (B) und CD8⁺ (C) T-Zellen analysiert. Analog wurden PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{high}) auf ihre Supressivität gegenüber CD4⁺ (D) und

CD8⁺ (E) T-Zellen untersucht. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von MO-MDSC bzw. PMN-MDSC. n: 6 PBS vs. 6 Dexamethason

Die Analyse der Milz nach dreimaliger Behandlung mit Dexamethason und dem darauffolgenden Tumorwachstum für 20 Tage zeigte keine Unterschiede in der Zellzusammensetzung zwischen PBS- und dexamethason-vorbehandelten Tieren (Abbildung 3.24 A). Sowohl MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) als auch PMN-MDSC CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) supprimierten unabhängig von der Dexamethason-Behandlung die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.24 B und D). Die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen war dagegen weder von MO-MDSC noch von PMN-MDSC beeinflusst (Abbildung 3.24 C und E).

4. Diskussion

Die hier vorliegende Doktorarbeit knüpft an die Bachelor- und Masterarbeit an, in denen erste Daten mit dem Stress-CSC-Modell generiert wurden. Im weiteren kam in der vorhergegangen Bachelorarbeit eine Publikation mit dem Titel „*Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses*“ im Journal „*Brain, Behavior und Immunity*“ zustande (33). In dieser Arbeit wurde die adaptive Immunantwort vor allem der T-Zell-Immunität nach 19 Tagen CSC-Stress näher untersucht. Ich untersuchte zunächst Lymphozyten in pLN und fand dabei heraus, dass der Anteil an CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten in CSC-Tieren prozentual erniedrigt, wohingegen B-Zellen (CD45R⁺) erhöht waren. T_{Reg} (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) waren innerhalb der Gesamt-Lymphozyten reduziert. Demgegenüber war die Zytokin-Produktion von Lymphknoten-Zellen in vitro nach α CD3 Re-Stimulierung aus CSC-Tieren erhöht. Es wurde dabei eine generell erhöhte Produktion von verschiedenen Zytokinen (TNF, IL-6, IL-10, IL-4, IL-5, IL-17 IFN- γ) registriert und zeigte keinen Bias zu einer bestimmten T_H-Unterpopulation. Die Konsequenz dieser systemischen Aktivierung von T-Zellen resultierte in einer erhöhten Menge an Keimzentren in der Milz.

Glucocorticoide sind klassische anti-inflammatorische Therapeutika, die in der Klinik als Immun-Suppressiva eingesetzt werden. Demzufolge konnte die α CD3- stimulierte Produktion von TNF, IL-6, IFN- γ und IL-17 von Lymphknoten-Zellen durch steigende Mengen an Dexamethason unterdrückt werden, wohingegen sich in Zellen aus CSC-gestressten Tieren eine Glucocorticoid-Resistenz von T_H2-Zellen bildete (IL-4 Produktion). IL-10-Produktion konnte generell nicht von Dexamethason unterdrückt werden. In einem letzten Experiment wurde gezeigt, dass nach 19 Tagen CSC-Stress CD4⁺ IL-17⁺-Zellen im Vergleich zu SHC-Kontrolltieren erhöht waren und stressunabhängig nicht durch steigende Mengen Glucocorticoide unterdrückt werden konnten.

4.1 19 Tage chronischer Stress induziert suppressive Zellen

Nachdem erste Daten mit T-Zellen in Lymphknoten generiert worden waren, sollte der Fokus dieser Arbeit vor allem auf suppressiven Zellen aus Milz und Knochenmark liegen. Im Speziellen wurden CD11b⁺ myeloide Zellen untersucht, die in der Literatur als MDSC beschrieben sind. Nach CSC wurde eine Reduktion von CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Milz sowie ein Anstieg an T_{Reg} registriert (Abbildung 3.1). Der zelluläre Anteil des Blutes entspricht dem der Milz und B220⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen waren nach 19 Tagen Stress reduziert. Diese Daten entsprechen denen aus den pLN und besagen eine

systemische Reduktion an T-Zellen, wohingegen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen (T_H) es zu einer Verschiebung zu einer suppressiven Population an T_{Reg} kommt.

Die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass 19 Tage CSC-Stress CD11b⁺-Zellen sowohl im Knochenmark als auch im Blut und in der Milz anteilmäßig ansteigen lassen (Abbildung 3.2 und 3.3). Das Hauptinteresse lag dabei an zwei Unterpopulationen, welche zum einen CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int} und zum anderen CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high} sind und phänotypisch in der Literatur als PMN-MDSC bzw. MO-MDSC beschrieben sind (21).

Allessandro Bartolucci gibt in einer Review aus dem Jahre 2007 eine Einführung in das interdisziplinäre Fach der „*Psychoneuroimmunology*“ und zeigt wichtige historische Fundamente auf, wodurch dieses Fach immer mehr an Wissen erlangte (24). Die frühe Erkenntnis, dass Systeme im Körper, wie das Nervensystem und das Immunsystem, nicht starre Gebilde sind, sondern untereinander kommunizieren, ist dabei die Basis dieser Arbeit. Die Interaktion ist dabei bi-direktional: „*From the bottom to the top*“ beschreibt den Einfluss des Immunsystems auf das Gehirn, wohingegen der Begriff „*From the top to the bottom*“ die Modulation des Immunsystems durch das Gehirn erklärt. In diesem Artikel fasst der Autor viele bereits veröffentlichte Publikationen zusammen, die sich mit Stress und dem Immunsystem beschäftigen. Konsens ist hierbei, dass soziale Stressoren wie variierende Haltungsbedingungen (wie z.B. soziale Instabilität, Einzelhaltung vs. Haltung in einer stabilen Gruppe mit niederm Rang) die stärksten (Stressoren) darstellen. Diese Review gibt einen Überblick über gesammelte Publikationen, die zeigen, dass chronischer Stress Lymphozyten wie B-Zellen, T-Zellen, T_H-Zellen und CTL supprimiert, wohingegen Granulozyten, Neutrophile und Monozyten induziert werden und sowohl prozentual als auch in ihrer Gesamtanzahl ansteigen.

Diese vorhergehenden Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bestätigt und zeigen, dass das CSC-Modell ein wichtiges und relevantes Modell ist, um Auswirkungen von chronischem Stress und ggf. daraus resultierender Infektionen und Erkrankungen zu erforschen.

Firdaus S. Dhabhar führte in dem Bereich der Psycho-Neuro-Immunologie viele Studien durch und fasst seine und Ergebnisse anderer Autoren in großartigen Reviews zusammen (23, 36, 41, 42). Er entwickelte ein zweiseitiges Modell von Stress, das sowohl eine positive als auch eine negative Seite besitzt. Im Allgemeinen unterscheidet er akuten Stress (Minuten bis Stunden) von chronischem Stress (Monate bis Jahre). Akuter Stress wirkt stimulierend auf eine Immunabwehr: Leukozyten werden mobilisiert, die angeborene und erworbene Immunität steigt und gilt als immun-protaktiv. Chronischer Stress bewirkt demgegenüber das Gegenteil: Die Mobilisierung von Leukozyten sinkt, die angeborene und erworbene

Immunität sinkt und wirkt immun-suppressiv. Dhabhar beschreibt im Weiteren regulatorische Mechanismen, die sich nach chronischem Stress zeigen, und das Auftreten von T_{Reg} bei chronischem Stress.

Diese Erkenntnis stimmt mit den hier generierten Daten überein, dass nämlich CSC-Stress den Anteil an T_{Reg} innerhalb der CD4 $^{+}$ T-Zellpopulation ansteigen lässt.

Dhabhar untersuchte akuten und chronischen Stress an Ratten und verwendete das Modell des Einsperrstresses (*restraint*). In einem Zeitintervall von 120 Minuten untersuchte er dabei Änderungen im peripheren Blut mit einfacheren Methoden als in dieser Doktorarbeit. Der Vorteil dieser Arbeit besteht darin, dass genauere Marker für bestimmte Zell-Populationen verwendet werden konnten. Der größte Unterschied ist, wie bereits beschrieben, das verwendete Stress-Modell. Dhabhar untersuchte immunologische Änderungen nach maximal 120 Minuten *Restraint-Stress* bei Ratten, wohingegen das CSC-Modell kontinuierlich über 19 Tage an männlichen Mäusen vollzogen wird. Die Erkenntnisse über chronischen Stress erfolgten nur durch wiederholte Zyklen an *Restraint-Stress* und Extrapolation der Daten aus bereits veröffentlichten Artikeln. Das CSC-Modell ist jedoch nicht an die Maus als Versuchstier gebunden, ein Äquivalent mit männlichen Ratten wurde bereits von Stefan Reber etabliert (25, 43).

4.2 Stressinduzierte myeloide Zellen sind funktionsfähige MDSC

Diese Doktorarbeit beschreibt neben T_{Reg} die Erscheinung von zwei weiteren regulatorischen Zellpopulationen nach chronischem Stress: PMN-MDSC und MO-MDSC. Gezeigt wurde, dass nach 19 Tagen CSC-Stress in sowohl primären als auch sekundären lymphatischen Organen phänotypisch beide Zellpopulationen ansteigen. Der Abschnitt 3.2 mit Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 beschäftigte sich mit Funktionsanalysen von MO-MSC (Abbildung 3.4) und PMN-MDSC (Abbildung 3.5) aus dem Knochenmark von SHC-Kontrolltieren und 19 Tage gestressten Tieren. Ziel war es hier, eine Aussage darüber zu treffen, dass es sich hier bei der induzierten Zell-Population nicht um gewöhnliche Granulozyten oder Monozyten, sondern um suppressive MDSC handelt. Hier wurde gezeigt, dass chronischer Stress das von Natur aus schon hohe suppressive Potential von MO-MDSC um ein Weiteres verstärkt. Vermittelt war dies durch eine erhöhte Expression von iNOS, welches als NO $_2^{-}$ in den Kulturen als Endprodukt nachgewiesen wurde. PMN-MDSC zeigten demgegenüber in diesem Kontext ohne Manipulation oder Stimulierung durch Tumor keine Suppressivität. Es scheint vielmehr, dass PMN-MDSC unter diesen Bedingungen reife Granulozyten darstellen. Phänotypisch lassen sich diese beiden Zell-Populationen nicht unterscheiden - der Unterschied besteht (wie auch bei MO-MDSC) ausschließlich in funktioneller Natur. Diese Daten stimmen mit der gängigen Literatur überein und beschreiben vor allem MO-MDSC als

die suppressivere Population, wohingegen zahlenmäßig PMN-MDSC vermehrt auftreten (21).

