

Aus der Abteilung Immunologie (Leiterin Univ.- Prof. Dr. med. Barbara Bröker)
des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Stammspezifische Stresssuszeptibilität bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen im psychischen Stress

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2010

vorgelegt von: Anne Baumgart
geb. am: 09.05.1984
in: Berlin

Dekan: Herr Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
1. Gutachter: Frau Prof. Dr. B. Bröker (Greifswald)
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. P. Arck (Berlin)
Ort, Raum: Greifswald, Hörsaal Urologie
Tag der Disputation: 08.04.2011

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	2
II.	Abbildungsverzeichnis	5
III.	Tabellenverzeichnis	6
IV.	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	8
1.1.	Stressdefinition	8
1.2.	Biologische Konsequenzen von Stress	10
1.2.1.	Neuroendokrine Veränderungen	10
1.2.2.	Stress und das Immunsystem	13
1.2.3.	Bakterielle Translokation	15
1.2.4.	Tryptophanstoffwechsel	18
1.3.	Stammvergleiche (BALB/c vs. C57BL/6 vs. CBA)	21
1.4.	Fragestellung	24
2.	Material	25
2.1.	Antikörper und Chemikalien	25
2.2.	Puffer und Lösungen	25
2.3.	Verbrauchsmaterialien	26
2.4.	Geräte	26
2.5.	Kits	27
2.6.	Versuchstiere	27
2.7.	Kulturmedium für bakterielle Anzucht	27
2.8.	Kulturmedium für murine Zellen	27
2.9.	Narkose	27
2.10.	Computerprogramme	28
3.	Methoden	29
3.1.	Stressmodell	29
3.1.1.	Versuchstiere und Versuchsbedingungen	29
3.1.2.	Akutes und chronisches Stressmodell	29
3.2.	Bestimmung der individuellen Reaktion auf psychischen Stress	31
3.2.1.	Stress Severity Score (SSS)	31

3.2.2.	Acute Stress Severity Score (ASSS)	32
3.2.3.	Gewinnung von Blut und Organen.....	33
3.2.4.	Quantifizierung der Blutzellpopulationen	34
3.2.5.	Milzzellpräparation.....	34
3.2.6.	Durchflusszytometrie	35
3.2.7.	Bestimmung der Kortikosteronkonzentration im Plasma	35
3.2.8.	Bestimmung der bakteriellen Translokation.....	36
3.2.9.	Konzentrationsbestimmung von Tryptophan und Tryptophankataboliten im Plasma	36
3.2.10	Statistik.....	37
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Unterschiedliche Stressanfälligkeit von BALB/c- und C57BL/6- Mäusen	38
4.1.1.	Mausstammspezifische Verhaltensauffälligkeiten nach akuter Stressexposition	38
4.1.2.	Mausstammspezifische Verhaltensauffälligkeiten nach chronischer Stressbehandlung	40
4.2.	Veränderungen von Glukokortikoidspiegeln, hämatologischen Parametern und Gewicht in beiden Mausstämmen nach Stressexposition.....	43
4.2.1.	Aktivierung der HPA-Achse in akut und chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	43
4.2.2.	Leuko- und Lymphozytopenie im Blut nach akuter und chronischer Stressexposition.....	46
4.2.3.	Stärkerer Gewichtsverlust nach chronischer Stressexposition bei BALB/c-Mäusen.....	49
4.3.	Bakterielle Translokation in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach akuter Stressexposition	50
4.4.	Stressinduzierte Veränderungen des Tryptophanmetabolismus	51
4.4.1.	Induktion des Kynureninstoffwechselweges direkt nach akuter Stressexposition in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	51
4.4.2.	Verstärkter Tryptophankatabolismus nur in chronisch gestressten BALB/c-Mäusen	55
5.	Diskussion	57

6.	Zusammenfassung	71
V.	Literaturverzeichnis	73
VI.	Eidesstattliche Erklärung	85
VII.	Lebenslauf.....	86
VIII.	Danksagung	87

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Chronisches Stressmodell.....	30
Abb. 2: Akutes Stressmodell.....	31
Abb. 3: Parameter des Acute Stress Severity Scores (ASSS) bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	39
Abb. 4: Gesamtpunktzahl des Acute Stress Severity Scores (ASSS) bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	40
Abb. 5: Kot- und Urinabgabe in chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	41
Abb. 6: Verhaltensänderungen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen während chronischer Stressbehandlung.....	42
Abb. 7: Gesamtpunktzahl des Stress Severity Scores (SSS).....	42
Abb. 8: Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress.....	44
Abb. 9: Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach akutem Stress.....	45
Abb. 10: Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach chronischem Stress.....	45
Abb. 11: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress.....	47
Abb. 12: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach akutem Stress.....	47
Abb. 13: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	48
Abb. 14: Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen im peripheren Blut von chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	48
Abb. 15: Anteil apoptotischer T-Zellen in Milzzellsuspensionen beider Mausstämmen nach chronischer Stressexposition.....	49
Abb. 16: Gewichtsveränderungen durch chronischen Stress bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....	50
Abb. 17: Bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten (MLN) bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach akuter Stressexposition.....	51
Abb. 18: Tryptophan und Tryptophanmetabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress.....	53
Abb. 19: Tryptophan und Tryptophanmetabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach akutem Stress.....	54
Abb. 20: Tryptophan und Tryptophanmetabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach chronischem Stress.....	56

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Parameter und Punktwerte des SSS zur Einschätzung des individuellen Verhaltens nach Stressende (nach Kiank ⁴⁶).....	32
Tab. 2: Parameter und Punktwerte des ASSS zur Einschätzung des individuellen Verhaltens nach Stressende.....	33

IV. Abkürzungsverzeichnis

AAS	Allgemeines Adaptationssyndrom
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
Aqua dest.	Aqua destillata
CD	Cluster of Differentiation
CRH	Corticotropin Releasing-Hormon
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4
EDTA	Ethylendiamintetracetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FCS	fetal calf serum, Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GR	Glukokortikoidrezeptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPA-Achse	engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis; Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HVL	Hypophysenvorderlappen
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharide
MLN	Mesenteriale Lymphknoten
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
1-MT	1-Methyltryptophan
Na-Citrat	Natriumcitrat
NK-Zellen	natürlichen Killerzellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PNI	Psychoneuroimmunologie
rpm	rounds per minute; Umdrehung pro Minute
sPLA2	ekretorische nichtpankreatische Phospholipase A2
Tc-Zellen	zytotoxische T-Zellen
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TGF- β	Transforming growth factor beta
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End labeling

1. Einleitung

1.1. Stressdefinition

Es wird immer deutlicher, dass sich neben schweren Belastungssituationen, wie z. B. langen unsicheren Lebensphasen mit andauernden Sorgen und Ängsten, auch viele kleinere Belastungen des Alltages anhäufen und eine bedeutende Wirkung auf unser Wohlbefinden oder das Entstehen von Krankheiten und psychischen Störungen haben, wenn keine geeigneten Möglichkeiten zur Veränderung oder ein guter Bewältigungsmechanismus gefunden werden. Ursachen für Stress sind dabei verschiedenste innere Reize (z. B. Ängste, Entscheidungskonflikte, Leistungsüberforderung) und äußere Reize (z. B. Lärm, Isolation, Zeitdruck, Infektionen), die als Stressoren bezeichnet werden. Die Stressoren führen zu Veränderungen der Homöostase des Organismus und lösen eine Stressreaktion aus, die es dem Individuum ermöglichen soll, sich an die neuen Umweltbedingungen anzupassen und zu überleben. Diesen Anpassungsprozess bezeichnet man als Allostase^{1,2}.

Der Mediziner und Biochemiker Hans Selye setzte sich als einer der ersten Wissenschaftler in zahlreichen Experimenten mit Stress auseinander und beschrieb diese Gegenregulation als eine unspezifische Antwort, die er als „Allgemeines Adaptationssyndrom“ (AAS) bezeichnete³⁻⁵. Dieses läuft unabhängig von der Art des Reizes weitgehend stereotyp ab und beginnt mit einer Alarmphase, auf die eine Widerstandsphase und – bei nicht ausreichenden Bewältigungsmöglichkeiten - zuletzt eine Erschöpfungsphase folgen.

Selye unterschied zwischen Reaktionen des AAS, die bei mehrmaligem Auftreten von Stressoren den Organismus stärkten und den Reaktionen des AAS, die bei dauerhaftem Auftreten eine Schwächung des Organismus bewirken bzw. zu Krankheit oder Tod führen können³⁻⁵. Es ist zu erwähnen, dass es Tiere in Selyes Experimenten gab, die unter anhaltendem Stress gesund blieben, während andere erkrankten⁶.

Die Auswirkungen von Stress auf einen Organismus werden somit nicht nur von der Dauer und Stärke der Stressoren bestimmt, sondern sie sind außerdem

abhängig von der Reaktionsfähigkeit des Individuums. Diese ist wiederum abhängig von genetischen und konstitutionellen Faktoren (z. B. Alter, Gesundheitszustand) sowie von der psychischen Verfassung des Individuums, das heißt, davon wie die Stressoren wahrgenommen und verarbeitet werden (Transaktionales Stressmodell nach Lazarus und Folkman) ⁷.

Die Wechselwirkungen zwischen dem autonomen Nervensystem, dem Hormonsystem und dem Immunsystem spielen zusammen mit der Wahrnehmung, dem Erleben und dem Verarbeiten von Stressoren eine entscheidende Rolle bei der Stressreaktion, die in der Psychoneuroimmunologie (PNI) näher erforscht wird.

Akuter Stress ist im Allgemeinen physiologisch, da er den Organismus kurzfristig aktiviert, für eine rasche Energiebereitstellung sorgt und die Leistung des Immunsystems steigert ⁸, um die Reaktions- und Widerstandsfähigkeit und letztendlich das Überleben des Individuums zu sichern. Wichtig ist, dass es dem Organismus anschließend ermöglicht wird, sich zu erholen ⁹.

Chronischer Stress, das heißt, andauernde oder wiederholte Belastungen, die nicht ausreichend Zeit zur Regeneration zulassen, kann dagegen zur Schwächung des Individuums und zur Entstehung von Krankheiten beitragen. So führen z. B. wiederholte stressbedingte Blutdruckanstiege zur Bildung von Arteriosklerose und erhöhen das Herzinfarkttrisiko ¹⁰⁻¹². Auch eine Beeinträchtigung immunologischer und kognitiver Funktionen konnten nach chronischen Stresssituationen beobachtet werden. So fanden Glaser et al. bei Examenskandidaten, die sich durch eine Prüfung stark gestresst fühlten, unter anderem eine signifikante Verminderung des prozentualen Anteils der T-Lymphozyten, eine reduzierte Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie eine verringerte induzierbare Interferon-Gamma-Produktion aus Lymphozyten ¹³. Zudem kam es bei diesen Studenten zu einer erhöhten Reaktivierung latenter Herpes-Viren ¹³. In anderen Arbeiten konnten eine Störung der Wundheilung ¹⁴ oder Änderungen der Gedächtnisleistungen infolge einer Verminderung des Hippokampusvolumens bei Tieren ¹⁵ und auch bei Menschen ¹⁶ nach Stresssituationen nachgewiesen werden.

Auch im klinischen Alltag wird versucht den Patienten einen möglichst stressarmen stationären Aufenthalt zu schaffen, um z. B. perioperative Komplikationen zu verhindern und eine schnelle Erholung/Genesung zu unterstützen ¹⁷⁻¹⁹.

Da anhaltende Stressoren eine erhöhte Morbidität und Mortalität bedingen können, ist es wichtig herauszufinden, über welche Mechanismen Stress die Körperhomöostase stört und wie man dies möglicherweise verhindern kann.

1.2. Biologische Konsequenzen von Stress

1.2.1. Neuroendokrine Veränderungen

Eine bedeutende Rolle bei der Stressreaktion des Körpers spielen die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA-Achse) und das autonome Nervensystem, weshalb beide Systeme im folgenden Abschnitt näher erläutert werden sollen.

Das autonome Nervensystem setzt sich vor allem aus dem Sympathikus und dem Parasympathikus zusammen. Das sympathische Nervensystem ist gerade bei der akuten Stressreaktion von großer Bedeutung, denn seine Aktivierung führt innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten zu einer Erhöhung der Leistungsbereitschaft. Der Organismus wird auf eine Kampf- oder Fluchtreaktion bzw. auf eine andere Belastungssituation vorbereitet. Es kommt zu einer Steigerung der Herz- und Atemtätigkeit, zu einer Erhöhung des Muskeltonus sowie zu einer Stoffwechselaktivierung im Sinne einer Energiebereitstellung (z. B. Glykolyse) ²⁰. Sympathische Nervenfasern befinden sich vor allem im thorakolumbalen Anteil des Rückenmarkes. Hier können sie durch Zentren im Hypothalamus und im Hirnstamm beeinflusst werden ²¹. Eine Besonderheit stellt das Nebennierenmark dar. Bei diesem größten sympathischen Paraganglion ist das zweite Neuron eine neuroendokrine Zelle, die bei Stimulation Adrenalin produziert und dieses ins Blut freisetzt. Am Zielgewebe erfolgt die Informationsübertragung schließlich über die Bindung der Transmitter Noradrenalin und Adrenalin an verschiedene Adrenorezeptoren, die in zwei α -Adrenorezeptoren (α_1 - und α_2 -AR) und drei β -Adrenorezeptoren

(β 1-, β 2-, β 3-AR) unterteilt werden ²²⁻²⁴. Da sowohl primär als auch sekundär lymphatische Organe sympathisch innerviert werden, besteht ein enger Kontakt zwischen dem Immunsystem und dem Sympathikus ^{22, 25, 26}.

Eine afferente Aktivierung des Sympathikus kann durch den Locus coeruleus, der seinerseits durch Nervenfasern des Nucleus tractus solitarii stimuliert wird, über Noradrenalin erfolgen. Durch Wiederaufnahme oder Abbau der Transmitterstoffe kann die kurzfristige Aktivierung relativ schnell beendet und die Homöostase wiederhergestellt werden.