Übereinstimmend mit diesen Daten, dass CSC-Stress MDSC generiert und das suppressive Potential von MO-MDSC verstärkt, gaben Trottier et al. 2008 erste Hinweise dafür, dass Stresshormone für die Expansion und Aktivierung suppressiver myeloider Zellen verantwortlich und beteiligt sind (35). Dabei implantierten die Autoren Corticosteron-Pellets s.c. in Mäuse, welche in der Folge typische Stressparameter wie Atrophie des Thymus und vermehrtes Auftreten von Granulozyten und Monozyten im Knochenmark zeigten. Funktionell zeigten isolierte Granulozyten eine erhöhte Produktion von Superoxid, ein Charakteristikum von PMN-MDSC. Die Autoren beobachteten dabei, dass vor allem Granulozyten die dominierende Zellpopulation sind, die nach Corticosteron-Behandlung ansteigen - ein Effekt, der auch im CSC-Modell festzustellen war. Die Limitierung lag jedoch bei diesen Autoren auf technischer Seite. Die Autoren analysierten mit dem Gr-1 (erkennt Ly6G und Ly6C) -Antikörper Granulozyten/PMN-MDSC und reinigten sie über einen Percoll-Gradienten, wohingegen in dieser Arbeit eine Kombination aus Ly6G- und Ly6C-Antikörpern verwendet wurde und diese mittels der MACS-Methode MDSC gereinigt wurden.

Varga et al. veröffentlichten im selben Jahr eine ähnliche Studie über Stresshormone und deren Einfluss auf die Generierung von MDSC (34). Sie beschrieben dabei eine durch Glucocorticoid induzierte Zellpopulation an aktivierte, anti-inflammatorischen Monozyten, die MDSC ähneln. Sie zeigten, dass Dexamethason anti-inflammatorische Mechanismen in murinen Monozyten begünstigt: Eine erhöhte Expression von CD163 (Scavenger Rezeptor, welcher „*low-density lipoprotein (LDL)*“ und Makromoleküle bindet und aus dem Milieu entfernt), von IL-10 sowie eine Reduktion an IL-6. In einer durchflusszytometrischen Analyse zeigten die Autoren, dass diese glucocorticoid-induzierte Monozyten-Zellpopulation solchen Monozyten ähneln, die aus einer tumortragenden Maus isoliert wurden: Anhand der Expression von CD11b und Gr-1 wurde gezeigt, dass Glucocorticoide die gleiche Zellpopulation induzieren wie ein Tumor. Sie zeigten ferner, dass die Expression von CD124 (IL-4 Rezeptor), ein MDSC-Marker, sowohl vom Tumor als auch durch die Glucocorticoid-Behandlung erhöht wird.

Im Jahr 2013 beschrieben Jin et al., dass chronischer psychischer Stress die Akkumulation von MDSC induziert (44). In dieser Studie untersuchten die Autoren myeloide Zellen, die nach *Restraint*-Stress in Blut und Knochenmark akkumulierten. Ihre Untersuchungen zeigten, dass nach fünf Zyklen Einsperr-Stress über Nacht CD11b⁺ Gr-1⁺-Zellen sowohl prozentual als auch in absoluter Anzahl im Blut und im Knochenmark anstiegen und dieser Effekt vor allem durch Katecholamine vermittelt ist. Ferner zeigten sie, dass CD11b⁺ Gr-1⁺-Zellen, isoliert aus dem Knochenmark, in der Lage sind, Zytokin-Produktion von

Makrophagen zu reduzieren sowie ein erhöhtes suppressives Verhalten auf T-Zell-Proliferation nach Stress zu erlangen. Diese Daten korrelieren mit den Daten, die in dieser Doktorarbeit generiert wurden, und zeigen, dass Stress im Allgemeinen suppressive CD11b⁺ Zellen im Knochenmark generiert. Die Limitierung der Arbeit von Jin et al. lag erneut an der Technologie, mit der sie MDSC charakterisieren konnten. Im Speziellen wurde erneut mit den Markern CD11b und Gr-1 der MDSC-Phänotyp und die Funktion charakterisiert, was eine detailliertere Trennung zwischen PMN-MDSC und MO-MDSC nicht möglich macht.

Viele vergleichbare Daten aus einem sehr ähnlichen Stress-Modell kommen von John Sheridan. Bei dem verwendeten SDR (*social disruption*) und dem sehr ähnlichen RSD (*repeated social defeat*) Stress-Modell werden ein junges Tier (*Resident*) 2h mit einem dominanten Männchen (*Intruder*) zusammen gehalten (45-58). Analog dem CSC-Modell, greift das dominante und größere Tier (in diesem Fall der *Intruder*) das kleinere an (in diesem Fall der *Resident*) und unterwirft es so lange, bis dieses eine typische Unterwürfigkeits-Geste zeigt. Solche dominanten *Intruder* sind im Gegensatz zu dem CSC-Modell auf eine hohe Aggressivität selektiert, was sich letztendlich durch einen moderaten Verbiss der unterwürfigen *Resident* auswirken kann. Die Exposition verläuft für 2h pro Tag und es erfolgen insgesamt sechs Zyklen. Sheridan zeigte in seinen Studien, dass CD11b⁺ Zellen nach Stress eine Glucocorticoid-Resistenz aufwiesen und das dies durch eine fehlende Translokation des Glucocorticoid Rezeptors nach GC Stimulation in den Zellkern zu begründen ist (54). Weiterhin zeigte er, dass nach SDR vermehrt CD11b⁺ Makrophagen in Milz und Knochenmark auftraten und Milz-Zellen mehr TNF und IL-6 nach LPS-re-Stimulation produzierten (46, 50). Die Bezeichnung „CD11b⁺ Makrophagen“ ist jedoch mit Vorsicht zu genießen. Er verwendete ausschließlich CD11b als Marker und nicht einen Makrophagen-spezifischen Marker wie z.B. F4/80. Weiterhin zeigte er, dass nach SDR mehr unreife, myeloide Zellen entstehen und mehr GM-CSF in Knochenmark produziert wird. Mit der FACS Antikörper-Kombination CD11b und Gr-1 zeigte er, dass sowohl im Knochenmark als auch in der Milz mehr Monozyten und Neutrophile Granulozyten nach SDR anstiegen. Diese Daten stimmen mit meinen Daten aus dem CSC-Modell voll und ganz überein. Unterschiedlich war nur, dass in dieser Arbeit anstatt mit dem Gr-1 Antikörper, PMN- und MO-MDSC mit der Marker-Kombination Ly6G und Ly6C charakterisiert wurden. Weiterhin unterschiedlich war, dass vor allem G-CSF anstelle von GM-CSF in dieser Arbeit als Grund für einen Anstieg an CD11b⁺ Zellen gefunden wurde. Übereinstimmender Konsens der Daten von Sheridan und dieser sind, dass Stress eine GC-Resistenz von myeloiden Zellen induziert und mehr unreife, myeloide Zellen generiert. Sheridan konzentrierte sich im weiterhin auf CD11b⁺ Zellen im Hirn (55-58). Das sind vor allem Microglia Zellen und ZNS-(Zentrales Nervensystem) Makrophagen. Ein wichtiger und bedeutender Befund von Sheridan war jedoch, dass vor allem das SNS für den Stress-induzierten Anstieg an CD11b⁺

Zellen verantwortlich ist (56). Sheridan konnte durch die Blockierung des β -Adrenergen Rezeptors mittels Propanolol zeigen, dass die Stress-induzierten Effekte aufgehoben wurden. Dies gibt Hinweis darauf, dass die RU-486 *time-release* Pellets doch funktioniert haben und ich deutlichere Effekte mit Injektion von Propanolol anstatt von 6-OH Dopamin erzielt hätte.

4.3 Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von MDSC in Milz und Knochenmark

Der Abschnitt 3.3 beschäftigte sich mit dem zeitlichen Verlauf und dem Auftreten von myeloiden Zellen in Milz und Knochenmark nach CSC-Stress. Untersucht wurde nach zehn und 48 Stunden (akutem) Stress sowie nach acht, 15 und 19 Tagen (chronischem) Stress. Betrachtet man sich die Milz, so sind zehn Stunden CSC ausreichend, damit PMN-MDSC (CD11b $^+$ Ly6G $^+$ Ly6C $^{\text{int}}$) prozentual ansteigen, wohingegen B220 $^+$ B-Zellen zu diesem Zeitpunkt reduziert sind. Demgegenüber sieht man genau die gegenteiligen Ergebnisse im Knochenmark: B220 $^+$ B-Zellen steigen an, wohingegen CD11b $^+$ Zellen, PMN-MDSC (CD11b $^+$ Ly6G $^+$ Ly6C $^{\text{int}}$) und MO-MDSC (CD11b $^+$ Ly6G $^-$ Ly6C $^{\text{high}}$) reduziert sind. Diese Effekte wurden auch von Dhabhar et al. bei akutem Stress beobachtet (23, 36, 59, 60). Dieser Autor entwickelte ein Modell, welches er „*From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones*“ bezeichnete (36). Er beschreibt die positiven Effekte von akutem Stress, bei dem rapide Leukozyten über das Blut in die Peripherie mobilisiert werden, um letztendlich den Körper auf eine ggf. drohende Verletzung durch Prädatoren vorzubereiten. Dabei stellen die „*barracks*“ Knochenmark, Milz, Lunge und Lymphknoten dar, die „*boulevards*“ die Blutgefäße und die „*battlefields*“ Orte von Verwundung und des Eintrittspunktes von Antigenen/Pathogenen in das Gewebe. Die primäre Reduktion an myeloiden Zellen im Knochenmark nach zehn Stunden CSC-Stress stellt somit eine frühe Phase der Mobilisierung von Leukozyten dar, welche dann in die Peripherie wandern, um dort als Phagozyten fungieren zu können. Dhabhar untersucht dabei in seinen Versuchen ein Zeitintervall von 120 Minuten (akutem) Stress, wohingegen nach zehn Stunden CSC-Stress acht weitere Stunden vergangen sind. In dieser Zeit könnten PMN-MDSC aus dem Knochenmark kontinuierlich in die Zirkulation ausgewandert sein und begonnen haben, in die Milz einzuwandern. Das Fehlen einer Verletzung wäre ein möglicher Grund für myeloide Zellen, in die Milz einzuwandern, da sie vor Ort nicht gebraucht werden. CD11b $^+$ -Zellen und MO-MDSC (CD11b $^+$ Ly6G $^-$ Ly6C $^{\text{high}}$) sind erst nach 48 Stunden CSC-Stress vermehrt in der Milz nachzuweisen. Dies ergibt insofern Sinn, als Granulozyten und Neutrophile die erste Zellpopulation sind, die an die Orte der Entzündung einwandern, um rapide Antigen zu phagozytieren. Zeitversetzt erscheinen Monozyten und Makrophagen, um Zell-Schrott zu entfernen. Hier verhält es sich analog: Die erste Population an myeloiden Zellen, die vermehrt in der Milz auftreten, sind nach zehn Stunden PMN-MDSC, die in einem Zeitraum

über 48 Stunden dann von Monozyten und MO-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$) begleitet werden. Der Anstieg an $CD11b^+$ -Zellen ergibt sich somit aus deren Summe. Im Bereich zwischen 48 Stunden und 19 Tagen CSC-Stress akkumulieren immer mehr $CD11b^+$ -Zellen in der Milz, welche vor allem von PMN-MDSC dominiert werden. Zurückzuführen könnte dies auf chronisch erhöhte Mengen an Stresshormonen, auf wiederholte Stressor-Exposition sein, wobei sich immun-aktivierende in immun-supprimierende Effekte von Stress umkehren. In diesem Zeitraum konnten vor allem MO-MDSC immer mehr an suppressivem Potential zulegen.