Anteile des parasympathischen Nervensystems ziehen ausgehend vom sakralen Rückenmark sowie den Hirnnervenkernen und hier vor allem im Nervus vagus zu den Zielgeweben. Seine zum Sympathikus antagonistische Wirkung wird über den Transmitter Acetylcholin vermittelt. Dieses bindet an den Acetylcholinrezeptor (v. a. α 7-Subtyp) und führt zu einer Senkung der Herz- und Atemtätigkeit sowie zu einer Verminderung der Durchblutung der Skelettmuskulatur. Im Magen-Darm-Trakt wird dagegen die Durchblutung erhöht und die Verdauung wird angeregt. Die Immunantwort wird durch den Parasympathikus gehemmt (antiinflammatorisch). Die Aktivierung efferenter vagaler Nervenfasern soll eine Entzündungsreaktion eingrenzen, um unter anderem Gewebeschäden zu vermeiden ²⁷. Eine afferente Aktivierung des Parasympathikus durch Reizung des Nervus vagus wurde experimentell mit Zytokinen und mikrobiellen Substanzen, wie Endotoxinen, nachgewiesen ²⁸⁻³⁰. Der Körper wird somit über Verletzungen und Infektionen informiert und kann Abwehrreaktionen wie z. B. Fieber initiieren ³¹.

Neben dem autonomen Nervensystem wird auch die HPA-Achse durch Stress aktiviert. Beginnend auf der Ebene des Hypothalamus sezernieren die parvozellulären Anteile des Nucleus paraventricularis das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) sowie Vasopressin (antidiuretisches Hormon=ADH). Über den portalen Blutkreislauf der Hypophyse gelangen CRH und ADH zu den adrenokortikotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) und führen dort zu einer Ausschüttung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH). Mit dem peripheren Blut gelangt das ACTH zur Nebennierenrinde, wo es die Freisetzung von Glukokortikoiden (Kortisol beim Menschen und Kortikosteron bei Nagetieren) bewirkt. Die Ausschüttung der Glukokortikoide erfolgt pulsatil und

unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. An den Zielzellen wirken die Glukokortikoide über einen zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor (GR), der die Transkription verschiedener Gene reguliert. Sie beeinflussen somit sowohl physiologische als auch pathophysiologische Stoffwechselprozesse. Über einen negativen Feedback-Mechanismus an Hypothalamus und Hypophyse nehmen die zirkulierenden Glukokortikoide an der Regulation ihrer eigenen Produktion und Freisetzung teil.

In akuten Stresssituationen erfolgt eine kurzzeitige Aktivierung der HPA-Achse, die eine stimulierende Wirkung auf die Immunfunktion hat ^{2, 8}. In chronischen Stresssituationen erfolgt die Freisetzung von Glukokortikoiden jedoch in einer beinahe doppelten Frequenz ^{32, 33}. Die dadurch entstehende, länger andauernde Erhöhung der Glukokortikoidspiegel kann zu systemischen Dysregulationen führen.

Durch die modulierenden Eigenschaften der Glukokortikoide auf den Fett- und Glukosestoffwechsel kann eine vermehrte Kortisolausschüttung die Entwicklung einer viszeralen Adipositas bedingen ^{34, 35}. Die anabolen Wirkungen der Sexual- und Wachstumshormone auf das Muskel- und Knochengewebe werden durch Glukokortikoide aufgehoben ³⁵. Die Entstehung einer Osteoporose wird dadurch begünstigt ³⁵. Im chronischen Stressmodell unserer Arbeitsgruppe entwickelten weibliche BALB/c-Mäuse ein hypermetaboles Syndrom ³⁶. Dieses war unter anderem durch einen Gewichtsverlust, Hyperglykämie, Dyslipidämie und eine Azidose gekennzeichnet. Einhergehend mit diesen Stoffwechseleränderungen konnten ein Hyperkortisolismus, eine Hyperleptinämie, eine Insulinresistenz sowie eine Hypothyreose bei den gestressten Tieren nachgewiesen werden ³⁶.

Das nach einer HPA-Achsenaktivierung freigesetzte CRH übt eine stimulierende Wirkung auf den Sympathikus aus und stellt eine direkte Verknüpfung zwischen den Hauptanteilen des neuroendokrinen Systems dar.

Eine chronische Stimulation der HPA-Achse und des Sympathikus kann zu Depression und Übererregbarkeit führen ^{37, 38}. So konnte z. B. bei einigen Patienten mit Depressionen ein Hyperkortisolismus festgestellt werden ³⁹. In anderen Untersuchungen konnten die depressiven Symptome mithilfe einer pharmakologischen Blockade der Glukokortikoidrezeptoraktivität vermindert

werden ⁴⁰. Welche Wirkungen die stressbedingten Veränderungen des neuroendokrinen Systems auf das Immunsystem haben, soll im folgenden Abschnitt besprochen werden.

1.2.2. Stress und das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor dem Eindringen körperfremder Antigene, wie z. B. Viren, Bakterien oder deren Bestandteile, bzw. versucht den Körper davon wieder zu befreien. Dadurch soll der Erhalt der Homöostase aller lebensnotwendigen Stoffwechselprozesse gesichert werden. Das Immunsystem setzt sich aus zwei größeren Teilen zusammen – dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Ersteres generiert bei Kontakt mit körperfremden Antigenen eine unspezifische Immunantwort, an der unter anderem Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), eosinophile und basophile Granulozyten sowie das Komplementsystem beteiligt sind. Durch das erworbene Immunsystem, zu dem hauptsächlich B- und T-Lymphozyten zählen, kann dagegen eine antigenspezifische Immunantwort erfolgen. Werden B-Lymphozyten aktiviert, differenzieren sie sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. T-Lymphozyten reifen im Thymus und werden in T-Helferzellen (TH-Zellen) und zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen) unterteilt ⁴¹. Die Tc-Zellen können körperfremde Zellen sowie körpereigene infizierte Zellen direkt abtöten. TH-Zellen bewirken durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder durch eine Ausschüttung von Mediatoren eine Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und anderen Lymphozyten. Die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen führt zur Aktivierung der TH-Zellen. Anschließend kommt es in Abhängigkeit der Zytokine, denen sie ausgesetzt sind, zu einer Differenzierung in TH1- und TH2-Zellen. Durch Interleukin 12 (IL-12) und Interferon γ (IFN- γ) differenzieren sich TH1-Zellen, die eine proinflammatorische, zelluläre Immunantwort stimulieren. Dagegen induziert die Anwesenheit von IL-4 die Entwicklung von TH2-Zellen, welche zu einer verstärkten humoralen Immunantwort führen. Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) entstehen in einem Milieu, indem v. a. die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β (transforming growth factor) vorherrschen und unterdrücken die Immunantwort. Mit Hilfe von Gedächtniszellen wird bei

erneutem Antigenkontakt eine schnellere und effektivere Immunantwort ausgelöst.

Gelingt es dem Organismus nicht, die fremden Antigene erfolgreich abzuwehren, drohen Infektionen und andere Erkrankungen. Eine Fehlregulation der Immunantwort kann jedoch auch zu Überempfindlichkeitsreaktionen wie Allergien oder sogar zu Autoimmunerkrankungen und deren Verstärkung führen^{42, 43}.

Die Koordination der antigenspezifischen Abwehr ist für das Überleben jedes Individuums essentiell. Direkte Zell-Zell-Interaktionen und die Freisetzung von Signalstoffen wie Transmittern und Zytokinen vermitteln die Signale, die zu einer Stressantwort führen. Gehirn, Neuroendokrinium und Immunsystem kommunizieren via sympathischen und parasymphatischen Nervenfasern²⁷, durch Hormone wie CRH, ACTH, Endorphine, durch Neuropeptide und andere Signalstoffe⁴⁴. Veränderungen innerhalb des neuroendokrinen Systems, die z. B. durch akute oder chronische Stressoren hervorgerufen werden, beeinflussen somit auch stets das Immunsystem^{45, 46}.

In einer der ersten Untersuchungen konnte 1919 gezeigt werden, dass die Abwehr von Pathogenen bei Personen mit Lungentuberkulose in Stresssituationen vermindert war⁴⁷. Solomon und Mitarbeiter berichteten einige Jahre später über einen möglichen Einfluss von Emotionen auf den Krankheitsverlauf bei Patienten mit rheumatoider Arthritis⁴⁸.

Immunkompetente Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten werden über verschiedene Rezeptoren durch die Stresshormone in ihrer Funktion bzw. ihrer Aktivität beeinflusst^{49, 50}.

Glukokortikoide, die im akuten Stress freigesetzt werden, verursachen z. B. eine reversible Umverteilung der Leukozyten aus dem peripheren Blut in andere Gewebe wie Lymphknoten, Knochenmark, Haut und Schleimhaut⁵¹. Auch eine Zunahme der intestinalen Lymphozyten nach Noradrenalingabe wurde beobachtet⁵². Dadurch soll die lokale Immunabwehr an primären Eintrittspforten aufrechterhalten werden^{2, 53, 54}. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten wird dagegen durch Glukokortikoide und Katecholamine im Blut erhöht^{53, 55}.

In physiologischen Konzentrationen besitzen Glukokortikoide protektive antiinflammatorische Effekte bei der Modulation von lokalen Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen⁵⁶. In höheren Konzentrationen, die unter anderem durch chronischen Stress verursacht werden, können Katecholamine und Glukokortikoide eine Veränderung der Immunantwort von einer zellvermittelten TH1-dominanten Immunantwort hin zu einer TH2-dominanten Immunantwort mit einer verstärkten Antikörperproduktion bewirken^{57, 58}. Marshall und Kollegen konnten diese Ergebnisse durch Untersuchungen von Medizinstudenten unterstützen. Durch Prüfungsstress entwickelte sich bei diesen Studenten ebenfalls ein Zytokinungleichgewicht mit einer verstärkten Produktion von TH2-Zytokinen wie IL-10⁵⁹. Die Folgen einer solchen Immundysregulation können z. B. eine verminderte Antikörperbildung nach Impfungen^{60, 61} oder eine beeinträchtigte Kontrolle latenter Viren und deren Reaktivierung sein^{62, 63}.

Auch im chronischen Stressmodell unserer Arbeitsgruppe zeigten weibliche BALB/c-Mäuse eine reduzierte antibakterielle Immunantwort, gekennzeichnet durch eine verminderte T-Zellproliferation, eine reduzierte Phagozytosekapazität und einen verminderten „oxidative burst“⁴⁶. Zusätzlich wurde als Zeichen einer Zytokindysbalance eine verminderte *ex vivo* Induzierbarkeit der proinflammatorischen Zytokine nachgewiesen⁴⁶. Als Folge konnte bei den chronisch gestressten Tieren eine erhöhte bakterielle Last in Leber und Lunge festgestellt, die mit der Entwicklung einer spontanen milden Pneumonie assoziiert war⁶⁴.

1.2.3. Bakterielle Translokation

Die kommensale mikrobielle Flora eines jeden Organismus ist normalerweise auf die Haut- und Schleimhautoberflächen begrenzt.

Durch Stressoren verschiedenster Art, wie z. B. Verbrennungen, Operationen, hämorrhagischen Schock⁶⁵, kann es jedoch zu einem Übertritt von kommensalen Bakterien aus dem Magen-Darm-Trakt in den Körper kommen. Dieser Prozess wird als bakterielle Translokation bezeichnet.

Verschiedene Tiermodelle haben gezeigt, dass emotionale Stressoren, wie Immobilisationstress^{66, 67} und „social disruption stress“⁶⁶, die Translokation von Bakterien unter anderem ins Peritoneum⁶⁸, in die inguinalen und mesenterialen Lymphknoten⁶⁵⁻⁶⁷ sowie ins Blut⁶⁷, in die Leber und Lunge⁶⁴ begünstigt. Damit einhergehend kann es zu einer Infektion von parenchymatösen Organen, wie Leber, Milz, Nieren kommen⁶⁷. In Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass chronischer psychischer Stress bei weiblichen BALB/c-Mäusen infolge einer verminderten antibakteriellen Abwehr die Entstehung einer spontanen milden Pneumonie verursacht⁶⁴. Desweiteren wurde eine erhöhte bakterielle Last in Leber, peripherem Blut und peritonealer Flüssigkeit von chronisch gestressten BALB/c-Mäusen nach experimenteller Infektion nachgewiesen⁴⁶.

Ein Grund für den erleichterten Übertritt von Bakterien im Stress ist eine gestörte Funktion der Darmbarriere. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch akuten und chronischen Stress eine Permeabilitätserhöhung im Darm verursacht wird⁶⁹⁻⁷¹.

Die Darmschleimhaut besteht aus drei Anteilen: der *Lamina epithelialis*, der *Lamina propria* und der *Lamina muscularis mucosae*. In der mittleren Schicht, der *Lamina propria*, befinden sich Blut- und Lymphgefäße, Nervenendigungen und verschiedene immunkompetente Zellen wie z. B. Lymphozyten, Mastzellen, Makrophagen oder dendritische Zellen⁷². Botenstoffe ausgehend von Nervenfasern und Immunzellen können die Epithelzellen über Rezeptoren beeinflussen.

Die Bedeutung von Mastzellen bei stressbedingten Veränderungen der Darmbarriere wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht^{69, 73, 74}. Eine Aktivierung von Mastzellen im Darm ist sowohl durch cholinerge Neurone als auch durch die Substanz P aus peptidergen Neuronen möglich^{75, 76}. Als Folge der Mastzellaktivierung kommt es zu deren Degranulation und damit zur Freisetzung von Tumornekrosefaktor (TNF), Histamin⁷⁷ und anderen Mediatorstoffen, die eine Epithelschädigung bedingen können. Lokal erhöhte TNF-Konzentrationen sind proapoptotisch für intestinale Epithelzellen⁷⁸. Daneben wirkt sich auch die stressbedingte Aktivierung der HPA-Achse auf die Funktion der Darmbarriere aus, denn Glukokortikoide erhöhen die

Darmpermeabilität direkt und können ebenfalls proapoptotisch auf intestinale Epithelzellen und immunkompetente Zellen im Magen-Darm-Trakt wirken ^{70, 79}.