Die Frage, warum man eine Akkumulation an myeloiden Zellen im Knochenmark erst zu einem späteren Zeitpunkt feststellen kann, könnte sich durch das gemessene G-CSF im Serum erklären. Dabei wurde in den ersten acht Tagen eine enorme Erhöhung an G-CSF im Serum nachgewiesen, was den Umstand erklärt, warum gerade PMN-MDSC die Population ist, die anteilmäßig innerhalb der $CD11b^+$ -Zellen ansteigt. G-CSF induziert, wie im Namen schon erwähnt, die Hämatopoiese von Granulozyten. Der Effekt scheint zeitversetzt einzutreten: Die erhöhten Mengen an G-CSF im Serum innerhalb der ersten Woche im CSC-Modell induziert eine vermehrte Bildung an PMN-MDSC im Knochenmark, die schließlich nach 19 Tagen CSC-Stress im Knochenmark nachzuweisen sind. Warum nach 19 Tagen CSC-Stress im Knochenmark auch mehr MO-MDSC registriert werden, kann jedoch nicht alleine durch G-CSF erklärt werden. Der Gehalt an GM-CSF war im Serum nach CSC-Stress nur leicht erhöht. M-CSF wurde jedoch nie gemessen. Erhöhte Mengen an M-CSF könnten durchaus MO-MDSC im Knochenmark anteilmäßig ansteigen lassen.

4.4 Die Rolle von IL-6 in der stressvermittelten Akkumulation von $CD11b^+$ -Zellen in Milz und Knochenmark

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit vielerlei Wirkungen: Es hat sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften, ist der Haupt-Induktor von Akut-Phase-Proteinen und ein Pyrogen (61). Produziert wird es vor allem von T-Zellen und Makrophagen an Orten von Entzündungen und bewirkt einen Wechsel der Rekrutierung von Neutrophilen hin zu Monozyten/Makrophagen. Die Rolle von IL-6 sollte nun in dem 19 Tage-CSC-Modell untersucht werden. Hypothese war, dass IL-6 an der stressinduzierten Akkumulation myeloider Zellen beteiligt ist und diesen Vorgang begünstigt. Dazu wurden IL-6-defiziente Mäuse für 19 Tage gestresst und immunologische Parameter in Milz und Knochenmark gemessen. Anhand der zellulären Zusammensetzung von Milz und Knochenmark konnten alle für CSC-Stress typischen Parameter nachgewiesen werden (Abbildung 3.8). In der Milz reduzierten sich $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, wohingegen PMN-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{int}$) und MO-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$) prozentual anstiegen. Analog zeigten sich im Knochenmark eine Reduktion an $B220^+$ B-Zellen und ein Anstieg an PMN-MDSC und MO-

MDSC. In diesem Versuch wurden jedoch leider keine C57Bl/6 Wildtyp-Kontrollen untersucht, die analog den IL-6-defizienten Tiere chronischem Stress unterzogen wurden. Deshalb kann keine Aussage über den Grad des Anstieges an myeloiden Zellen getroffen werden. Die Effekte, die man bereits in Wildtyp-Tieren nach 19d CSC-Stress sah, traten jedoch auch in diesen IL-6-defizienten Tieren auf und stimmen qualitativ überein.

4.5 Die Rolle von TNF/ TNFR2 in der stressvermittelten Akkumulation von CD11b⁺-Zellen in Milz und Knochenmark

TNF ist, wie IL-6, ein Zytokin mit einer sehr großen Bandbreite an Wirkungen und ist zusammen mit IL-1 eines der ersten Zytokine, das nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen lokal im Gewebe ausgeschüttet wird. TNF wirkt, wie bereits erwähnt, chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und steigert die Phagozyten-Aktivität von Makrophagen. TNF findet man in zwei unterschiedlichen Formen: es gibt das transmembranständige TNF (tmTNF) und lösliches (*soluble*) TNF (sTNF), wenn tmTNF durch die Endonuklease ADAM17 von der Membran abgespalten wird. TNF bindet an zwei unterschiedlichen Rezeptoren: TNFR1 (p55/p60) und TNFR2 (p75/p80) (62, 63). In der Tumor-Immunologie besitzt TNF eine umstrittene Rolle: Es sind sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte auf die Tumor-Immunologie beschrieben. Hauptsächlich wird TNF als ein Faktor, der pro-tumorigen wirkt, beschrieben. In den letzten Jahren wurden jedoch zwei Publikationen veröffentlicht, welche Akkumulation und Aktivierung von MDSC durch TNF beschreiben (39, 40). Zhao et al. beschreiben im Jahre 2012, dass TNF-*signalling* die Akkumulation von MDSC begünstigt (40). Die Autoren untersuchten dabei die Rolle von TNF in tumor-tragenden Mäusen und beschreiben, dass TNFR2-*signalling* durch TNF essentiell für das Tumorwachstum ist. Die Autoren zeigen, dass in TNFR- und TNFR2-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp- und TNFR1-defizienten Tieren weniger CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC in der Milz akkumulieren, was mit dem Ausbleiben von Tumorwachstum in diesen Tieren mit reduzierter Anzahl an induzierten MDSC korrelierte. Zwei Jahre später im Jahr 2014 veröffentlichten Hu et al. Daten, die näher auf das Thema eingehen und zeigen, dass tmTNF-*signalling* über TNFR2 wesentlich für die Aktivierung und die supressive Aktivität von MDSC ist (39). Sie beschreiben dabei, dass nicht sTNF, sondern tmTNF isolierte MDSC aktiviert und deren supressive Aktivität steigert. Weiterhin zeigen sie, dass der TNFR2 wesentlich für die supressive Aktivität von MDSC ist.

Die Limitierung dieser beiden Publikationen besteht erneut darin, dass sie MDSC wieder anhand von CD11b und Gr-1 beschrieben und detailliertere Informationen bezüglich der Trennung von PMN-MDSC und MO-MDSC nicht zulassen. Den wichtigsten Hinweis für die Experimente der hier dargestellten Arbeit gab jedoch die Information, dass TNF und TNFR2 notwendig für Akkumulation und Aktivierung von MDSC ist. Dies gab Anlass, die Rolle der

TNF-TNFR2-Achse im CSC-Modell zu untersuchen und zu analysieren, ob das Fehlen eines dieser Faktoren, entsprechend dem ausbleibenden Tumorwachstum, Effekte auf stressinduzierte MDSC besitzt.

In einem ersten Experiment, welches zweimal unabhängig mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt wurde, wurden C57Bl/6 Wildtyp- mit TNF-defizienten Tieren im CSC-Modell miteinander verglichen (Abbildung 3.9). Die wichtigste Erkenntnis ist dabei, dass gestresste TNF-defiziente Tiere einen geringeren Anstieg an PMN-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{int}$) und MO-MDSC ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$) in der Milz im Vergleich zu gestressten Wildtyp-Tieren aufwiesen. Eine Reduktion an T-Zellen in der Milz wurde nur in gestressten Wildtyp-Tieren gefunden, wohingegen TNF-defiziente Tiere keine Veränderung diesbezüglich zeigten. Im Knochenmark gestresster Wildtyp-Tiere zeigten sich typische Anzeichen von CSC-Stress: B-Zellen waren anteilmäßig reduziert, wohingegen $CD11b^+$ -Zellen und PMN-MDSC angestiegen waren. Eine statistische Signifikanz blieb jedoch aus. Betrachtete man sich parallel das Knochenmark gestresster TNF-defizienter Tiere, so zeigten sich keine stressvermittelten Änderungen. Diese Daten korrelieren mit den zuvor genannten Veröffentlichungen, die ebenfalls bekräftigen, dass TNF für die Akkumulation von MDSC notwendig ist (39, 40).

Um eine genauere molekulare Erkenntnis zu erlangen, wie CSC-Stress über TNF-*signalling* myeloide Zellen in der Milz akkumulieren lässt, wurde die Rolle des TNFR2 in dem CSC-Modell untersucht (Abbildung 3.10). Wie bereits genannt, zeigen gestresste TNF-defiziente Tiere einen geringeren Anstieg an MDSC. Analog Abbildung 3.9 zeigten gestresste TNFR2-defiziente Tiere in Abbildung 3.10 einen geringeren Anstieg an $CD11b^+$ -Zellen, PMN-MDSC und MO-MDSC in der Milz im Vergleich zu gestressten Wildtyp-Tieren. In der Milz zeigte sich eine stresstypische Reduktion an T-Zellen in beiden Mauslinien, wohingegen im Knochenmark keine Veränderungen nachweisbar waren.

Fasst man diese beiden Experimente zusammen, so lässt sich sagen, dass TNF und TNFR2 an der Akkumulation myeloider Zellen in der Milz beteiligt sind. Die Tatsache, dass auch in gestressten TNF- und TNFR2-defizienten Tieren MDSC in der Milz akkumulierten, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, besagt, dass diese beide Faktoren nicht alleine an diesem Effekt beteiligt sind. Es erscheint vielmehr, dass TNF-*signalling* über TNFR2 eine Akkumulation verstärkt. Auslöser dafür scheint ein anderer Faktor, wie z.B. einer der beiden Haupt-Stress-Hormone Adrenalin und Corticosteron oder sogar deren Kombination zu sein.