Ein weiterer Mediator der intestinalen Stressantwort ist das CRH. Auch bei dessen Freisetzung kann es durch komplexe Wechselwirkungen mit adrenergen, nikotineren, muskarineren Rezeptoren, Mastzellen zu einer Erhöhung der Kolonschleimhautpermeabilität kommen ⁸⁰.

In Experimenten mit Wistar-Kyoto-Ratten wurde eine stressvermittelte verstärkte para- und transzelluläre Darmpermeabilität unter anderem infolge einer Aktivierung cholinergischer Neurone nachgewiesen ^{81, 82}. Neben einem verstärkten Übertritt von Makromolekülen, wie z. B. Proteinantigenen, die eine proinflammatorische Immunantwort hervorrufen können, wurde ebenfalls eine Translokation kommensaler Bakterien oder deren Bestandteilen nachgewiesen ^{83, 84}. Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Sie verursachen schon in kleinsten Konzentrationen eine Aktivierung der unspezifischen Abwehr mit nachfolgender Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Gelingt es jedoch nicht, die Infektion lokal zu begrenzen, kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit möglicherweise schweren Folgen wie septischem Schock und Multiorganversagen ⁸⁵. Neben den immunstimulierenden Effekten können durch LPS auch eine Aktivierung der HPA-Achse sowie des Katecholamin- und Indolaminstoffwechsels verursacht werden ⁸⁶.

Vor allem im Bereich des follikelassoziierten Epithels der Peyer'schen Plaques wurde eine stressbedingte erhöhte transzelluläre Permeabilität für Makromoleküle und abgetötete *E.coli*-Bakterien durch Funktionänderung der M-Zellen nachgewiesen werden ⁷¹. Somit könnte dies der Bereich sein, in dem Bakterien, die normalerweise nicht-invasiv sind, nach Stressexposition translozieren ⁷¹.

Gelangen luminale Antigene auf dem transzellulären Weg in die Darmschleimhaut, kommt es zu einer verstärkten Antigenpräsentation mit nachfolgender T-Zellaktivierung, die wiederum zu einer Freisetzung von IFN- γ führt ⁸⁷. IFN- γ kann eine Fehlfunktion der Tight junctions verursachen, wodurch

die veränderte parazelluläre Durchlässigkeit der Darmbarriere erklärt werden kann⁸⁸.

Zu den stressbedingten Veränderungen, die sich in der Darmschleimhaut abspielen, kommt hinzu, dass auch die Bakterien in der Lage sind, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. So bewirken z. B. stressbedingte Änderungen des neuroendokrinen Systems, wie erhöhte Noradrenalin Spiegel, ein vermehrtes Wachstum oder die Ausbildung neuer Virulenzfaktoren, die eine Translokation erleichtern^{89,90}.

Eine stressinduzierte gestörte Darmbarriere und ein nachfolgend massiv erhöhter Transport luminaler Antigene gehen einher mit einer vermehrten Antigenpräsentation in den Peyer'schen Plaques. Die Aktivierung des Immunsystems kann dadurch lokale Entzündungsreaktionen oder sogar Entzündungen von größeren Darmabschnitten auslösen, wie sie unter anderem bei der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa diskutiert werden⁷⁰.

1.2.4. Tryptophanstoffwechsel

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, die für viele verschiedene Stoffwechselprozesse im Körper wichtig ist. Da Säugetiere selbst kein Tryptophan bilden können, muss es täglich mit der Nahrung zugeführt werden. Unter normalen Bedingungen wird das aufgenommene Tryptophan über drei Hauptstoffwechselwege verarbeitet⁹¹. Zum einen wird es für den Aufbau von Gewebeprotein genutzt, zum anderen ist Tryptophan der Ausgangsstoff der Tryptamin-, Serotonin- und Melatoninsynthese. Der Abbau der Aminosäure über den Kynureninstoffwechselweg bildet den dritten Anteil des Tryptophanumsatzes.

Säugetiere besitzen zwei intrazelluläre Häm-haltige Enzyme, die den oxidativen Tryptophanabbau katalysieren, die Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) und die Indolamin-2,3-dioxygenasen 1+2 (IDO1, 2)^{92,93}. Diese Enzyme katalysieren die entscheidende Reaktion im Tryptophanabbau über den

Kynureninstoffwechselweg, die oxidative Spaltung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin⁹⁴⁻⁹⁶.

Die TDO wird vorrangig in den Hepatozyten exprimiert und reguliert, als eine Art „house-keeping“-Gen, die Tryptophankonzentration im Plasma⁹⁷. In einigen Spezies konnte das Enzym zusätzlich in Gehirn- oder Nebenhodengewebe nachgewiesen werden^{98,99}. Ihre Aktivität kann durch das Stresshormon Kortisol induziert werden¹⁰⁰. So verursacht die Gabe von Kortisol bei Probanden eine Verminderung der Tryptophanspiegel im Plasma¹⁰¹. Durch Signale des Immunsystems wird die TDO, anders als die IDO1, jedoch nicht beeinflusst.

Im Gegensatz zur TDO ist die IDO1 ubiquitär, das heißt in allen Geweben, induzierbar. Man findet basale Enzymkonzentrationen z. B. im Thymus, im Darm, in der Lunge und in der Plazenta¹⁰². Bei Infektionen und Entzündungen kommt es zu einer vermehrten Expression von IDO1¹⁰². Die Induktion des Enzyms kann dabei unter anderem durch antigenpräsentierende Zellen, LPS, IFN- γ oder das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA-4) erfolgen^{29, 103-106}. Auch für IFN- γ und TNF α konnte ein synergistischer Effekt von bezüglich der IDO1-Induktion nachgewiesen werden¹⁰⁷.

Im Hinblick auf das Immunsystem hat der Tryptophanstoffwechsel sowohl eine unterstützende als auch eine immunsuppressive Funktion. Tryptophan wird z. B. zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen benötigt¹⁰⁸. Dadurch kann wiederum durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen eine Immunantwort zur Abwehr von Pathogenen ausgelöst werden. Ein antimikrobieller Effekt entsteht außerdem durch die IDO1-vermittelte Tryptophandegradation, durch die verschiedene Pathogene ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren¹⁰⁹. Eine Tryptophandepletion wirkt jedoch auch auf körpereigene T-Lymphozyten zytostatisch und antiproliferativ und vermindert somit eine zellvermittelte Immunantwort^{103, 110}. Die entlang des Kynureninstoffwechselweges entstehenden Metabolite besitzen immunregulatorische Eigenschaften. Sie können eine selektive Apoptose von Thymozyten und TH1-Zellen induzieren und die Bildung regulatorischer T-Lymphozyten stimulieren. Somit spielt der IDO1-vermittelte Tryptophanmetabolismus eine Rolle bei der Regulierung der T-Zellhomöostase.

Durch ein zu starkes Ungleichgewicht von TH1- und TH2-Lymphozyten kann jedoch auch eine Immunsuppression erzeugt werden ¹¹¹.

Änderungen im Tryptophanstoffwechsel wirken sich auch auf das Nervensystem aus. Die verschiedenen Tryptophanmetabolite üben unterschiedliche Effekte auf die Nervenzellen aus. Chinolinsäure ist ein Agonist der glutamatergen NMDA-Rezeptoren und vermittelt darüber neurotoxische Signale ¹¹²⁻¹¹⁴. Daneben kann durch Chinolinsäure eine mitochondriale Dysfunktion sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verursacht werden ¹¹⁵. Ein weiterer Metabolit des Kynureninstoffwechselweges, das 3-Hydroxykynurenin, begünstigt die Bildung freier Radikale, die ebenso zu einer Neuronenschädigung beitragen ^{114, 116, 117}. Als Antagonist von NMDA-Rezeptoren und α 7-nikotineren Rezeptoren moduliert die Kynureninsäure die cholinerge und glutamaterge Neurotransmission ¹¹⁸. Im zentralen Nervensystem besitzt dieser Tryptophanmetabolit neuroprotektive ^{114, 119} und antikonvulsive ¹²⁰ Eigenschaften. Wejksza und Arbeitsgruppe konnten auch in der Peripherie protektive Effekte nachweisen. So verminderte Kynureninsäure in vitro die zytotoxische Wirkung von Homocystein auf Endothelzellen und erhöhte die Zellmigration und -proliferation ¹²⁰. In Untersuchungen der experimentellen Colitis konnte eine signifikante Reduktion der Entzündungsaktivität und der Hypermotilität im Kolon über eine Blockade der NMDA-Rezeptoren durch Kynureninsäure erreicht werden, was mögliche neue therapeutische Optionen aufwerfen könnte ¹²¹.

Veränderte Konzentrationen der Metabolite des Kynureninstoffwechselweges können mit Störungen des Zentralnervensystems, wie z. B. hippocampaler Atrophie, einhergehen ¹¹⁴. Daneben kann es zu schweren psychotischen Störungen oder Depressionen kommen ^{122, 123}.

Auch im Stress kommt es zu einem IDO1-vermittelten Tryptophanabbau. Im akuten Stressmodell unserer Arbeitsgruppe konnte eine vermehrte IDO1-mRNA-Expression im Gehirn gestresster BALB/c-Mäuse nachgewiesen werden ⁹³. Im Verlauf des chronischen Stressmodells wurde bei den gestressten Mäusen ein depressionsähnliches Verhalten sowie eine Immunsuppression beobachtet ⁴⁶. Durch die Behandlung mit dem IDO1-Inhibitor 1-Methyltryptophan (1-MT) konnten schon in anderen Arbeitsgruppen IDO1-

vermittelte Effekte, wie eine eingeschränkte T-Zellproliferation, verhindert werden¹²⁴. Auch in unserem Stressmodell wurde das depressive Verhalten der chronisch gestressten BALB/c-Mäuse durch die 1-MT-Gabe reduziert und ihre antibakterielle Immunantwort wiederhergestellt⁹³.

1.3. Stammvergleiche (BALB/c vs. C57BL/6 vs. CBA)

Im chronischen Stressmodell unserer Arbeitsgruppe wurden als erstes BALB/c-Mäuse auf verschiedene Parameter des Immunsystems untersucht.

Da die Reaktionen auf einen Stressor, wie eingangs schon erwähnt, interindividuell verschieden sein können und da konstitutionelle sowie genetische Faktoren dabei eine wichtige Rolle spielen, wurden zum Vergleich weibliche CBA-Mäuse, die einen anderen genetischen Hintergrund besitzen, im chronischen Stressmodell untersucht.

Ein bereits bekannter Unterschied zwischen den Mausstämmen bestand in der Immunantwort, die bei BALB/c-Mäusen eher TH2-dominant ist¹²⁵⁻¹²⁸, während sich bei CBA-Mäusen weder eine TH1- noch eine TH2-Dominanz der Immunantwort nachweisen lässt¹²⁸.

Bezüglich der Stressanfälligkeit waren folgende stammspezifische Unterschiede im chronischen Stressmodell nachzuweisen.

Gestresste CBA-Mäuse entwickelten im Vergleich zu BALB/c-Mäusen kein depressionsähnliches Verhalten und verloren kein Gewicht. Die basalen Kortikosteronspiegel im Plasma waren bei CBA-Mäusen zwar niedriger als bei BALB/c-Mäusen, der stressbedingte Anstieg der Kortikosteronkonzentration war jedoch stärker bei den CBA-Mäusen. Außer einer peripheren Leuko- und Lymphozytopenie konnte weder ein T-Zellverlust durch vermehrte Apoptosen in Milz und Thymus noch eine reduzierte *ex vivo* Induzierbarkeit der proinflammatorischen Zytokine (TNF α , IFN- γ , IL-6) nachgewiesen werden. CBA-Mäuse zeichneten sich somit durch eine größere Stressresistenz im Vergleich zu BALB/c-Mäusen aus⁴⁶.

Auf der Suche nach einer Erklärung für die höhere Stressanfälligkeit von BALB/c-Mäusen wurde folgende Hypothese entwickelt: Die bei chronisch gestressten BALB/c-Mäusen entstehende Immunsuppression wird auf eine stressbedingte Darmbarrierestörung mit bakterieller Translokation und der Aktivierung des Enzyms IDO1 zurückgeführt, was bereits nach akutem Stress nachgewiesen wurde⁹³.

Eine veränderte Darmschleimhaut konnte in BALB/c-Mäusen bereits nach einer einzelnen Stresssitzung festgestellt werden¹²⁹. Ob diese Darmbarrierestörung ein mausstammspezifisches Phänomen darstellt, sollte durch Untersuchungen eines zweiten Mausstammes im akuten Stressmodell überprüft werden.

Unglücklicherweise konnten diese Untersuchungen nicht mit CBA-Mäusen durchgeführt werden, da dieser Mausstamm kommerziell für uns nicht mehr verfügbar war und die eigene Zucht die benötigte Tierzahl nicht garantieren konnte. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit Mäuse des Stammes C57BL/6 in beiden Stressmodellen untersucht werden.

C57BL/6-Mäuse sind der am meisten verwendete Mausstamm. Die Immunantwort der C57BL/6-Mäuse ist im Gegensatz zu der der BALB/c-Mäuse TH1-dominant¹²⁵⁻¹²⁸. In verhaltensbiologischen Untersuchungen zeigten sich im „open-field“-Test sowie beim „forced-swimming“-Test¹³⁰ deutliche Unterschiede zwischen BALB/c-Mäusen und C57BL/6-Mäusen. Letztere zeichneten sich durch eine hohe Lokomotoraktivität aus^{130, 131}. Trotz dieser hohen Aktivität kommt es bei C57BL/6-Mäusen zu einer Insulinresistenz und Glukoseintoleranz³⁴. Unter fettreicher Diät entwickeln diese Mäuse eine Adipositas, einen Diabetes mellitus Typ 2 sowie atheromatöse Läsionen in der Aortenwand¹³². Bei BALB/c-Mäusen ist dagegen eine Atheroskleroseresistenz beschrieben¹³³. Die basalen Kortikosteronspiegel beider Mausstämme unterscheiden sich nicht signifikant³⁴. Allerdings könnte die hohe Kortikosteronsensitivität der C57BL/6-Mäuse deren Anfälligkeit für metabolische Störungen erklären³⁴.

Im Hinblick auf den Darm konnte eine unterschiedliche Aktivität der sekretorischen nichtpankreatischen Phospholipase A2 (sPLA2) im Dünndarm der Mäuse nachgewiesen werden. Bei einigen Inzuchtstämmen, wie z. B. bei C57BL/6-Mäusen, liegt eine Mutation im sPLA2-Gen vor, sodass kein aktives

Enzym produziert werden kann ¹³⁴. BALB/c-Mäuse dagegen besitzen den normalen Genotyp (Wildtyp) und somit wurde eine deutlich höhere Aktivität der sPLA2 im Dünndarm von BALB/c-Mäusen verglichen mit C57BL/6-Mäusen nachgewiesen ¹³⁴.

1.4. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist zu überprüfen, ob C57BL/6-Mäuse mit bekannter TH1-dominanter Immunantwort eine andere oder eine vergleichbare Stressantwort wie BALB/c-Mäuse zeigen. Die Untersuchungen in beiden Mausstämmen konzentrieren sich auf die Veränderungen des Immunsystems (Lymphozytenverteilung, Apoptosemessung in der Milz), des Verhaltens (Score-Systeme), der Darmbarrierefunktion und des Tryptophankatabolismus.

2. Material

2.1. Antikörper und Chemikalien

Antikörper:

Alle monoklonalen Antikörper wurden von BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, Deutschland bezogen.

zur Analyse im FACS:

- Ratte-anti-Maus CD3-FITC
- Ratte-anti-Maus CD19-PE

monoklonale Antikörper zur Isotypkontrolle:

- Ratte-IgG1-PE
- Ratte-IgG2b, κ -FITC

Chemikalien:

- AnnexinV-Biotin-X Deutschland	BD Biosc. Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- AnnexinV-FITC Deutschland	BD Biosc. Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- Ethanol; 99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- FACSFlow buffer	BD Bioscience, Verviers, Belgien
- Fötale Kälberserum (FCS)	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland
- PBS-DULBECCO 1x	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland
- Physiolog. Kochsalzlösung (10 ml)	Braun, Mannheim, Deutschland
- Streptavidin-PerCP Deutschland	BD Biosc. Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- TissueTek® Einbettungsmedium	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland

2.2. Puffer und Lösungen

Waschpuffer für FACS-Färbung:

- | | |
|------------|----------------------------------|
| - FACSFlow | BD Bioscience, Verviers, Belgien |
| - 1 % FCS | BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland |

2.3. Verbrauchsmaterialien

Biopur Reaktionsgefäße Safelock, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryomold®-Einbettungschalen	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
EDTA-Vacutainer, K2E	BD™-vacutainer, Plymoth, UK
Einmalhandschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Einmalspitzen (10 µl, 200 µl, 100 µl, 2,5 ml)	Greiner Bio-one, Deutschland
Einmalspritzen (2 ml, 10 ml, 20 ml)	BD™-Discardit, Fraga, Spanien
Eppendorf-Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml	BD, San Diego, USA
Filter 0,2 µm, Minisart®, steril	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Mikro-Hämatokritröhrchen	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatte, 96-Vertiefung	Greiner-bioone, Solingen, Deutschland
Tierfutter, ssniff R-Z	ssniff Spezialitäten GmbH, Deutschland
Tuberkulinspritzen 1ml	BD, NJ, USA
Zellkulturröhrchen, steril, 5 ml; Polysterol	Greiner Bio-one, Solingen Deutschland
Zellsieb, 100 µm Porengröße, steril	BD Falcon™, NJ, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon™, NJ, USA

2.4. Geräte

Brutschank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ELISA-Reader (Tecan)	SLT- Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
FACS (fluorescence activated cell sorter)	BD, FACScan, San Diego, USA
Hämocounter Sysmex K-4500	SYSMEX GmbH, Deutschland
Orbitalschüttler, Shaker S-3.08M Skyline	Bartels Instruments, Heidelberg, Deutschland
Tandem Massenspektrometer (Refurb Wallac MS2)	
Ultraschallsender	SiXiS, Pat.No.109977, Taiwan
Ultraschallwasserbad	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraturrax	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Zentrifuge 5415 C	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.5. Kits

OCTEIA Kortikosteroone ELISA IDS, Boldon, UK

2.6. Versuchstiere

BALB/c-Mäuse, weiblich eigene Zucht, Universität Greifswald, oder
von Charles River Laboratories, Sulzfeld,
Deutschland

C57BL/6-Mäuse, weiblich Charles River Laboratories, Sulzfeld,
Deutschland

2.7. Kulturmedium für bakterielle Anzucht

Columbia Agar mit 5% Schafsblut BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Thioglycolat-Bouillion Oxoid, Wesel, Deutschland

2.8. Kulturmedium für murine Zellen

VLE RPMI 1640 Medium 1x (500 ml) BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland

Zusatz von:

2-Mercaptoethanol 50 mM	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Gentamycin 10 mg/ml	PAN™ BIOTECH GmbH,
Penicillin 10.000 U	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Streptomycin 10 mg/ml	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Na-Pyruvat 100 mM	PAN™ BIOTECH GmbH
Glutamin 200 mM	PAN™ BIOTECH GmbH
D-(+)-Glucose 45%; (1:125)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FCS (10%)	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland

2.9. Narkose

Ketamin Curamed® 500 mg CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe,
Deutschland

Rompun®, Xylazinhydrochlorid Bayer Vital GmbH, Leverkusen,
Deutschland

Physiolog. Kochsalzlösung (10 ml)

Braun, Mannheim, Deutschland

2.10. Computerprogramme

Excel 2000

Deutschland

GraphPad Prism 4.02

Powerpoint 2000

Deutschland

easyWin basic V 6.0a

WinMDI 2.8

Microsoft Co., Unterschleißheim,

GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Microsoft Co., Unterschleißheim,

Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland

frei im Internet erhältlich

(<http://facs.scripps.edu/software.html>)

3. Methoden

3.1. Stressmodell

3.1.1. Versuchstiere und Versuchsbedingungen

Für alle Versuche wurden weibliche BALB/c- und C57BL/6-Mäuse im Alter von 10 bis 14 Wochen verwendet. Die Tiere wurden mindestens zwei Wochen bei akuten Stressexperimenten bzw. bei Durchführung des chronischen Stress Modells vier Wochen vor Versuchsbeginn in Gruppen (6 Tiere/Käfig) aufgeteilt und zur Vermeidung von zusätzlichem Stress in einem Tierisolator gehalten. Dort herrschten ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus (Licht: 6 bis 18 Uhr), gleich bleibende Temperatur (21-23 °C) und Luftfeuchtigkeit. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Reinigung der Käfige erfolgte zweimal wöchentlich durch dieselbe Person.

3.1.2. Akutes und chronisches Stressmodell

Als Modell für psychischen Stress wurde eine Kombination aus akustischem und Immobilisationsstress eingesetzt ¹³⁵.

Akustischer Stress wurde mittels Ultraschall erzeugt. Der Ultraschallsender emittierte zufallsverteilte irreguläre Schwingungen mit einer Amplitudenmodulation zwischen 15 und 25 kHz und einem randomisierten Schalldruckpegel zwischen 0 bis 35 dB über dem Hintergrundschallpegel im Raum mit etwa 50 dB. Die Tiere wurden zur Immobilisation ohne Anwendung von Gewalt in konische 50 ml Zentrifugenröhrchen gesetzt, deren Belüftung durch mehrere Löcher im Konusbereich gewährleistet war. Verletzungen des Schwanzes beim Verschließen der Röhre wurden durch ein zusätzliches Loch in dem Deckel vermieden. Die Zentrifugenröhrchen mit den darin befindlichen Tieren wurden anschließend waagrecht in eine Haltevorrichtung aus Styropor platziert, die 30 cm von der Schallquelle entfernt war. Während der Immobilisation wurde die Versuchsanordnung abgedeckt.

Die Erzeugung von chronischem Stress erfolgte in neun Stresssitzungen innerhalb von fünf Tagen. Die Tiere wurden an den ersten vier aufeinanderfolgenden Tagen zweimal täglich für zwei Stunden (8 bis 10 Uhr und 16 bis 18 Uhr) den kombinierten Stressoren ausgesetzt. Am fünften Tag wurde lediglich eine Stresssitzung am Morgen (8 bis 10 Uhr) durchgeführt (Abb. 1). Zwischen den Stresssitzungen sowie nach Beendigung der letzten Stressexposition wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt, die sich außerhalb des Tierisolators befanden. Somit wurde ein Kontakt zu den ungestressten Kontrolltieren über Gerüche oder Geräusche vermieden. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde dabei ebenso wie die restlichen Rahmenbedingungen gewährleistet.

Akuter Stress wurde durch eine einzelne Stressexposition (8 bis 10 Uhr) erzeugt (Abb. 2). Die Kontrolltiere befanden sich bis zur Injektion des Narkosemittels im Isolator.

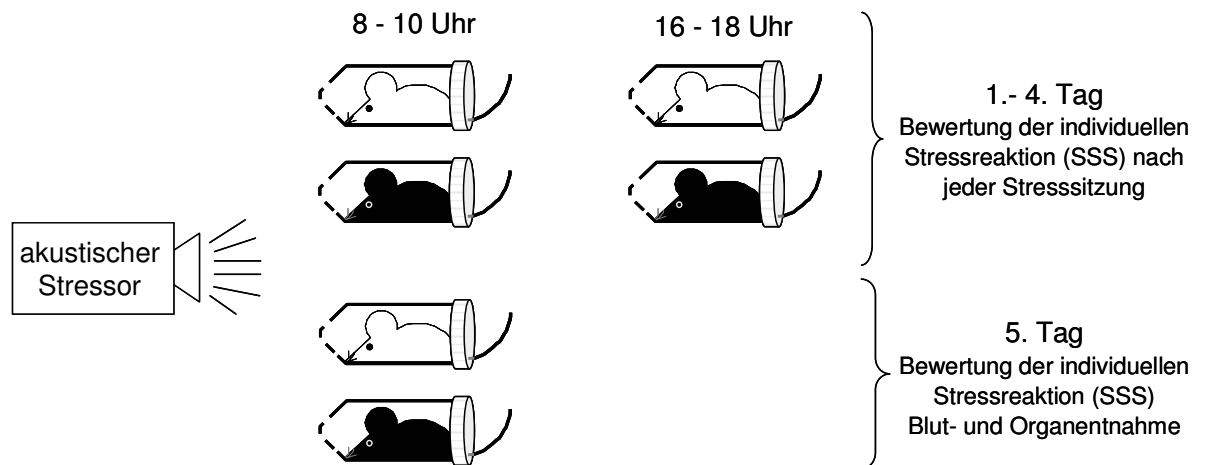


Abb. 1: Chronisches Stressmodell. Weibliche BALB/c- und C57BL/6-Mäuse im Alter von 10-14 Wochen wurden in neun aufeinanderfolgenden Stresssitzungen für je zwei Stunden in belüfteten Zentrifugenröhrchen immobilisiert und vor einem Ultraschallsender platziert. Im Anschluss an jede Stresssitzung wurde das individuelle Verhalten mit Hilfe des Stress Severity Scores (SSS) bewertet. Die Blut- und Organentnahme erfolgte direkt nach der neunten Stresssitzung.

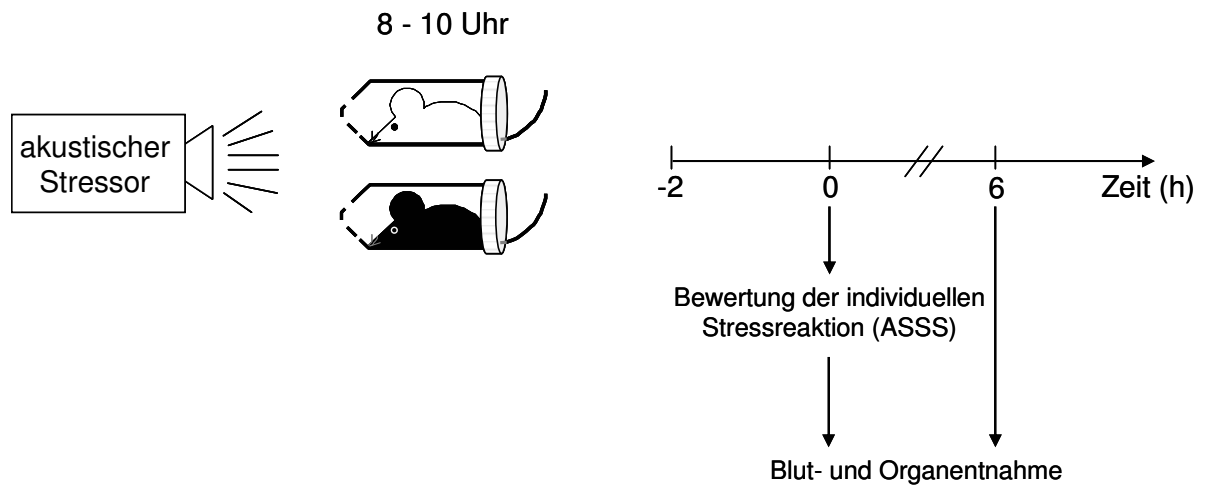


Abb. 2: Akutes Stressmodell. Weibliche BALB/c- und C57BL/6-Mäuse im Alter von 10-14 Wochen wurden für zwei Stunden (8-10 Uhr) in belüfteten Zentrifugenröhrchen immobilisiert und vor einen Ultraschallsender platziert. Direkt danach erfolgte die Beurteilung des individuellen Verhaltens mit Hilfe des Acute Stress Severity Scores (ASSS). Die Blut- und Organentnahme erfolgte entweder im Anschluss an die Verhaltensbewertung oder sechs Stunden später.