4.6 Die Rolle des SNS in der stressvermittelten Akkumulation der CD11b⁺-Zellen in Milz und Knochenmark

Adrenalin ist eines der ersten Stress-Hormone, welches in einer akuten Stress-Situation aus dem Nebennierenmark systemisch freigesetzt wird. Ermöglicht wird dies durch Speicherung von Adrenalin in den chromaffinergen Zellen der Nebenniere und muss im Gegensatz zu Corticosteron nicht erst produziert werden. Eine akute Ausschüttung von Adrenalin bewirkt durch katabole Prozesse eine Bereitstellung von Energie, um in einer *Fight-or-Flight*-Situation adäquat auf einen Stressor reagieren zu können. Dies gab Anlass, die Rolle dieses wichtigen Stress-Hormons und dessen Einfluss auf die stressinduzierte Akkumulation von MDSC zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde eine etablierte Methode verwendet, die dopaminerge und noradrenerge Neurone chemisch zerstört, um einen Einfluss von Dopamin und Adrenalin in der Stress-Situation im CSC-Modell auszuschließen (37). In Abbildung 3.12 wurde gezeigt, dass gestresste Tiere, welche mit 6-OH Dopamin behandelt wurden, im Vergleich zu gestressten PBS-Kontroll-injizierten Tieren einen geringeren Anstieg an PMN-MDSC und MO-MDSC in der Milz aufwiesen. Ein Anstieg im Knochenmark blieb sogar komplett aus. Korrelierend mit diesen Daten beschreiben Jin et al. im Jahre 2013, dass Katecholamine an dem stressinduzierten Anstieg an CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen im Knochenmark mitverantwortlich sind (44). Katecholamine sind eine wichtige Stoffgruppe, die Dopamin und seine Derivate wie Adrenalin, Noradrenalin und Isoprenalin u.a. beinhalten. Im Modell des *Restraint*-Einsperrstresses wurde gezeigt, dass gestresste Tiere, die zuvor mit Propanolol behandelt wurden, einen geringeren anteilmäßigen Anstieg an MDSC im Knochenmark aufwiesen als unbehandelte Tiere. Propanolol ist ein nicht-selektiver β -Rezeptor-Blocker und verhindert somit Signalling von Adrenalin über alle β -Rezeptoren. Im Weiteren zeigten sie, dass mehrmalige Injektion von Adrenalin oder Isoprenalin *Restraint*-Stress nicht ersetzt.

Zusammenfassend lässt sich für das SNS somit Folgendes bzgl. des stressinduzierten Anstieges myeloider Zellen in primären und sekundären lymphatischen Organen sagen: Adrenalin ist wesentlich an diesem stressvermittelten Effekt beteiligt, jedoch ist dessen alleinige Wirkung unzureichend für einen kompletten Effekt, wie man ihn in unterschiedlichen Stress-Modellen findet. Eine künstliche Gabe mehrerer Injektionen scheint hier nicht auszureichen. Vielmehr scheint es so, dass ein pleiotroper Effekt mehrerer Stress-Hormone dafür notwendig ist. Weitere wichtige Stress-Hormone sind Glucocorticoide, die zeitversetzt nach Adrenalin aus dem Nebennierenmark entlassen werden.

4.7 Die Rolle der HPA-Achse in der stressvermittelten Akkumulation der CD11b⁺-Zellen in Milz und Knochenmark

Im CSC-Modell wurde im Jahre 2006 eine Insuffizienz der Nebennieren nach wiederholter Stressor-Exposition beschrieben und gezeigt, dass ausschließlich in der frühen Phase des

CSC-Modells ein erhöhter Gehalt an Corticosteron im Plasma gestresster Tiere vorliegt (25). Ermittelt wurde der Gehalt nach 24 Stunden CSC sowie am Tag 3, 7, 14 und 20 (d.h. nach 2, 6, 13 und 19 Tagen CSC). 2013 spezifizierten Ushold-Schmidt et al. den Zeitpunkt des Peaks auf zehn Stunden CSC (26). Reber erklärt den nicht feststellbaren Anstieg an Corticosteron im CSC-Modell mit einem Schutzmechanismus gestresster Tiere, um schädlichem Hyper-Corticoismus entgegenzuwirken. Kritisch ist hier der Messzeitpunkt, an dem Corticosteron ermittelt wurde. Mit Tag 7 und 14 liegt die Messung genau 24 Stunden vor dem Wechsel zu einem neuen Stressor. Die *Intrudor*-Tiere waren schon sechs Tage lang bei einem dominanten Tier und konnten sich in dieser Zeit an diesen *resident* gewöhnen. Die Abbildung 3.13 widerlegt die These von Reber und zeigt, dass es 24 Stunden nach dem Wechsel zu dem zweiten und einem dritten *resident* zu einem Anstieg an Corticosteron im Blut kommt. Dies ermöglicht eine detailliertere Beschreibung des Gehaltes an Stress-Hormonen im Blut: Innerhalb eines 19 Tage-CSC-Stress-Versuches kommt es mindestens zu drei Maxima an Corticosteron, die jeweils direkt nach der Exposition zu einem neuen, unbekannten Stressor vorliegen. Diese Aussage bezieht sich ausschließlich auf Corticosteron. Der Gehalt an Adrenalin wurde nie in einer Kinetik aufgrund des methodentechnischen Aufwandes durchgeführt. Der Vorteil bei der Messung von Basal-Werten an Corticosteron ist dessen Art und Weise der natürlichen Synthese. Sobald ein Tier einem akuten Stressor ausgesetzt ist, wie z.B. ein pures Anfassen des Tieres, hat man knapp drei Minuten Zeit, um Blut zu gewinnen und eine valide Aussage darüber treffen zu können, wie der Gehalt vor der Exposition zum akuten Stressor im Blut gewesen ist („Basal-Wert“). Die Produktion von Corticosteron benötigt knappe drei Minuten, in der die HPA-Achse über die Produktion von CRH und ACTH letztendlich Corticosteron aus der Nebennierenrinde entlässt. Wird das Blut innerhalb dieser Zeit genommen, kann man sagen, dass man den Basal-Wert von Corticosteron gemessen hat. Dauert diese Prozedur jedoch länger, kann man den Basal-Wert nicht vom akuten Stress unterscheiden, welchen das Tier bei Blutentnahme erfahren hat. Gezeigt wurde von Kugler et al., dass, wenn man Mäusen Blut entnimmt, um Corticosteron nachzuweisen, es kritisch ist, in welcher Reihenfolge und in welchem Zeitraum das Ganze erfolgt (64). Dauert es zu lange, bis man Blut aus allen Tieren der Reihenfolge nach entnommen hat, werden die Ergebnisse über „Basal-Werte“ der letzteren Tiere verfälscht. Die Schwierigkeit ergibt sich jedoch bei der Messung von Adrenalin. Dort hat man keine drei Minuten Zeit für die Blutentnahme. Sobald das entsprechende Tier nur angefasst wurde, steigt der Gehalt an Adrenalin aufgrund dessen Speicherung im Nebennierenmark rapide an. Eine mögliche Lösung wäre, dem Tier einen Katheter zu setzen, wie sie schon von der Gruppe von Neumann beschrieben wurde (65).

4.7.1 Akute Behandlung mit Dexamethason imitiert akuten Stress

Um zu prüfen, ob CSC experimentell ohne Verwendung eines aggressiven *resident* imitiert werden kann, wurde ein einmaliger Bolus von Dexamethason in Mäuse injiziert und wurden am folgenden Tag (16 bis 18 Stunden später) immunologische Parameter in Milz, Blut und Knochenmark gemessen. Die Analyse der Zeitabhängigkeit immunologischer Änderungen in Milz und Knochenmark während des CSC-Stress-Modells zeigt, dass bereits zwischen 10 und 48 Stunden CSC signifikante Änderungen feststellbar waren. Der gewählte Zeitpunkt von 16 bis 18 Stunden nach Dexamethason-Behandlung liegt genau in diesem Bereich und zeigt eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen, einen Anstieg an PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) in der Milz sowie eine Reduktion an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und einen Anstieg an CD11b⁺-Zellen und PMN-MDSC im Blut (Abbildung 3.14). Im Knochenmark wurde ausschließlich eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen festgestellt. Diese Daten zeigen, dass eine Applikation von Glucocorticoiden alleine schon ausreicht, um immunologische Veränderungen in Mäusen zu induzieren. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung wurde zuvor gezeigt, dass auch nach der 6-OH Dopamin-Behandlung immunologische Veränderungen nach 19 Tagen CSC-Stress nachweisbar sind. Dabei war eine Wirkung des sympathischen Nervensystems ausgeschaltet und folglich konnten nur Glucocorticoide hormonell auf Leukozyten wirken. Dabei konnten vergleichbare Resultate festgestellt werden.

Dhabhar entwickelte ein hypothetisches Modell für Stress, welches in der Medizin verwendet werden kann. Dabei sollen akuter Stress oder moderate Mengen an Glucocorticoiden/ Adrenalin sich positiv auf nachfolgende Vakzinierungen, Wundheilungen oder Infektionen auswirken. Für wichtig hält er dabei die Quelle (synthetisch oder natürlich) und die Konzentration des Glucocorticoids (physiologisch oder pharmakologisch) und den Aktivierungsstatus (naive oder aktivierte Leukozyten, frühe vs. späte Aktivierung).

Zur akuten Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden lässt sich sagen, dass ein einmaliger Bolus an Dexamethason ausreicht, um einen akuten Stressor im CSC-Modell zu imitieren. Man erhält einen gewohnten Anstieg an CD11b⁺-Zellen und PMN-MDSC in Milz und Blut und eine Reduktion an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Inwiefern dies positive oder negative Folgen auf eine Infektion hat, ist unklar. Man müsste z.B. die Auswirkung auf eine folgende Infektion mit z.B. Leishmanien oder Listerien untersuchen oder ein Modell einer Hautreizung, z.B. DTH (*delayed type hypersensitivity*), anschließen. Die eingesetzte Menge von 5 mg/kg ist als recht hoch einzustufen und man müsste testen, ob ähnliche Effekte bei z.B. 0,5 mg/kg oder 0,1 mg/kg auftreten – welche in Bezug auf *in vivo* Verhältnisse physiologischer sind. Dhabhar verwendete bei Ratten eine einmalige Gabe von 0,1 mg/kg

Dexamethason bzw. 40 mg/ kg Corticosteron in Kombination mit 400 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser für 6 Tage und legte dies als physiologische Mengen fest (23, 66).