3.2. Bestimmung der individuellen Reaktion auf psychischen Stress

3.2.1. Stress Severity Score (SSS)

Die Bewertung der individuellen Reaktion der Tiere auf eine chronische Stressexposition wurde mit Hilfe des Stress Severity Scores (SSS) durchgeführt. Dieses von Frau Dr. C. Kiank entwickelte Scoring-System ist ein standardisiertes Protokoll, das fünf Parameter beinhaltet. Die Abgabe von Kot und Urin im Röhrchen wurde direkt nach jeder Stresssitzung mit 0 bis 6 Punkten bewertet. Litten Tiere an Diarrhoe, wurde der Punktwert für die Kotabgabe verdoppelt. Die Beschaffenheit des Fells (Verschmutzung, Struppigkeit) sowie der Grad des depressionsähnlichen Verhaltens (reduziertes Erkundungsverhalten, verminderte soziale Interaktion mit den Artgenossen, reduzierter Antrieb) wurden ebenfalls mit 0 bis 6 Punkten bewertet. Die Reduktion des Muskeltonus wurde mit einem Punktwert von 0 bis 3 bewertet. Die Punktvergabe ist in Tabelle 1 erklärt. Die Gesamtpunktzahl kann maximal 297 betragen. Je höher die Gesamtpunktzahl eines Tieres ist, desto größer ist dessen Stressanfälligkeit.

Tab. 1: Parameter und Punktwerte des SSS zur Einschätzung des individuellen Verhaltens nach Stressende (nach Kiank⁴⁶)

Parameter (SSS)	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte	5 Punkte	6 Punkte
Urinabgabe	kein Urin	feucht um Urethra	½ Bauch feucht	Bauch feucht	Bauch + ½ Rücken feucht	Bauch + Rückseite feucht	gesamtes Fell mit Urin durchtränkt
Kotabgabe	keine Köttel	1-5 Köttel	6-10 Köttel	11-15 Köttel	15-20 Köttel	20-25 Köttel	> 25 Köttel
Bei gleichem Kotvolumen mit Diarrhö wurde der Punktwert für die Kotabgabe verdoppelt.							
Fellzustand	normales Fell	struppig im Nacken	Kopf und Nacken struppig oder leicht schmutzig	gesamter Rücken struppig oder schmutzig	Kopf, Rücken und ½ Bauch struppig, schmutzig	Kopf, Rücken und Bauch struppig, schmutzig	gesamtes Tier extrem struppig + Fell sehr schmutzig
depressives Verhalten	normale Aktivität	leicht reduziertes Erkunden	reduziertes Erkunden mit kurzen Intervallen ohne Aktivität	längere Intervalle ohne Aktivität	stark reduziertes Erkunden, Kauern in Käfigecke	Kauern in Käfigecke, aber Reaktion auf Umweltreize	keine Reaktion auf Umweltreize
Muskeltonus	Normal	leicht reduziert, (vereinzelt Absetzen des Schwanzes)	reduziert, (häufiges + längeres Absetzen des Schwanzes)	stark reduziert, (Nachziehen des Schwanzes)	-	-	-

3.2.2. Acute Stress Severity Score (ASSS)

Ein zweites Punktesystem (Acute Stress Severity Score), das in Anlehnung an den Stress Severity Score entwickelt wurde, sollte die Beurteilung der individuellen Reaktion auf eine akute Stresssituation ermöglichen. Hierbei werden, wie beim SSS, direkt im Anschluss an die Stressexposition die Kot- und Urinabgabe im Röhrchen bestimmt und mit 0 bis 6 Punkten bewertet. Zurück im Heimatkäfig wurde der Fellzustand mit 0 bis 6 Punkten bewertet. Der Muskeltonus des Schwanzes wurde mit Punktwerten von 0 bis 3 bewertet. Das Putzverhalten (Fellpflege) sowie das Erkundungsverhalten wurden im Acute Stress Severity Score getrennt voneinander über einen Zeitraum von 15 Minuten nach der Stresssituation beobachtet und eingeschätzt. Für das Putzverhalten wurden zwischen 0 und 2 Punkten vergeben. Die Bewertung des Erkundungsverhaltens erfolgte durch die Vergabe von -1 bis 6 Punkten. Dabei steht der Punktwert -1 für ein gesteigertes Erkundungsverhalten, während der Punktwert 6 vergeben wurde, wenn das Tier nicht mehr auf äußere Reize reagierte. Die Verteilung der Punkte ist in Tabelle 2 erklärt. Die Maximalpunktzahl, die sich aus der Summe der Einzelparameter eines Tieres

ergibt, liegt bei 35 Punkten. Je höher die Maximalpunktzahl eines Tieres ist, desto größer ist dessen Stressanfälligkeit.

Tab. 2: Parameter und Punktwerte des ASSS zur Einschätzung des individuellen Verhaltens nach Stressende

Parameter (ASSS)	-1 Punkt	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte	5 Punkte	6 Punkte
Urinabgabe	-	kein Urin	feucht um Urethra	Bauch z. T. feucht	Bauch komplett feucht	Bauch + ½ Rücken feucht	Bauch + Rücken feucht	gesamtes Fell mit Urin durchtränkt
Kotabgabe	-	keine Kötter	1-5 Kötter	6-10 Kötter	11-15 Kötter	16-20 Kötter	21-26 Kötter	> 26 Kötter
Bei gleichem Kotvolumen mit Diarrhö wurde der Punktwert für die Kotabgabe verdoppelt.								
Fellzustand	-	glatt	leicht struppig	Rücken z. T. struppig	Rücken komplett struppig	Rücken + Bauch z. T. struppig	Rücken + Bauch struppig	gesamtes Fell struppig
Fellpflege	-	normales Putzverhalten kurz nach Ankunft im Käfig	reduziertes Putzverhalten, verzögert einsetzend	keine Fellpflege bis 15 Minuten nach Stressende	-	-	-	-
Muskeltonus des Schwanzes	-	normal (nach oben gerichtet)	leicht reduziert (gelegentliches Auftippen auf den Boden)	reduziert (häufiges Auftippen auf dem Boden)	stark reduziert (Schwanz liegt auf dem Boden)	-	-	-
Erkundungs-Verhalten	gesteigert (hyperaktiv)	normal	reduziert	reduziert + kurzes Verweilen	reduziert + längeres Verweilen	stark reduziert + kauern in der Käfigecke	kein Erkunden, aber Reaktion auf äußere Stimuli	kein Erkunden, keine Reaktion auf äußere Stimuli

3.2.3. Gewinnung von Blut und Organen

Die Blutabnahme in Narkose erfolgte durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mit Hilfe eines Mikro-Hämatokritröhrchens. Das Blut wurde in EDTA-Vacutainerröhrchen gesammelt und kurz geschwenkt, um eine Koagulation zu verhindern. Für die Gehirnpräparation wurde der Kopf nach zervikaler Dislokation abgetrennt und die Schädelkalotte entlang der medialen Suturen geöffnet und vorsichtig zur Seite geklappt. Das freigelegte Gehirn wurde mit einem Skalpell entlang der Fissura longitudinalis cerebri geteilt. Beide Hälften wurden jeweils in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die anderen Organe wurden zeitgleich präpariert. Die Bauchseite wurde desinfiziert. Bauchhaut, Muskulatur und Peritoneum wurden eröffnet und die inneren Organe frei präpariert. Ein 5 cm langer Ileumabschnitt wurde ungefähr 1 cm von der Ileozäkalklappe entfernt heraus geschnitten und in Cryomold-Einbettungskammern mit Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde die Lunge frei gelegt, in Biopure Eppendorfgefäße überführt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.4. Quantifizierung der Blutzellpopulationen

Die narkotisierten Tiere wurden durch retroorbitale Plexuspunktion geblutet. Das Blut wurde in EDTA-Vacutainer-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurden am Hämocounter die Gesamtleukozytenzahl, die Lymphozytenzahl sowie die Erythrozyten- und Thrombozytenzahl bestimmt.

3.2.5. Milzzellpräparation

Nach Laparotomie wurde die Milz aseptisch präpariert, in ein vorbereitetes Medium überführt und maximal eine Stunde auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Milzgewebe durch ein Zellsieb gedrückt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kulturmedium aufgefangen. Von dieser Zellsuspension wurden 500 µl in ein FACS-Röhrchen überführt, um am Hämocounter die Zellzahl zu bestimmen. Die verbliebene Zellsuspension wurde fünf Minuten bei 1500 U/min und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in einem definierten Volumen Kulturmedium resuspendiert, so dass man eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml erhielt.

3.2.6. Durchflusszytometrie

3.2.6.1. Phänotypisierung von Milzzellen

Die Milzzellsuspension wurde, wie unter 3.2.5 beschrieben, gewonnen. Davon wurden 50 µl in ein 5 ml FACS-Röhrchen pipettiert. Um spezifische Oberflächenmoleküle der Zellen anzufärben, wurden Antikörper gegen CD3, CD19 und Isotyp-Kontrollen zugegeben. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Alle Proben wurden zum Waschen zweimal für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurden die Proben in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am FACS-Gerät gemessen. Pro Ansatz erfolgte eine Messung von 20000 Milzzellen. Auswertung und graphische Darstellung erfolgten mit Hilfe von WinMDI 2.8.

3.2.6.2. Quantifizierung apoptotischer Zellen in der Milz

Es wurden 50 µl der Milzzellsuspension mit AnnexinV-Biotin und Streptavidin-CyChrom in einem 5 ml FACS-Röhrchen für 45 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Für die Gegenfärbung wurden anti-CD3- und anti-CD19-Antikörper verwendet. Anschließend erfolgten die Analyse im FACScan sowie die Auswertung mittels WinMDI 2.8.

3.2.7. Bestimmung der Kortikosteronkonzentration im Plasma

Das Blut narkotisierter Tiere wurde in EDTA-Vacutainerröhrchen gesammelt. Durch Zentrifugation der Proben bei 1500 rpm für zehn Minuten wurde das Plasma von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt und entweder direkt analysiert oder bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Kortikosteronkonzentration im Plasma wurde unter Verwendung eines ELISA durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers weitgehend befolgt. Die Plasmaproben der gestressten Tiere wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt und die der Kontrolltiere in einer 1:10 Verdünnung.

3.2.8. Bestimmung der bakteriellen Translokation

Nach zervikaler Dislokation wurden die Tiere mit 70%-igem Ethanol vollständig benetzt und für ca. 30 Sekunden desinfiziert. Die Bauchwand wurde eröffnet und es folgte die sterile Entnahme von zwei oder drei mesenterialen Lymphknoten, die das Ileum und das Zäkum drainieren. Das Gewebe wurde in steril gefiltertes Thioglykollat-Medium überführt. Die in den Gewebeproben enthaltenen Bakterien wurden in der Nährlösung für 6 oder 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln angereichert. Danach wurde die Suspension in verschiedenen Verdünnungen auf Columbia Blutagarplatten ausgestrichen und für weitere 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien bestimmt und auf 1 ml Suspension der Anreicherungskultur berechnet.

3.2.9. Konzentrationsbestimmung von Tryptophan und Tryptophankataboliten im Plasma

Für die Bestimmung der Tryptophankonzentration sowie die der Tryptophankataboliten wurden pro Tier 100 µl Plasma benötigt. In einem Eppendorf Röhrchen wurden zu jeder Plasmaprobe 10 µl gelöste Trichloressigsäure (50%), 10 µl Phenylalanin (13,6 mg/100ml), 10 µl Kynureninsäure (d4 6mg/L), 10 µl Kynurenin (d6 3,3mg/100ml), 100 µl Methanol sowie 60 µl Aqua dest. pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde für 20 Sekunden mit Hilfe eines Vortexgerätes durchmischt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben ein weiteres Mal durchmischt und danach für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Je 200 µl des Überstandes wurde in eine 96-well-v-bottom Mikrotiterplatte überführt. Die Platte wurde laut Layoutprotokoll beschriftet, mit spezieller Abdeckfolie versiegelt. Die Proben wurden mittels Tandem-Massen-Spektrometer (Refurb Wallac MS2) von Dr. G. Fusch, Institut für Pädiatrie und pädiatrische Intensivmedizin des Universitätsklinikums Greifswald mit einer modifizierten Messmethode nach Nagy et al.¹³⁶ gemessen.

3.2.10 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.02 durchgeführt. Unterschiede von zwei unabhängigen Proben wurden anhand des Mann-Whitney Tests geprüft. Abhängige Parameter (unterschiedliche Zeitpunkte) wurden mittels Wilcoxon-Rank-Test verglichen. Beide Signifikanztests setzen keine Gauß'sche Normalverteilung voraus, welche bei den kleinen Gruppen (6 Tiere) nicht immer gegeben war. Alle Daten wurden als Medianwert (Boxplots) \pm Standardabweichung ausgedrückt. $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Unterschiedliche Stressanfälligkeit von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen

Verhaltensänderungen wurden bei akut und chronisch gestressten Tieren beider Mausstämme beobachtet. Um die Verhaltensbeobachtungen zu messen, wurden zwei Punktesysteme verwendet.

Für das akute Stressmodell wurde der Acute Stress Severity Score (ASSS) entworfen und verwendet. Eine umfassende Beschreibung des Acute Stress Severity Scores befindet sich im Abschnitt 3.2.2. des Methodenteils.

Im chronischen Stressmodell wurde der Stress Severity Score (SSS), der im Abschnitt 3.2.1. des Methodenteils erklärt wird, zur Bewertung der Verhaltensreaktionen herangezogen.

In beiden Punktesystemen wurde die Aufsummierung der einzelnen Punktwerte zur Beurteilung der generellen Stressanfälligkeit verwendet. Je höher die Gesamtpunktzahl war, desto größer wurde die Stressanfälligkeit eines Tieres eingeschätzt.

4.1.1. Mausstammspezifische Verhaltensauffälligkeiten nach akuter Stressexposition

Bei der Urin- und Kotabgabe, die direkt nach Stressende im Immobilisationsröhrchen bestimmt wurden, gab es keine stammspezifischen Unterschiede (Abb. 3a, b). Anschließend wurden die Mäuse wieder in den Heimatkäfig gesetzt. Hinsichtlich der Fellbeschaffenheit konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen festgestellt werden (Abb. 3c). Allerdings zogen sich akut gestresste BALB/c-Mäuse in periphere Käfigecken zurück, während gestresste C57BL/6-Mäuse hingegen aufgeweckt die Gitterstäbe entlang kletterten, den gesamten Käfig erkundeten und kurz darauf mit der Fellpflege begannen (Abb. 3d, e). Der Schwanzmuskeltonus der C57BL/6-Mäuse war im Vergleich zu dem der

BALB/c-Mäuse nicht reduziert (Abb. 3f). Fasst man alle untersuchten Parameter zusammen, lässt sich sagen, dass akut gestresste C57BL/6-Mäuse ein stärkeres Erkundungs- und Putzverhalten zeigten als BALB/c-Mäuse, die mit Rückzug und Scheu reagierten.

Die Aufsummierung der Punktwerte der Einzelparameter (ASSS-Gesamtpunktzahl) wies auf einen signifikanten Unterschied bezüglich der Stressanfälligkeit zwischen akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen hin (Abb. 4). C57BL/6-Mäuse zeigten im akuten Stressmodell eine höhere Stressresistenz als BALB/c-Mäuse.

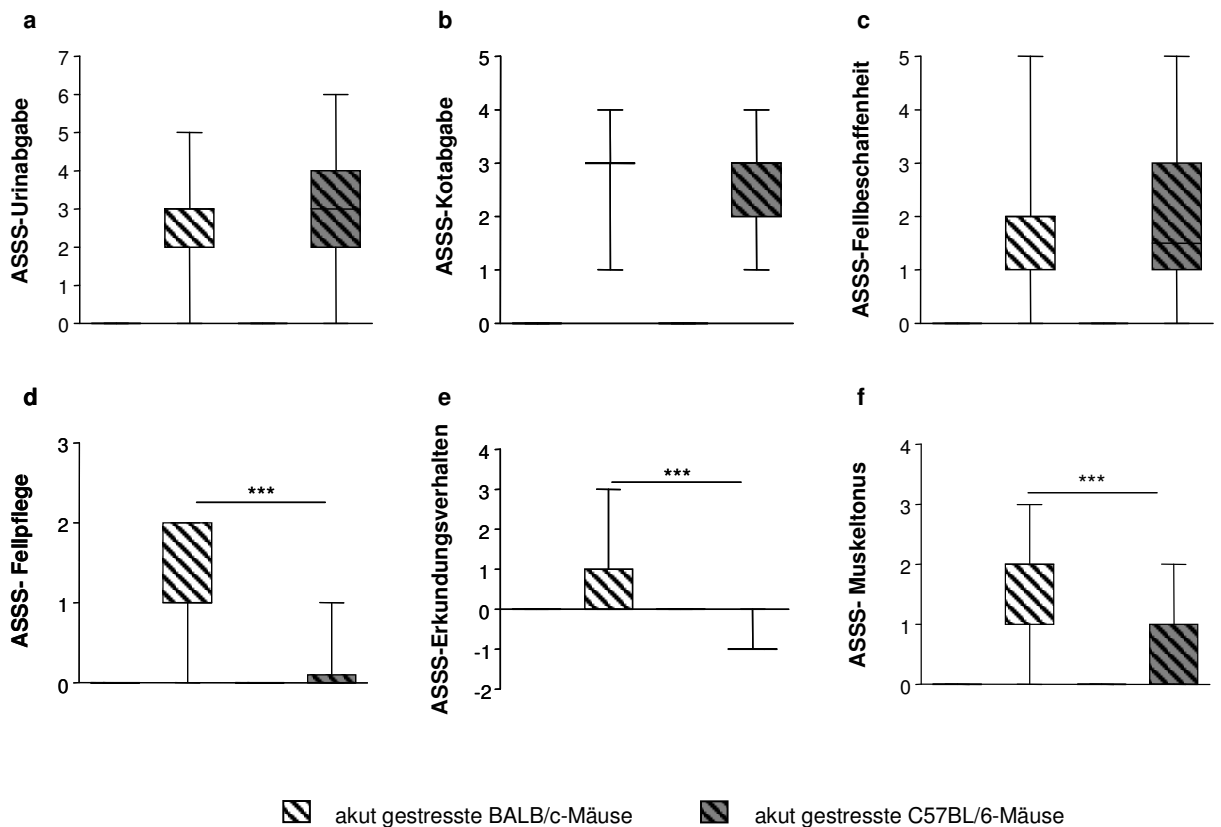
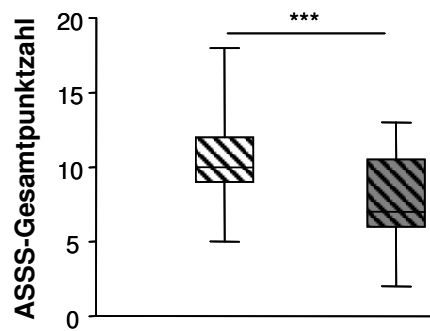


Abb. 3: Parameter des Acute Stress Severity Scores (ASSS) bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Bewertung der Einzelparameter innerhalb der ersten 15 Minuten nach Stressende. Urinabgabe (a), Kotabgabe (b), Fellbeschaffenheit (c), Putzverhalten (d), Erkundungsverhalten (e) und Schwanzmuskeltonus (f) bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. n=30 Tiere/Gruppe; ***p<0,001 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus fünf unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.



 akut gestresste BALB/c-Mäuse
  akut gestresste C57BL/6-Mäuse

Abb. 4: Gesamtpunktzahl des Acute Stress Severity Scores (ASSS) bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Aufsummierung der Punkte der Einzelparameter. n=30 Tiere/Gruppe; ***p<0,001 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus fünf unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.1.2. Mausstammsspezifische Verhaltensauffälligkeiten nach chronischer Stressbehandlung

Um auch eine Aussage über das Verhalten von C57BL/6-Mäusen während chronischer Stressexposition treffen zu können, wurden diese zusammen mit BALB/c-Mäusen im chronischen Stressmodell untersucht.

Obwohl im akuten Stressmodell keine Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen bezüglich der Kot- und Urinabgabe bestanden, zeigte sich im Verlauf der chronischen Stressbehandlung, dass C57BL/6-Mäuse mehr Urin und Kot als Reaktion auf die Stressexposition abgaben als BALB/c-Mäuse (Abb. 5a, b). Bei chronisch gestressten Tieren beider Mausstämmen konnte außerdem eine tageszeitliche Veränderung der Kotmenge sowie der Stuhlqualität beobachtet werden. In den morgendlichen Stresssitzungen führte das Auftreten von Durchfall zu höheren Punktwerten für die Kotabgabe als am Abend. Ähnliche tageszeitliche Schwankungen wurden auch bei der Urinabgabe chronisch gestresster BALB/c-Mäuse beobachtet.

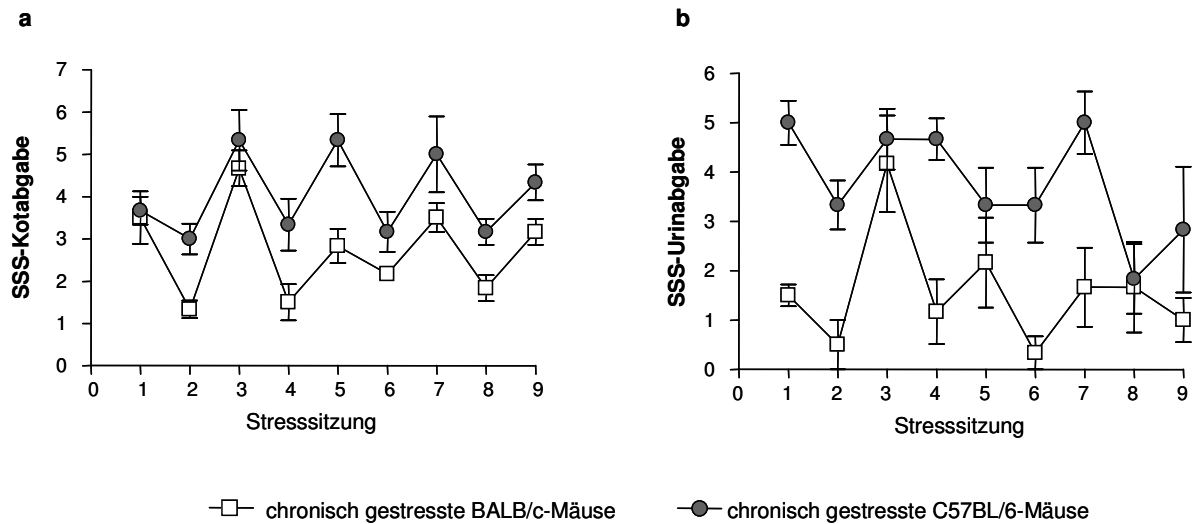
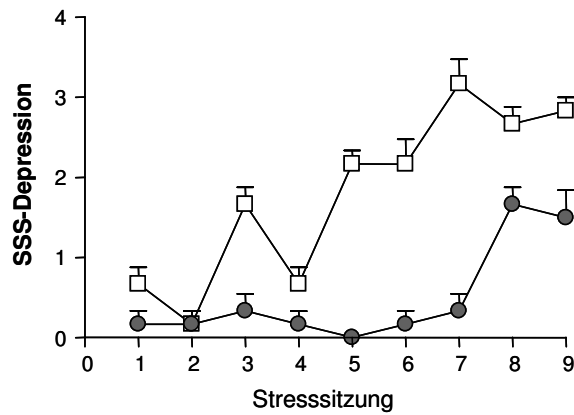


Abb. 5: Kot- und Urinabgabe in chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Bestimmung der abgegebenen Kotmengen (a) und Urinmengen (b) im Immobilisationsröhrchen direkt nach jeder Stresssitzung. n=6 Tiere/Gruppe; p<0,01 (im gepaarten Wilcoxon-Test). Gezeigt sind Daten aus einem von vier Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der individuellen Reaktion auf die chronische Stressbehandlung war die Bewertung des Verhaltens nach jeder Stresssitzung. Das Erkundungsverhalten, die Lokomotion und der Kontakt zu den Artgenossen (soziale Interaktion) wurden hierzu mit 0 bis 6 Punkten bewertet, wobei die Höhe der Punktzahl mit dem Schweregrad des depressionsähnlichen Verhaltens steigt.

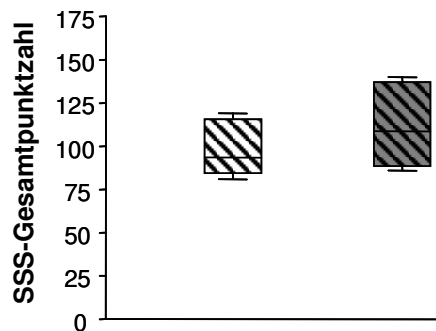
Chronisch gestresste BALB/c-Mäuse zeigten mit zunehmender Anzahl der Stresssitzungen eine verminderte soziale Kontaktaufnahme, ein reduziertes Erkundungsverhalten und zogen sich in die Käfigecken zurück, nachdem sie aus dem Immobilisationsröhrchen befreit wurden (Abb. 6). Gestresste C57BL/6-Mäuse ließen kein depressionsähnliches Verhalten erkennen. Diese erkundeten nach jeder Stresssitzung den Käfig und begannen anschließend mit der Fellpflege.



□ chronisch gestresste BALB/c-Mäuse ● chronisch gestresste C57BL/6-Mäuse

Abb. 6: Verhaltensänderungen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen während chronischer Stressbehandlung. Nach jeder Stresssituation wurde die Ausprägung des depressionsähnlichen Verhaltens von chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bewertet. n=6 Tiere/Gruppe; $p < 0,01$ (im gepaarten Wilcoxon-Test). Gezeigt sind Daten aus einem von vier Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

Die Gesamtpunktzahl des Stress Severity Scores zeigt keinen Unterschied zwischen BALB/c- und C57BL/6-Mäusen (Abb. 7). Während die Antwort auf chronisch psychischen Stress von C57BL/6-Mäusen vorrangig die Kot- und Urinabgabe stimulierte, war es bei BALB/c-Mäusen ein depressionsähnliches Verhalten.



▨ chronisch gestresste BALB/c-Mäuse ▩ chronisch gestresste C57BL/6-Mäuse

Abb. 7: Gesamtpunktzahl des Stress Severity Scores (SSS). Nach der neunten Stresssituation wurden die Einzelparameter aller Stresssituationen aufsummiert. n=6 Tiere/Gruppe. Gezeigt sind Daten aus einem von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.2. Veränderungen von Glukokortikoidspiegeln, hämatologischen Parametern und Gewicht in beiden Mausstämmen nach Stressexposition

Neben dem Verhalten sollten die HPA-Achse sowie die Folgen ihrer Aktivierung bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen verglichen werden. Dafür wurden die Glukokortikoidspiegel im Plasma, die peripheren Leuko- und Lymphozytenzahlen nach akutem und chronischem Stress sowie Gewichtsveränderungen im Rahmen des chronischen Stressmodells untersucht.

4.2.1. Aktivierung der HPA-Achse in akut und chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen

Um eine HPA-Achsenaktivierung nachzuweisen, wurden die Kortikosteronspiegel im Plasma gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse mit denen der Kontrolltiere verglichen. Die Messungen fanden direkt und sechs Stunden nach akutem Stress sowie nach der neunten Stresssitzung des chronischen Stressmodells statt.

Dabei konnten in Einzelexperimenten direkt nach einer akuten Stressbehandlung signifikant erhöhte Kortikosteronkonzentrationen im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 8a, b). Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren Experimenten nicht reproduziert werden (Abb. 8a, b, c).

Bei der Aufsummierung der Ergebnisse der durchgeführten Experimente war lediglich die Tendenz für eine stressinduzierte Erhöhung des Plasmakortikosterons bei beiden Mausstämmen zu erkennen (Abb. 8d).

Auch sechs Stunden nach akutem Stress wurden im Plasma gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse die Kortikosteronspiegel bestimmt. Einen signifikanten Anstieg des Plasmakortikosterons konnte für gestresste BALB/c-Mäuse in einem von zwei durchgeführten Experimenten gezeigt werden (Abb. 9a). Bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen waren die Kortikosteronkonzentrationen im Plasma tendenziell, jedoch nicht signifikant,

erhöht (Abb. 9a, b). Die Zusammenfassung der Ergebnisse aus den zwei durchgeführten Experimenten ergab ebenfalls nur Hinweise auf einen stressbedingten Anstieg der Kortikosteronkonzentrationen im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen (Abb. 9c).