4.7.2 Chronische Behandlung mit Dexamethason imitiert chronischen Stress

Es kommt im CSC-Modell zu drei Peaks an Corticosteron im Blut: nach zehn Stunden, nach 7 bzw. 8 Tagen, sowie nach 14 bzw. 15 Tagen, wenn die zu stressenden *Intrudor*-Tiere zu einem neuen und unbekannten *resident* gesetzt werden. Wenn Dexamethason in naive, ungestresste Tiere gegeben wurde, sollten - ohne Verwendung eines Stressors - stresstypische Parameter in primären und sekundären lymphatischen Organen hervorgerufen werden. Als Resultat wurde ein Phänotyp erzeugt, wie man ihn durch 19 Tage CSC-Stress induzierte. In Milz und Blut waren B220⁺ B-Zellen und CD3⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen reduziert sowie PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) und MO-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) anteilmäßig erhöht (siehe Abbildung 3.15). Im Knochenmark reduzierten sich B220⁺ B-Zellen, wohingegen PMN-MDSC und MO-MDSC angestiegen waren.

Eine dreimalige Injektion von Dexamethason von jeweils 4 mg/kg und 1 mg/kg sind recht hohe Dosen an applizierten synthetischen Glucocorticoiden. Vorfinden würde man solch hohe Mengen an Glucocorticoiden bei chronischen Stressoren, die über einen langen Zeitraum auf die Homöostase einwirken. Somit scheint diese Methode eine Alternative für die Nachahmung chronisch erhöhter Stress-Hormonwerte zu sein. Letztendlich gibt es einen die Möglichkeit, Krankheiten zu untersuchen, von denen man sagt, dass sie durch Stress verschlimmert werden, und ggf. Therapien zu entwickeln, um diese zu heilen.

4.7.3 Akute Behandlung mit Dexamethason induziert einen moderaten Anstieg an G-CSF

In der sehr frühen Phase kommt es im CSC-Modell zu einem enormen Anstieg an G-CSF im Serum (Abbildung 3.11). Dabei wurde nach zehn Stunden CSC-Stress ein Gehalt von knapp 4000 pg/ml in gestressten Tieren verzeichnet. Dies gab Anlass zu untersuchen, ob eine einmalige Gabe einer hohen Menge an Dexamethason (5 mg/ kg) ausreicht, um diesen Effekt zu imitieren, und eine Aussage darüber zu treffen, ob Glucocorticoide ein möglicher Grund für einen solch enormen Anstieg sein könnten. Erzielt wurden Werte von knapp über 150 pg/ ml G-CSF im Serum nach zwei bis sechs Stunden nach Behandlung, die knapp über dem dreifachen Wert sind, wie man ihn in naiven Tieren vorfindet (Abbildung 3.16). Dieser Wert behandelter Tiere war jedoch rund 26-mal geringer als wie nach zehn Stunden im CSC-Modell. Dies gibt mir die Möglichkeit, folgenden Schluss zu ziehen: Hohe Mengen an synthetischen Glucocorticoiden wie Dexamethason induzieren einen transienten und moderaten Anstieg an G-CSF im Serum. Wie jedoch im CSC-Modell solch hohe Mengen an G-CSF zustande kommen, ist bislang unklar. Möglicherweise bewirkt Adrenalin/Noradrenalin hauptsächlich diesen Effekt, oder eine Kombination von Corticosteron mit

Adrenalin/Noradrenalin. Eine weitere hypothetische Ursache ist ein bislang unbekannter Faktor, der noch nicht berücksichtigt, aber gleichfalls in einer Stresssituation ausgeschüttet wird.

4.7.4 Blockade der HPA-Achse mit dem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten RU-486

Um die Wirkung der HPA-Achse durch einen Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten (RU-486) zu blockieren, wurden „*time-release*“-Pellets in zu stressende Tiere implantiert. Analog wurden Placebo-Pellets in Kontrolltiere operiert. Ein regulärer CSC-Stress wurde für 19 Tage durchgeführt, wobei vier Gruppen gebildet wurden: RU-486 oder Placebo bzw. SHC oder CSC. Im Ergebnis wurde nach dem CSC-Versuch festgestellt, dass Tiere, die ein RU-486-Pellet erhalten hatten, genauso immunologisch auf Stress reagierten wie Tiere, die ein Placebo-Pellet implantiert bekommen hatten. In der Milz wurde eine Reduktion an CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen sowie ein Anstieg an CD11b⁺ und PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) in beiden gestressten Gruppen festgestellt. Im Knochenmark wurde eine Reduktion an B220⁺ B-Zellen sowie ein Anstieg an CD11b⁺ Zellen und PMN-MDSC registriert. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängig durchgeführten Versuchen erhalten. Wenn man jedoch nach den Experimenten die übrig gebliebenen Pellets untersuchte, wurden keine sichtbaren Veränderungen bei den RU-486-Pellets festgestellt, und somit war es unklar, ob die Pellets funktioniert hatten. Betrachtet man sich analog die verbliebenen Placebo-Pellets (Abbildung 3.17), so ist zu erkennen, dass diese sich aufgelöst hatten, wohingegen im direkten Vergleich RU-486-Pellets unberührt erscheinen. Um zu prüfen, ob der Wirkstoff freigesetzt worden war, wurde die Glucocorticoid-Resistenz von Milz-Zellen gestresster Tiere analysiert: Die beschriebene Glucocorticoid-Resistenz sollte in gestressten Tieren mit einem RU-486-Pellet theoretisch nicht eintreten, da alle Rezeptoren blockiert sein müssten. In beiden Stress-Gruppen zeigte sich jedoch eine Glucocorticoid-Resistenz von LPS-stimulierten Milz-Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Glucocorticoid-Hemmung durch das Pellet nicht funktioniert hatte. Man könnte theoretisch auch im Urin oder Blut RU-486 mittels Massen-Spektroskopie oder HPLC (*high pressure liquid chromatography*) messen. Dafür fehlte jedoch die technische Ausstattung.

4.8 Über die Relevanz stressinduzierter myeloider Zellen

Die vorhergehenden Experimente beschäftigten sich alle mit den Mechanismen, die beschreiben sollen, wie es nach 19 Tagen CSC-Stress zu einer Akkumulation von PMN-MDSC und MO-MDSC in Milz und Knochenmark kommt. Im Weiteren sollte die Relevanz dieses erhöhten Anteils an suppressiven Zellen in sekundären Erkrankungen nach Stress untersucht werden. Wie bereits erwähnt, beschreibt Dhabhar akuten, kurzanhaltenden Stress als immun-aktivierend, wohingegen chronischer Stress und chronisch erhöhte Mengen an Stress-Hormonen als immun-suppressiv gelten (23). Das Auftreten von MDSC

bestätigt diese These. Um nun die immun-supprimierende Wirkung von chronischem Stress im CSC-Modell zu prüfen, wurde eine Erkrankung gewählt, bei der MDSC eine wichtige Rolle spielen: Der Verlauf einer Tumorerkrankung wurde untersucht.

4.8.1 Chronischer Stress beschleunigt Tumorwachstum

Nach 19 Tagen CSC-Stress wurden Fibrosarkom-Zellen in SHC-Kontrolltiere und CSC-gestresste Tiere s.c. injiziert und der Verlauf des Tumorwachstums für 23 Tage beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass gestresste Tiere ein wesentlich gesteigertes Tumorwachstum aufwiesen und nach 23 Tagen eine nahezu doppelt so schwere Tumor-Masse entwickelt hatten (Abbildung 3.18). Korrelierend mit dieser Feststellung sind in der Literatur einige Veröffentlichungen erschienen, die tumor-fördernde Effekte von Stress beschreiben (67-74). In diesen Berichten wurde ein einfach handzuhabendes Modell der sozialen Isolierung als Stressor verwendet. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass einzeln gehaltene Tiere im Vergleich zu in Gruppen gehaltenen Kontroll-Tieren einen deutlich verschlechterten Krankheitsverlauf bei Tumorwachstum aufwiesen. Die verwendeten Tumore waren Leber-Tumore, Milchdrüsen-Tumore, *Shionogi carcinoma* (ein androgen-abhängiger Milchdrüsen-Tumor (75)) und ein Ovarialkarzinom. Abgesehen von den unterschiedlichen Stress-Modellen und unterschiedlichen Arten von Tumoren lässt sich als Resümee festhalten, dass chronischer Stress Tumorwachstum fördert und man dies einerseits dadurch begründen kann, dass chronischer Stress MDSC generiert, die im Falle einer Tumorerkrankung eine Expansion des Tumors begünstigen, andererseits dadurch, dass chronischer Stress ein erhöhtes Aufkommen an T_{Reg} induziert (Abbildung 3.1). Bei Patienten, die an Tumorerkrankungen leiden, wurde ein erhöhtes Aufkommen an T_{Reg} in der Peripherie (wie z.B. in der Milz oder im peripheren Blut) sowie lokal im Tumor-Milieu festgestellt. Weiterhin lässt sich eine direkte Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der Anzahl an T_{Reg} herstellen (76-80).

In der zellulären Analyse der Milzen von 23 Tage tumor-tragenden SHC- und CSC-Tieren zeigte sich in zuvor CSC-gestressten Tieren ein erhöhtes Aufkommen an CD11b⁺ Zellen und PMN-MDSC. Mögliche Ursache wäre hier die vergrößerte Tumor-Masse von gestressten Tieren. Somit könnte man die Größe des Tumors mit der Anzahl an peripheren CD11b⁺ myeloiden Zellen/MDSC korrelieren. Ob dies ein langanhaltender Stress-Effekt ist, sei dahingestellt. Dhabhar untersuchte anhand eines zweistündigen *Restraint*-Stressors die Stabilität immunologischer Änderungen nach Stress (36, 41). Dabei fand er heraus, dass Lymphozyten wie T- und B-Zellen sowie Monozyten innerhalb von drei Stunden nach Stressor-Beendigung auf Basal-Niveau zurückkehrten, wohingegen Neutrophile stetig weiter anstiegen. Diese Studie ist wahrscheinlich schwer mit dem CSC-Modell vergleichbar. Das CSC-Modell ist ein Modell für ununterbrochenen, chronischen Stress, wohingegen Dhabhar

einen 120-minütigen *Restraint-Stress* untersucht. Deshalb ist es unklar, wie Dhabhars Ergebnisse mit dem CSC-Modell verglichen werden können. Eine Erholungsphase nach CSC-Stress von 23 Tagen (während des Tumorwachstums) scheint jedoch eine sehr lange Zeit und myeloide Zellen sollten in dieser Zeit wieder auf Basal-Niveau gekommen sein. Demzufolge ist die erhöhte Anzahl von MDSC in der Milz von CSC-gestressten tumortragenden Tieren auf den Tumor zurückzuführen.