Im Plasma chronisch gestresster BALB/c-Mäuse konnte entgegen früherer Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe ⁴⁶ kein signifikanter Anstieg der Kortikosteronkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 10a, b). In einem von drei Experimenten wurden signifikant erhöhte Kortikosteronspiegel im Plasma chronisch gestresster C57BL/6-Mäuse gemessen (Abb. 10a).

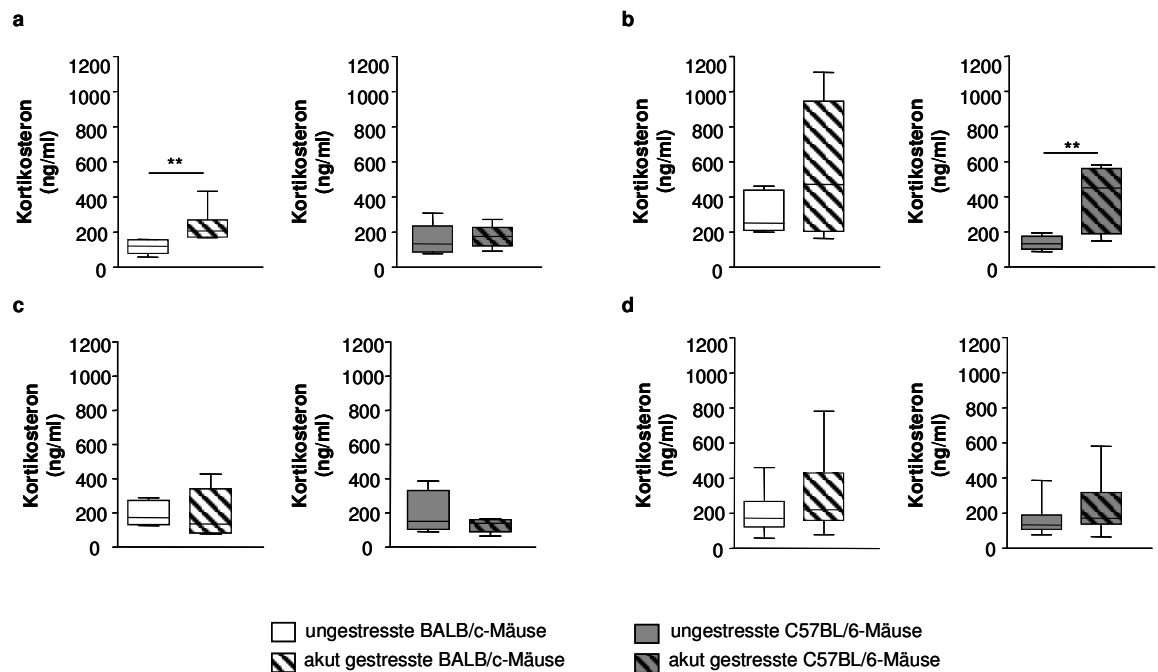


Abb. 8: Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress. Direkt nach einer einzelnen Stresssituation wurden im Plasma von gestressten und ungestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen die Kortikosteronkonzentrationen bestimmt. **a-c**, Kortikosteronspiegel im Plasma akut gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse und Kontrolltieren aus Einzelexperimenten. n=6 Tiere/Gruppe; **p<0,01 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind Daten aus Einzelexperimenten. **d**, Aufsummierung der Ergebnisse der Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen aller drei Einzelexperimente. n=18 Tiere/Gruppe.

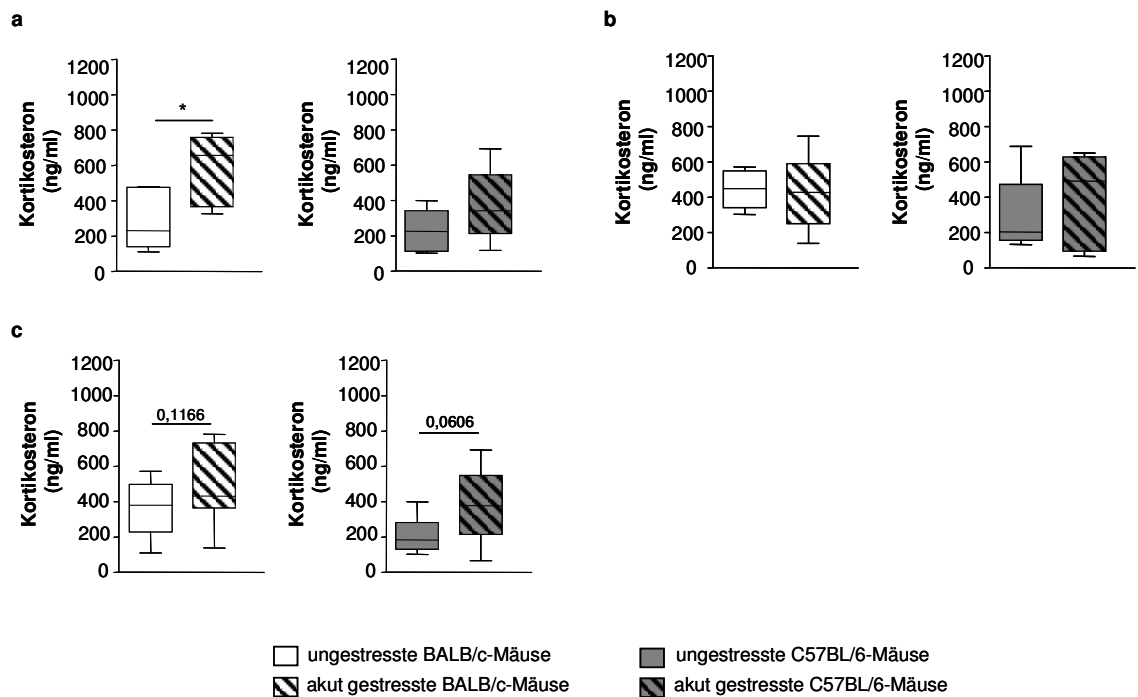


Abb. 9: Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach akutem Stress. Sechs Stunden nach einer einzelnen Stresssitzung wurden im Plasma von gestressten und ungestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen die Kortikosteronkonzentrationen bestimmt. **a, b**, Kortikosteronspiegel im Plasma akut gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse und Kontrolltieren aus Einzelexperimenten. n=6 Tiere/Gruppe, *p<0,05 (im Mann-Whitney-U-Test). **c**, Aufsummierte Daten der Ergebnisse der Kortikosteronkonzentration im Plasma gestresster und ungestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse aus zwei unabhängigen Experimenten. n=12 Tiere/Gruppe.

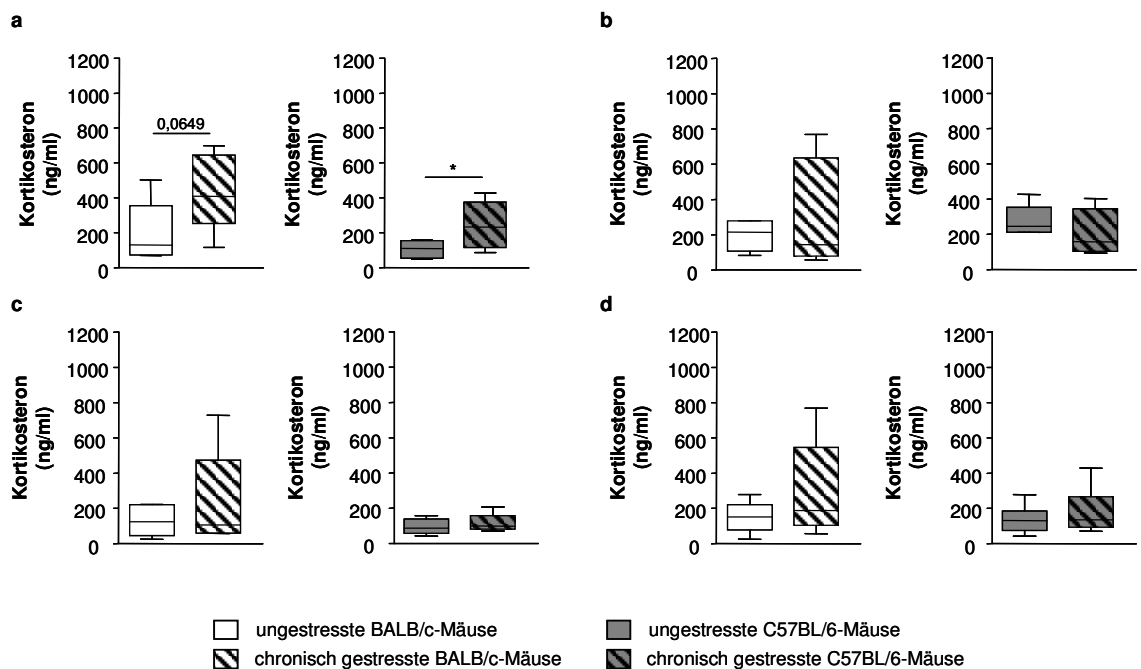


Abb. 10: Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach chronischem Stress. Nach der neunten Stresssitzung wurde im Plasma gestresster und ungestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse die Kortikosteronkonzentration bestimmt. **a-c**, Kortikosteronspiegel im Plasma chronisch gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse und Kontrolltieren aus Einzelexperimenten. n=6 Tiere/Gruppe; *p<0,05 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind Daten aus Einzelexperimenten. **d**, Aufsummierung der Ergebnisse der Kortikosteronspiegel im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen aller drei Einzelexperimente. n=18 Tiere/Gruppe.

4.2.2. Leuko- und Lymphozytopenie im Blut nach akuter und chronischer Stressexposition

Da bekannt ist, dass eine vermehrte Freisetzung von Glukokortikoiden im Stress mit einer Veränderung der Blutzellpopulationen einher geht ², wurden direkt und sechs Stunden nach akutem Stress sowie nach der neunten Stresssitzung des chronischen Stressmodells die Zellzahlen im Blut gestresster und ungestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse mit Hilfe eines Hämocounters bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach einer einzelnen akuten Stresssitzung die Leuko- und Lymphozytenzahlen im Blut beider Mausstämme signifikant erniedrigt waren (Abb. 11a, b). Sechs Stunden nach akutem Stress befanden sich die Leuko- und Lymphozytenzahlen bei BALB/c-Mäusen wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere (Abb. 12a, b). Die Zellzahlen von den gestressten C57BL/6-Mäusen waren zu diesem Zeitpunkt noch erniedrigt (Abb. 12a, b).

Auch nach der chronischen Stressbehandlung wurden bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen eine Leuko- und Lymphozytopenie nachgewiesen (Abb. 13a, b). In chronisch gestressten C57BL/6-Mäusen fielen zusätzlich erniedrigte Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen auf (Abb. 14a, b).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde direkt nach der neunten Stresssitzung in den Milzzellsuspensionen gestresster Tiere beider Mausstämme ein erhöhter Anteil apoptotischer T-Zellen gemessen (Abb. 15).

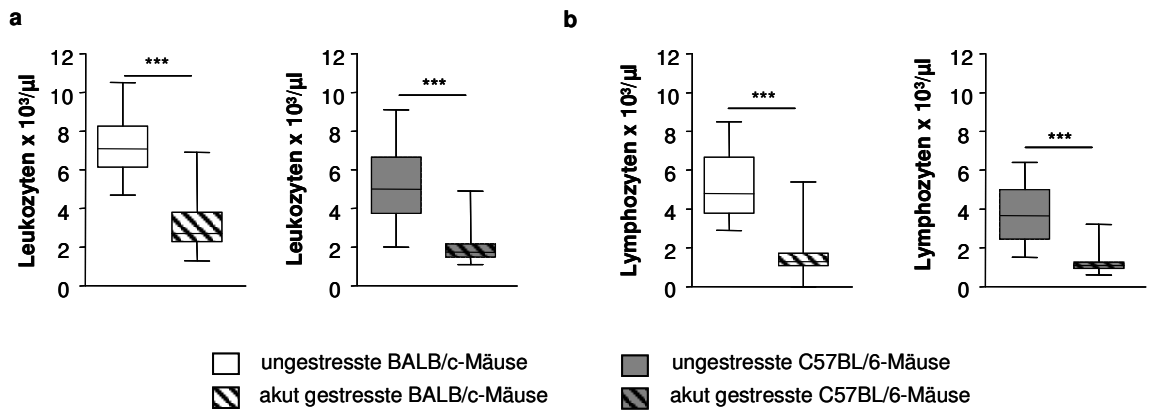


Abb. 11: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress. Direkt nach einer einzelnen Stresssitzung wurden mit Hilfe des Hämocounters die Leukozytenzahlen (a) und Lymphozytenzahlen (b) im Blut von akut gestressten und ungestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bestimmt. n = 18 Tiere/Gruppe, *p < 0,05; **p < 0,01 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

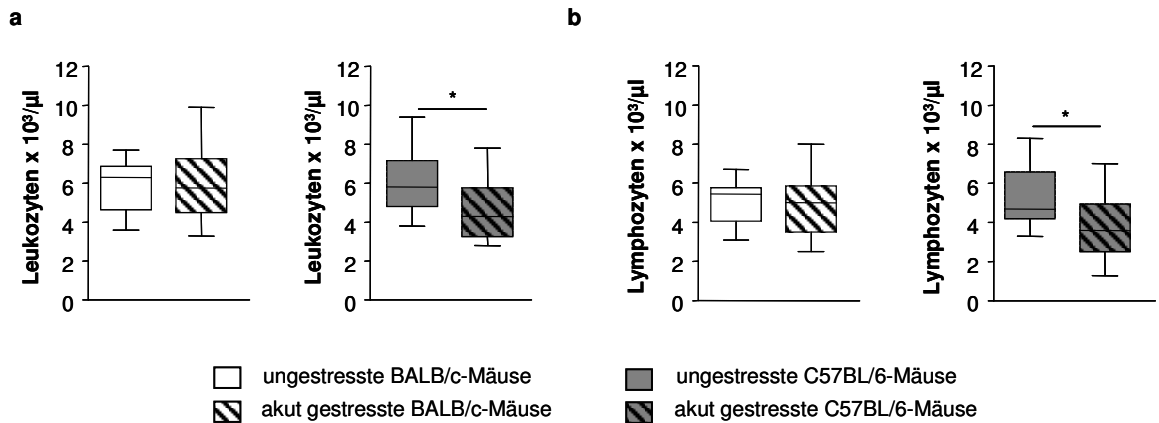


Abb. 12: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach akutem Stress. Sechs Stunden nach einer einzelnen Stresssitzung wurden mit Hilfe des Hämocounters die Leukozytenzahlen (a) und Lymphozytenzahlen (b) im Blut von gestressten und ungestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bestimmt. n = 12 Tiere/Gruppe, *p < 0,05 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