Ein funktioneller Test von PMN-MDSC und MO-MDSC nach 19 CSC-Stress und 23 Tage Tumorwachstum wurde ebenfalls durchgeführt. Dabei zeigten sich beide MDSC-Populationen suppressiv gegenüber proliferierenden T-Zellen. Ohne Tumor waren MDSC aus der Milz - und speziell PMN-MDSC - nie suppressiv. Ein Tumor scheint somit ein starker Stimulus zu sein, der unreife, suppressive, myeloide Zellen in der Milz auftreten lässt. Dies korreliert mit dem Wissen aus der Tumor-Immunologie (20, 21). Erstaunlicherweise waren MDSC aus Tieren, die zuvor 19 Tage CSC-Stress erfahren hatten, schlechtere Supprimoren als die von ungestressten Kontrolltieren. Warum das so ist, ist unklar. Eine theoretische Erklärung wäre, dass CSC-gestresste Tiere von Beginn an eine erhöhte Anzahl an unreifen MDSC hatten, die sich alle zu reifen DC, Monozyten oder Granulozyten entwickelten. Um dies zu testen, könnte man den Tieren Brodmadesoxyuridin (BrdU) während des CSC-Stress-Modells geben und im Anschluss wieder normales Trinkwasser. BrdU als Analogon von Thymidin wird bei proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut. Man könnte anhand mehrerer Versuche, bei dem BrdU zu unterschiedlichen Zeitpunkten den Tieren verabreicht wird, den Augenblick der Proliferation bestimmter Zellen festlegen und eine Aussage darüber treffen, ob sie vor oder erst mit dem Tumor entstanden sind. Weiterhin besteht die Frage, welch ein Alter eine unreife, myeloide Zelle erreichen kann. In der Literatur ist z.B. beschrieben, dass reife Granulozyten eine Lebensdauer von knappen 12 - 18 Stunden besitzen, die nach einer Infektion um einen großen Teil verlängert wird (81). Somit scheint eine MDSC *in vivo* nur eine kurze Lebenszeit zu haben und der Rundumumsatz muss sehr hoch sein, der eines ständigen Stimulus bedarf.

4.8.2 Untersuchung der Mechanismen, die nach CSC-Stress Tumorwachstum fördern

Nach der Beobachtung, dass CSC-Tiere innerhalb von 23 Tagen im Vergleich zu SHC-Kontrolltieren nahezu doppelt so große Tumore entwickelten, stellte sich die Frage, warum das so ist. Die Vermutung lag nahe, dass Angiogenese und Vaskularisierung bei CSC-Tieren schneller und effektiver im Verlauf des Tumorwachstums stattgefunden hatten. Um diese These zu überprüfen, wurden Tumore von SHC- und CSC-Tieren zu einem früheren Zeitpunkt untersucht, an dem Angiogenese stattfinden muss. Dieser Zeitpunkt liegt kurz vor dem exponentiellen Wachstum des Tumors. Tumore mit neun Tagen Wachstum in CSC-Tieren hatten im Vergleich zu SHC-Kontrolltieren schon zu diesem Zeitpunkt leicht

vergrößerte Tumore entwickelt und dies korreliert gleichfalls mit dem Gewicht der isolierten Tumor-Massen (Abbildung 3.20). In der histologischen Analyse mit CD31 und MECA-32 zeigten Tumore von CSC-Tieren mehr Endothelzellen. Dies bestätigt die Hypothese und zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die Vaskularisierung in Tumoren von CSC-Tieren weiter voran geschritten ist als in Tumoren von SHC-Kontrolltieren und somit die Voraussetzung für ein erhöhtes Tumorwachstum gegeben ist. Interessant wäre hier noch gewesen, weitere Marker für Angiogenese zu messen: Faktoren wie VEGF, FGF, TGF- β , eNOS und COX2 könnten im Tumor-Gewebe mittels qPCR gemessen werden.

Die Hypothese, dass neun Tage nach Beendigung von CSC Stress-Effekte hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung der Milz nicht mehr nachweisbar sind und die erhöhte Anzahl an MDSC mit der Größe der Tumore in direkter Verbindung steht, wurde in dieser Arbeit belegt (vgl. Abb. 3.21 und 3.22).

Es wurde geprüft, wie lang anhaltend Stress-Effekte nach Stressor-Beendigung sind. Neun Tage nach Absetzung von CSC-Stress zeigte sich immer noch eine Reduktion an CD3 $^{+}$ und CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T-Zellen in der Milz, während CD11b $^{+}$ Zellen, beide MDSC-Populationen und T_{Reg} unverändert waren (Abbildung 3.22). PMN-MDSC aus der Milz waren nicht suppressiv, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um reife Neutrophile handelte. MO-MDSC waren suppressiv und solche aus CSC-Tieren zeigten ein erhöhtes suppressives Verhalten. Dies wäre somit ein Anzeichen, dass der Stress-Status noch auf die Funktionalität neun Tage nach Beendigung auf MO-MDSC besitzt. Daraus lässt sich folgern, dass durch CSC-Stress nur die anfängliche Immunreaktion, wie z. B. die Angiogenese, beeinflusst wird, während im späteren Verlauf die tumor-induzierte Immunmodulation den Stress-Effekt überwiegt.

4.8.3 Chronische Behandlung mit Glucocorticoiden hat keinen Einfluss auf Tumorwachstum

Wie zuvor gezeigt wurde, imitiert eine dreimalige Gabe von Dexamethason in hohen Dosen die Peaks an Stress-Hormonen im CSC-Modell und analog dazu induziert 19 Tage CSC-Stress ein erhöhtes Auftreten von CD11b $^{+}$ myeloiden Zellen (Abbildung 3.15). Die Frage, ob durch diese Vorbehandlung gleichfalls ein erhöhtes Tumorwachstum induziert werden kann, wurde geprüft. Dabei wurde festgestellt, dass zwischen den beiden Gruppen kaum ein Unterschied im Tumorwachstum beobachtet werden konnte (Abbildung 3.23). Entsprechend waren in der Milz auch keine immunologischen Veränderungen nachzuweisen und das suppressive Verhalten von PMN-MDSC und MO-MDSC unterschied sich nicht in den beiden Gruppen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Glucocorticoide nicht die alleinigen Mediatoren sind, die stressbedingte Pathologien induzieren. Vielmehr scheint es multifaktoriell bedingter Natur zu sein und Glucocorticoide agieren möglicherweise zusammen mit Adrenalin/Noradrenalin und anderen unbekannten Faktoren.

4.9 Anmerkung T-Zell Suppression Assay

Als wichtig ist zum Schluss noch anzumerken, dass bei den funktionellen Analysen der suppressiven Eigenschaften von PMN-MDSC und MO-MDSC die Reinheit der gereinigten Zellen zwischen verschiedenen Experimenten nicht identisch war. Innerhalb eines Experimentes glichen sich die Reinheits-Grade von PMN-MDSC und MO-MDSC in beiden Stress-/Behandlungsgruppen, dass somit innerhalb eines Experimentes/ Versuches aus jeweils der Kontroll- und Behandlungsgruppen direkt verglichen werden können. Man kann jedoch nicht sagen, dass in einem bestimmten Experiment suppressivere MO-MDSC durch eine Behandlung generiert wurden, wohingegen in einem anderen Experiment der Effekt schwächer ausfiel. Im Folgenden erstelle ich eine Liste, die die jeweiligen Reinheitsgrade in den verschieden Experimenten auflistet.

Abbildung	Reinheit PMN-MDSC	Reinheit MO-MDSC
3.19	90% mit 10% MO-MDSC	35% – 40%
3.21	> 95%	10% – 20%
3.22	> 95%	50% – 60%
3.24	90% mit 10% MO-MDSC	85% – 95%

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen chronisch-psychosozialer Stress auf das Immunsystem besitzt. CSC induziert unreife, myeloide Zellen, die regulatorisch das Immunsystem beeinflussen und in der Literatur als myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*; MDSC) bekannt sind. Lymphozyten, B- und T-Zellen, waren nach CSC in sekundär lymphatischen Organen reduziert, wohingegen MDSC prozentual anstiegen. Ferner stieg das suppressive Verhalten monozytischer MDSC aus dem Knochenmark nach CSC um ein Vielfaches an. In einer Reihe von Versuchen wurde untersucht, wie MDSC im zeitlichen Verlauf von CSC in Knochenmark und Milz akkumulierten.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit den molekularen Mechanismen, die solch eine Akkumulation von MDSC begünstigten. Dazu wurde sowohl die Rolle von inflammatorischen Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor (*tumor necrosis factor*; TNF) oder Interleukin 6 (IL-6), als auch die Rolle der beiden Haupt-Stresshormone Adrenalin und Corticosteron näher untersucht. Es wurde deutlich, dass die Aktivierung des TNF-Rezeptors Typ 2 (TNFR2) durch TNF für die Akkumulation von MDSC wesentlich ist. Hinsichtlich der beiden Haupt-Stresshormone zeigte sich, dass Adrenalin nur teilweise an der Akkumulation von MDSC beteiligt ist, während Glucocorticoide eine bedeutende Rolle für diesen Stress-vermittelten Effekt zu spielen scheinen. Behandlung naiver Tiere mit einem synthetischen Glucocorticoid erzeugte die gleichen Effekte, wie sie nach chronischem Stress festgestellt wurden.

MDSC wurden ursprünglich in Patienten gefunden, die an einer Krebs Erkrankung leiden, und es besteht eine direkte Korrelation bezüglich der Anzahl an MDSC und der Tumor-Größe. Aufgrund der Tatsache, dass nach chronischem Stress ein vermehrtes Auftreten von MDSC nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob chronischer Stress Tumor-Wachstum begünstigt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das Wachstum eines Fibrosarkoms nach CSC verstärkt war. Das gesteigerte Wachstum scheint vor allem durch eine erhöhte Angiogenese in der frühen Phase des Tumor-Wachstums vermittelt zu sein. Eine Vor-Behandlung naiver Tieren mit einem synthetischen Glucocorticoid zeigte jedoch keinen Einfluss auf das Tumorwachstum. Dies deutet darauf hin, dass neben Glucocorticoiden noch weitere Faktoren dafür verantwortlich sind, dass nach CSC das Tumorwachstum verstärkt war.

Referenzen

1. Cannon WB. 1932. *The Wisdom of the Body*. New York: W.W. Northern & Company, Inc
2. Sterling P, Eyer J. 1981. *Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology*. New York: John Wiley and Sons
3. Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138
4. Selye H. 1975. Confusion and controversy in the stress field. *J Human Stress* 1: 37-44
5. Selye H. 1950. *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress*. Montreal: Acta Medica Publ.
6. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wohr M, Fuchs E. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1291-301
7. Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5: 374-81
8. Rabin BS. 1999. *Stress, Immune Functions and Health. The Connection*. New York: Wiley-Liss & Sons Inc
9. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67: 259-84
10. Reul JM, de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-11
11. Cruvinel Wde M, Mesquita D, Jr., Araujo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, Andrade LE. 2010. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol* 50: 434-61
12. Mesquita Junior D, Araujo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP. 2010. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol* 50: 552-80
13. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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: 1151-64
14. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. 2012. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J* 26: 2253-76
15. Mahmud SA, Manlove LS, Schmitz HM, Xing Y, Wang Y, Owen DL, Schenkel JM, Boomer JS, Green JM, Yagita H, Chi H, Hogquist KA, Farrar MA. 2014. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol* 15: 473-81
16. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. 2001. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98: 2736-44
17. Serafini P. 2013. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Res* 57: 172-84
18. Talmadge JE, Gabrilovich DI. 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 13: 739-52
19. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67: 425; author reply 6
20. Gabrilovich DI, Nagaraj S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-74
21. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12: 253-68
22. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, De Palma A, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L,

- Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A. 2011. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 208: 1949-62
23. Dhabhar FS. 2009. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16: 300-17
24. Bartolomucci A. 2007. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front Neuroendocrinol* 28: 28-49
25. Reber SO, Birkeneder L, Veenema AH, Obermeier F, Falk W, Straub RH, Neumann ID. 2007. Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psychosocial stress paradigm in mice: implications and mechanisms. *Endocrinology* 148: 670-82
26. Uschold-Schmidt N, Peterlik D, Fuchsl AM, Reber SO. 2013. HPA axis changes during the initial phase of psychosocial stressor exposure in male mice. *J Endocrinol* 218: 193-203
27. Uschold-Schmidt N, Nyuyki KD, Fuchsl AM, Neumann ID, Reber SO. 2012. Chronic psychosocial stress results in sensitization of the HPA axis to acute heterotypic stressors despite a reduction of adrenal in vitro ACTH responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1676-87
28. Singewald GM, Nguyen NK, Neumann ID, Singewald N, Reber SO. 2009. Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. *Stress* 12: 58-69
29. Reber SO, Peters S, Slattery DA, Hofmann C, Scholmerich J, Neumann ID, Obermeier F. 2011. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain Behav Immun* 25: 1153-61
30. Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Veenema AH, Neumann ID. 2008. Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms. *Stress* 11: 225-34
31. Reber SO, Neumann ID. 2008. Defensive behavioral strategies and enhanced state anxiety during chronic subordinate colony housing are accompanied by reduced hypothalamic vasopressin, but not oxytocin, expression. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 184-95
32. Peters S, Grunwald N, Rummele P, Endlicher E, Lechner A, Neumann ID, Obermeier F, Reber SO. 2012. Chronic psychosocial stress increases the risk for inflammation-related colon carcinogenesis in male mice. *Stress* 15: 403-15
33. Schmidt D, Reber SO, Botteron C, Barth T, Peterlik D, Uschold N, Mannel DN, Lechner A. 2010. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav Immun* 24: 1097-104
34. Varga G, Ehrchen J, Tsianakas A, Tenbrock K, Rattenholl A, Seeliger S, Mack M, Roth J, Sunderkoetter C. 2008. Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 84: 644-50
35. Trottier MD, Newsted MM, King LE, Fraker PJ. 2008. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2028-33
36. Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. 2012. Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1345-68
37. Harle P, Mobius D, Carr DJ, Scholmerich J, Straub RH. 2005. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 1305-13
38. Schmidt D. 2011. *Charakterisierung myeloider Zellen im Stressmodell CSC*. Master Arbeit thesis. University of Regensburg, Regensburg

39. Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, Yu M, Wang J, Jiang X, Feng W, Qin Z, Yin B, Li Z. 2014. Transmembrane TNF-alpha promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J Immunol* 192: 1320-31
40. Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, Wu H, Xu X, Erben U, Wu P, Syrbe U, Sieper J, Qin Z. 2012. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* 122: 4094-104
41. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 154: 5511-27
42. Dhabhar FS, Miller AH, Stein M, McEwen BS, Spencer RL. 1994. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain Behav Immun* 8: 66-79
43. Nyuyki KD, Beiderbeck DI, Lukas M, Neumann ID, Reber SO. 2012. Chronic subordinate colony housing (CSC) as a model of chronic psychosocial stress in male rats. *PLoS One* 7: e52371
44. Jin J, Wang X, Wang Q, Guo X, Cao J, Zhang X, Zhu T, Zhang D, Wang W, Wang J, Shen B, Gao X, Shi Y, Zhang J. 2013. Chronic psychological stress induces the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in mice. *PLoS One* 8: e74497
45. Allen RG, Lafuse WP, Powell ND, Webster Marketon JI, Stiner-Jones LM, Sheridan JF, Bailey MT. 2012. Stressor-induced increase in microbicidal activity of splenic macrophages is dependent upon peroxynitrite production. *Infect Immun* 80: 3429-37
46. Avitsur R, Kavelaars A, Heijnen C, Sheridan JF. 2005. Social stress and the regulation of tumor necrosis factor-alpha secretion. *Brain Behav Immun* 19: 311-7
47. Bailey MT, Engler H, Powell ND, Padgett DA, Sheridan JF. 2007. Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1180-90
48. Bailey MT, Kierstein S, Sharma S, Spaits M, Kinsey SG, Tliba O, Amrani Y, Sheridan JF, Panettieri RA, Haczku A. 2009. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhibits corticosteroid responsiveness of cytokine production. *J Immunol* 182: 7888-96
49. Bailey MT, Kinsey SG, Padgett DA, Sheridan JF, Leblebicioglu B. 2009. Social stress enhances IL-1beta and TNF-alpha production by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated CD11b+ cells. *Physiol Behav* 98: 351-8
50. Engler H, Engler A, Bailey MT, Sheridan JF. 2005. Tissue-specific alterations in the glucocorticoid sensitivity of immune cells following repeated social defeat in mice. *J Neuroimmunol* 163: 110-9
51. Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA. 2008. The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. *Physiol Behav* 93: 628-36
52. Powell ND, Bailey MT, Mays JW, Stiner-Jones LM, Hanke ML, Padgett DA, Sheridan JF. 2009. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain Behav Immun* 23: 225-31
53. Powell ND, Sloan EK, Bailey MT, Arevalo JM, Miller GE, Chen E, Kobor MS, Reader BF, Sheridan JF, Cole SW. 2013. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via beta-adrenergic induction of myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16574-9
54. Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Lai W, Dhabhar F, Sheridan JF. 2003. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *J Neuroimmunol* 137: 51-8
55. Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP. 2012. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1491-505
56. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, Nelson RJ, Godbout JP, Sheridan JF. 2011. beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci* 31: 6277-88

57. Wohleb ES, Patterson JM, Sharma V, Quan N, Godbout JP, Sheridan JF. 2014. Knockdown of interleukin-1 receptor type-1 on endothelial cells attenuated stress-induced neuroinflammation and prevented anxiety-like behavior. *J Neurosci* 34: 2583-91
58. Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, Sheridan JF. 2013. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci* 33: 13820-33
59. Dhabhar FS. 2000. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 917: 876-93
60. Dhabhar FS. 2003. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. *Ann N Y Acad Sci* 992: 205-17
61. Gabay C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2: S3
62. Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. 2010. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* 11: 1-26
63. Van Hauwermeiren F, Vandebroucke RE, Libert C. 2011. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 311-9
64. Kugler J, Lange KW, Kalveram KT. 1988. Influence of bleeding order on plasma corticosterone concentration in the mouse. *Exp Clin Endocrinol* 91: 241-3
65. Nyuyki KD, Maloumby R, Reber SO, Neumann ID. 2012. Comparison of corticosterone responses to acute stressors: chronic jugular vein versus trunk blood samples in mice. *Stress* 15: 618-26
66. Dhabhar FS, McEwen BS. 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1059-64
67. Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I. 2000. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci* 66: 1827-38
68. Wu W, Murata J, Murakami K, Yamaura T, Hayashi K, Saiki I. 2000. Social isolation stress augments angiogenesis induced by colon 26-L5 carcinoma cells in mice. *Clin Exp Metastasis* 18: 1-10
69. Strange KS, Kerr LR, Andrews HN, Emerman JT, Weinberg J. 2000. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. *Neurotoxicol Teratol* 22: 89-102
70. Kerr LR, Wilkinson DA, Emerman JT, Weinberg J. 1999. Interactive effects of psychosocial stressors and gender on mouse mammary tumor growth. *Physiol Behav* 66: 277-84
71. Liu H, Wang Z. 2005. Effects of social isolation stress on immune response and survival time of mouse with liver cancer. *World J Gastroenterol* 11: 5902-4
72. Kerr LR, Hundal R, Silva WA, Emerman JT, Weinberg J. 2001. Effects of social housing condition on chemotherapeutic efficacy in a Shionogi carcinoma (SC115) mouse tumor model: influences of temporal factors, tumor size, and tumor growth rate. *Psychosom Med* 63: 973-84
73. Grimm MS, Emerman JT, Weinberg J. 1996. Effects of social housing condition and behavior on growth of the Shionogi mouse mammary carcinoma. *Physiol Behav* 59: 633-42
74. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, Bankson JA, Ravoori M, Merritt WM, Lin YG, Mangala LS, Kim TJ, Coleman RL, Landen CN, Li Y, Felix E, Sanguino AM, Newman RA, Lloyd M, Gershenson DM, Kundra V, Lopez-Berestein G, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* 12: 939-44
75. Kitamura Y, Okamoto S, Uchida N, Yamaguchi K, Matsumoto K. 1978. Effect of androgen depletion on growth and androgen dependency of Shionogi carcinoma 115. *Cancer Res* 38: 4711-6

76. Nishikawa H, Sakaguchi S. 2010. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127: 759-67
77. Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W. 2010. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int J Cancer* 127: 748-58
78. Adeegbe DO, Nishikawa H. 2013. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol* 4: 190
79. Whiteside TL, Schuler P, Schilling B. 2012. Induced and natural regulatory T cells in human cancer. *Expert Opin Biol Ther* 12: 1383-97
80. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. 2010. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 107: 57-117
81. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1618-31

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+-	Positiv/ negativ
°C	Grad Celcius
µ	Mikro (10^{-6})
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> , adrenocorticotropes Hormon
ADAM 17	<i>disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17</i>
APC	Allophycocyanin oder Antigen-Präsentierende Zelle
ARG1	Arginase1
ATP	Adenosin Triphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
BCR	<i>B cell receptor</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	<i>cyclic Adenosin Monophosphate</i>
CCL	CC Chemokine Ligand
CCR	CC Chemokine Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CD62L	L-Selektin
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein-succinimidylester
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CR	<i>complement receptor</i>
CRH	<i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
CSC	<i>chronic subordinate colony housing</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4</i>
CXCL	CXC Chemokin Ligand
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
Cy5	ein Cyanfarbstoff (max. Emission bei 670 nm)
D	<i>diversity</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dichlorid
DC	dendritic cell, dendritische Zelle

DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	<i>Dextran sodium sulphate</i>
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-activated-cell-sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kalbserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FoxP3	Forhead-Box-Protein P3
FSC/ SSC	<i>forward/ side scatter</i> , Vor-/Seitwärtsstreulicht
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GARP	<i>glycoprotein A repetitions predominant</i>
GC	Glucocorticoid
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte- macrophage colony-stimulating factor</i>
G-MDSC	<i>granulocytic-MDSC</i>
GR	Glucocorticoid Rezeptor
GR-1	Glutathione-Reduktase
H-CAM	<i>Homing-associated cell adhesion molecule</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen DR</i>
HPA-axis	<i>hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis</i> , Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IDO	<i>indoleamine-2,3-desoxygenase</i>
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMC	<i>immature myeloid cells</i>

iNOS	<i>inducible nitric oxidase synthase</i>
iT _{Reg}	induzierte T _{Reg}
J	<i>joining</i>
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
I	Liter
LAG-3	<i>lymphocyte activation antigen-3</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LD-Säule	<i>large depletion</i>
LN	<i>Lymphnode, Lymphknoten</i>
LS-Säule	<i>large separation</i>
m	Milli (10^{-3})
M	Molar (mol/ l)
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
MHC-I/ II	<i>major histocompatibility complex</i> Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse-I/ II
min.	Minute(n)
MO-MDSC	<i>monocytic-MDSC</i>
MPO	<i>myeloperoxidase</i>
MR	Mineralocorticoid Rezeptor
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MS-Säule	<i>middle separation</i>
n.d.	<i>Not determined</i> (nicht gemessen)
NE	Neutrophil-Elastase
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NK	natürliche Killer
NO	<i>nitric oxide</i>
NS	natürliche Suppressor
nT _{Reg}	natürliche T _{Reg}
p	Pico (10^{-12})
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pLN	Peripherale Lymphknoten
<i>polymorphonuclear-MDSC</i>	PMN-MDSC
POMC	<i>Proopiomelanocortin</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.c	sub cutan
SCF	<i>stem cell factor</i>
sec.	Sekunde(n)
SHC	<i>single housed controle</i>
SNS	<i>Sympahtetic nervous system</i> , sympathische Nervensystem
TCR	<i>T cell-rezeptor</i>
T_{Eff}	Effektor-T-Zelle
TGF- β	transforming growth factor- β
T_{H} -Zelle	T-Helper-Zelle
TIM3	<i>T cell immunglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TLR	Toll-like receptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFRSF25	TNF-Superfamilien Mitglied 25
T_{Reg} -Zelle	regulatorische Z-Zelle
UC	Colitis ulcerosa
V	<i>variable</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR1	<i>vascular endothelial growth factor</i> “ (VEGF)-Rezeptor 1
WT	Wildtyp

z.B.	zum Beispiel
α	anti- oder alpha

Curriculum Vitae

■ Persönliche Daten

Name: Dominic Schmidt
 Geburtsdatum: 17/09/1984
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Adresse: Implerstraße 88, 81371 München

■ Ausbildung

09/2011 – 12/2014	Doktorarbeit (Dr. rer. nat.), Institut für Immunologie, Universität Regensburg
10/2009 – 08/2011	Biologiestudium (Master-Studium), Universität Regensburg
10/2006 – 09/2009	Biologiestudium (Bachelor-Studium), Universität Regensburg
10/2005 – 04/2006	Chemiestudium, Universität Regensburg
09/1995 – 07/2005	Gymnasium Pindl, Regensburg
09/1991 – 07/1995	Grundschule, Regenstauf

■ Abschlüsse

- Biologie, B.Sc.
Titel: "T-Zell Differenzierung in einem Stress-Modell"
- Biologie, M.Sc.
Titel: "Charakterisierung von myeloiden Zellen im Stress Modell CSC"

■ Weiterführende Ausbildung

- Tierexperimenteller Kurs (Kategorie B) (FELASA) (2012)

■ Poster Präsentationen

- EMDS meeting, Brüssel , Belgien, 22/09/2011 – 24/09/2011
- GEBIN meeting, Regensburg, 20/03/2013 – 23./03/2013
- 20th Annual Meeting of the PsychoNeuroImmunoResearch Society (PNIRS), Stockholm, Schweden 05/06/2013 – 08/06/2013
- DGfI meeting, Mainz, 11/09/2013 – 14/10/2013
- EMDS meeting, Erlangen, 10/10/2013 – 12/10/2013

■ Kongress-Verträge

- Workshop der Studiengruppe NeuroEndocrinolImmunolgy (AK NEI) Dummerstorf, 02/03/2012 – 03/03/2012

■ Fortbildung

- Autumn School in Immunology, Bad Schandau, 30/09/2012 – 6/10/2012
- Spring School in Immunology, Ettal, 09/03/2014 – 14/03/2014

■ Publikationen

- 1) **Schmidt D.**, Reber S.O., Botteron C., Barth T., Peterlik D., Uschold N., Männel D.N, Lechner A.
Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav Immun.* 2010. 24:1097-104
- 2) Barth T, **Schmidt D.**, Botteron C., Nguyen T.T., Ritter U., Männel D.N, Lechner A. An early reduction in Treg cells correlates with enhanced local inflammation in cutaneous leishmaniasis in CCR6-deficient mice. *PLoS One.* 2012;7(9):e44499
- 3) Weber-Steffens D, Hunold K, Kürschner J, Martinez SG, Elumalai P, **Schmidt D**, Trevani A, Runza VL, Männel DN. Immature mouse granulocytic myeloid cells are characterized by production of ficolin-B. *Mol Immunol.* 2013 Dec;56(4):488-96
- 4) Johannes Polz, Annika Remke, Sabine Weber, **Dominic Schmidt**, Dorothea Weber-Steffens, Anne Pietryga-Krieger, Nils Müller, Uwe Ritter, Sven Mostböck, Daniela N. Männel. Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity

Danksagung

Zuletzt möchte ich mich noch bei all den Menschen bedanken, die mir es ermöglicht haben, diese Doktorarbeit zu erstellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela Männel, die mir die Stelle als Doktorand noch während der Zeit meiner Masterarbeit zusicherte und mir ermöglichte diese Doktorarbeit zu erstellen. Ich bedanke mich herzlichst bei ihr, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatte, mir mit Rat und Anregungen beiseite stand und immer Vertrauen in mich und in meine Arbeit setzte.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Anja Lechner, die die Zeit meiner Bachelor- und Masterarbeit, sowie Großteiles meine Doktorarbeit betreute. Nur durch die Zusammenarbeit mit ihr, konnte dieses Projekt langjährig solch positive Erfolge erzielen.

Prof. Dr. Stefan O. Reber danke Ich für seine großartige Unterstützung und Hilfestellung bei allen Fragestellungen und Problemen. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und gab mir immer beste Anregungen an mein Ziel zu gelangen. Stefan, Ich bedanke mich dafür, dass ich während meines Studiums von Dir persönlich das Handwerk aller Stress-Versuche erlernen durfte. Nur durch dich ist es überhaupt möglich gewesen, dieses Stress-Projekt zu initiieren und langjährig so erfolgreich durchzuführen.

Prof. Dr. Peter Flor und Dr. Nicole Ushold/Schmidt danke ich, dass Sie der Immunologie und mir die Möglichkeit gegeben haben, das Stress-Modell nach dem Weggang von Prof. Dr. O. Stefan Reber nach Ulm fortzuführen und überhaupt meine Doktorarbeit zu beenden.

Ein großer Dank geht an meinen langjährigen Freund und Kollegen Daniel Peterlik. Zusammen mit ihm vollendeten wir beide erfolgreich seit der Bachelorarbeit unser Studium und arbeiteten Hand-in-Hand an dem gleichen Stress-Modell. Neben der Arbeit im Labor wurde er auch ein sehr guter Freund neben dem Studium.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Kollegen und Mitarbeitern aus dem Institut für Immunologie. Ich danke vor allem Doro, Anne, Karin, Trang, Tobias, David, Max und allen anderen, die mir nicht nur arbeitstechnisch, sondern auch in allen anderen Bereichen unter die Arme gegriffen und geholfen haben.

Meiner Familie möchte ich meinen größten Dank aussprechen. Vor allem meiner Mutter Patricia, meinen Vater Hans und meinen Geschwistern Sina, Claudio und Tassilo danke ich für die Kraft und Hilfe, die sie mir allzeit gaben.

Josef Meier danke ich für das Korrekturlesen bzw. der Richtigkeit der deutschen Rechtschreibung.

Euch allen und alle hier unerwähnten gilt ein von Herzen kommendes:

DANKE

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen als die angegebenen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Dominic Schmidt