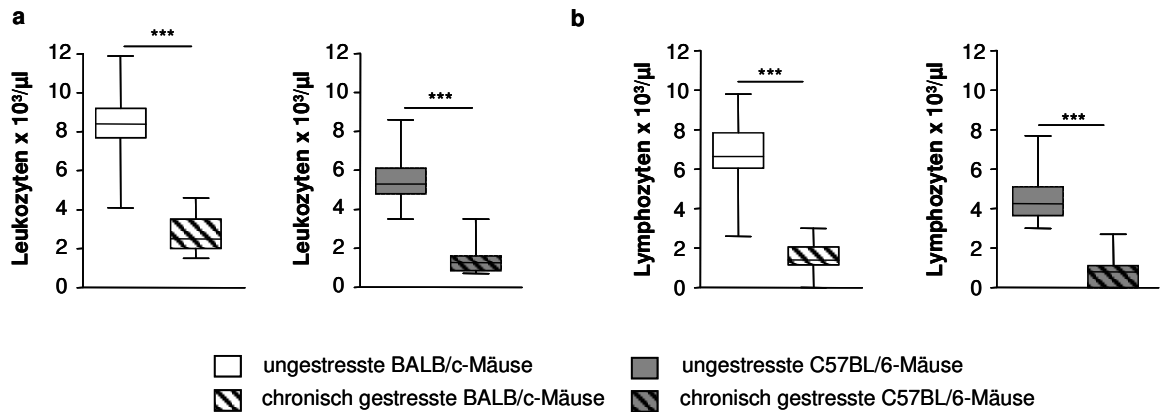


Abb. 13: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut von chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Direkt nach der neunten Stresssitzung wurden mit Hilfe des Hämocounters die Leukozytenzahlen (**a**) und Lymphozytenzahlen (**b**) im Blut von gestressten und ungestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bestimmt. n=18 Tiere/Gruppe, **p<0,01; ***p<0,0001 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus vier unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

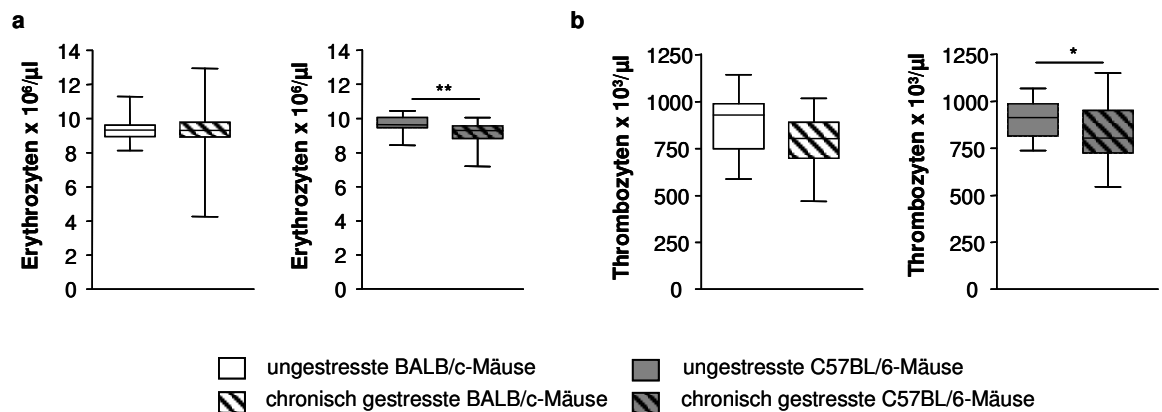


Abb. 14: Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen im peripheren Blut von chronisch gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Direkt nach der neunten Stresssitzung wurden mit Hilfe des Hämocounters die Erythrozytenzahlen (**a**) und Thrombozytenzahlen (**b**) im Blut von gestressten und ungestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bestimmt. n=18 Tiere/Gruppe, **p<0,01; ***p<0,0001 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus vier unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

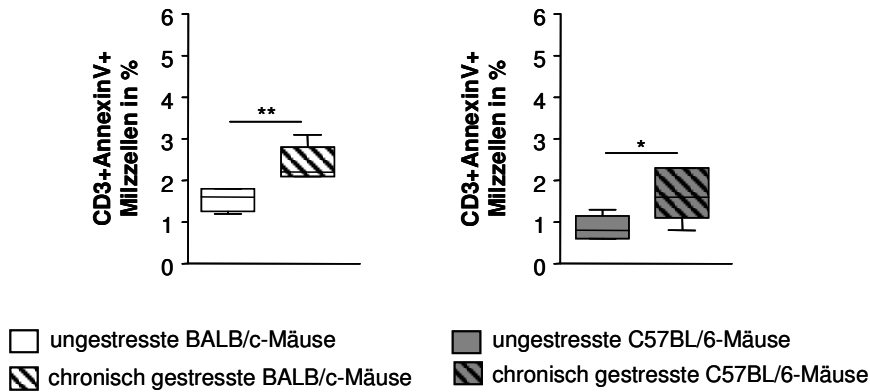


Abb. 15: Anteil apoptotischer T-Zellen in Milzellsuspensionen beider Mausstämme nach chronischer Stressexposition. Nach der neunten Stresssitzung wurden die Milzen entnommen. In der hergestellten Milzellsuspension wurde per Durchflusszytometrie der Anteil der apoptotischen T-Zellen bestimmt. n=6 Tiere/Gruppe, *p<0,05; **p<0,01 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind Daten aus einem von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.2.3. Stärkerer Gewichtsverlust nach chronischer Stressexposition bei BALB/c-Mäusen

Dass BALB/c-Mäuse im Verlauf des chronischen Stressmodells trotz ausreichender Nahrungs- und Trinkwasserzufuhr Gewicht verlieren, wurde in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt ⁴⁶. In den hier durchgeführten Versuchen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die wiederholte Stressexposition auf das Gewicht von C57BL/6-Mäusen hat. Dazu wurde das Gewicht vor Beginn der ersten Stresssitzung und im Anschluss an die neunte Stresssitzung bestimmt und der Gewichtsunterschied ermittelt.

Es konnte erneut gezeigt werden, dass chronisch gestresste BALB/c-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren Gewicht verloren (Abb. 16). Bei gestressten C57BL/6-Mäusen wurden keine signifikanten Gewichtsveränderungen gegenüber den ungestressten Mäusen festgestellt (Abb. 16).

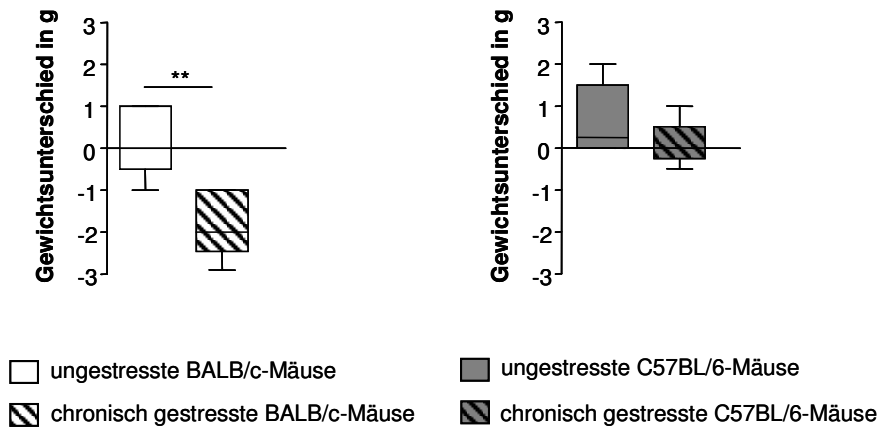


Abb. 16: Gewichtsveränderungen durch chronischen Stress bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Das Gewicht wurde vor der ersten und im Anschluss an die neunte Stresssitzung bestimmt. n=6 Tiere/Gruppe; **p<0,01 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.3. Bakterielle Translokation in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach akuter Stressexposition

In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe konnte bei BALB/c-Mäusen gezeigt werden, dass bereits sechs Stunden nach akutem Stress die Apoptoserate der intestinalen Epithelzellen im Ileum erhöht war. Zeitgleich konnte eine Translokation kommensaler Darmbakterien in die mesenterialen Lymphknoten und die Leber nachgewiesen werden. Ob eine bakterielle Translokation auch bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen auftritt, wurde mit Hilfe von Anreicherungskulturen der mesenterialen Lymphknoten überprüft.

Sechs Stunden nach einer einzelnen Stressexposition konnten sowohl bei BALB/c- als auch bei C57BL/6-Mäusen erhöhte Keimzahlen in den mesenterialen Lymphknoten (MLN) im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 17). Eine stressbedingte bakterielle Translokation fand somit bei beiden Mausstämmen statt.

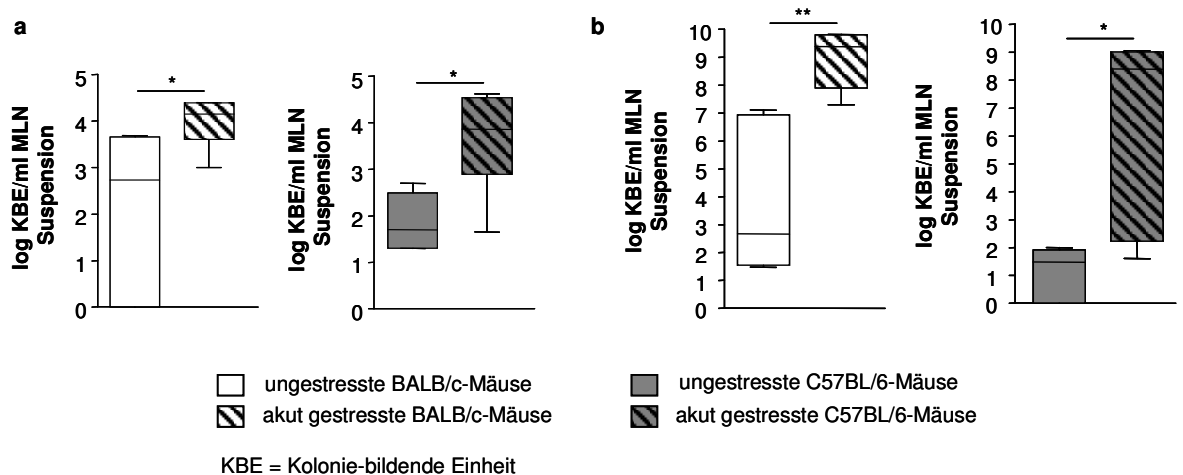


Abb. 17: Bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten (MLN) bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach akuter Stressexposition. 6-Stunden-Anreicherungskultur (a) und 24-Stunden-Anreicherungskultur (b) von Keimen aus den mesenterialen Lymphknoten, die sechs Stunden nach akutem Stress entnommen wurden. n=6 Tiere/Gruppe, *p<0,05; **p<0,01 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind Daten aus Einzelexperimenten mit unterschiedlicher Anreicherungszeit.

4.4. Stressinduzierte Veränderungen des Tryptophanmetabolismus

4.4.1. Induktion des Kynureninstoffwechselweges direkt nach akuter Stressexposition in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass es im Zusammenhang mit der stressinduzierten bakteriellen Translokation zu einer transienten Aktivierung des Tryptophankatabolismus entlang des Kynureninabbauweges in gestressten BALB/c-Mäusen kommt. Auch in akut gestressten C57BL/6-Mäusen wurde ein Übertritt von Bakterien in die mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen. Deshalb sollte geklärt werden, ob auch bei diesem Mausstamm ein stressbedingter verstärkter Tryptophanabbau beobachtet werden kann. Dazu wurden die Konzentrationen von Tryptophan und den Tryptophanmetaboliten im Plasma gestresster sowie ungestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse bestimmt.

Direkt nach Beendigung einer einzelnen Stresssitzung wurden Tryptophankatabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bestimmt. Die Tryptophanspiegel im Plasma akut gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse wiesen zwar keinen signifikanten Unterschied zu denen der Kontrolltiere auf (Abb. 18a), allerdings waren die Kynureninsäurekonzentrationen bei

gestressten Tieren beider Mausstämme signifikant erhöht (Abb. 18b). Zusätzlich konnten bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen signifikant verminderte Serotoninspiegel nachgewiesen werden (Abb. 18c). Die Serotoninkonzentrationen im Plasma gestresster und ungestresster BALB/c-Mäuse unterschieden sich dagegen nicht (Abb. 18c). Bei BALB/c-Mäusen wurden jedoch direkt nach akuter Stressexposition erhöhte Kynureninspiegel gemessen (Abb. 18d). Die Plasmakonzentrationen von Kynurenin waren bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen gegenüber denen der Kontrolltiere zum Messzeitpunkt nicht signifikant verändert (Abb. 18d). Die Konzentrationen von Hydroxytryptophan und Chinolinsäure im Plasma gestresster Tiere beider Mausstämme unterschieden sich nicht von denen der Kontrolltiere (Abb. 18e, f).

Sechs Stunden nach akutem Stress waren die Hydroxytryptophanspiegel sowie die Serotoninspiegel gestresster BALB/c-Mäuse gegenüber denen der Kontrolltiere erniedrigt (Abb. 19c, e). Die Konzentrationen von Tryptophan, Kynureninsäure, Kynurenin und Chinolinsäure befanden sich bei gestressten BALB/c-Mäusen wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere (Abb. 19a, b, d, f). Die Konzentrationen von Tryptophan sowie von den untersuchten Tryptophanmetaboliten unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant zwischen gestressten und ungestressten C57BL/6-Mäusen (Abb. 19a-f). Demnach hielt der stressbedingte Tryptophankatabolismus in BALB/c-Mäusen länger an als in C57BL/6-Mäusen.

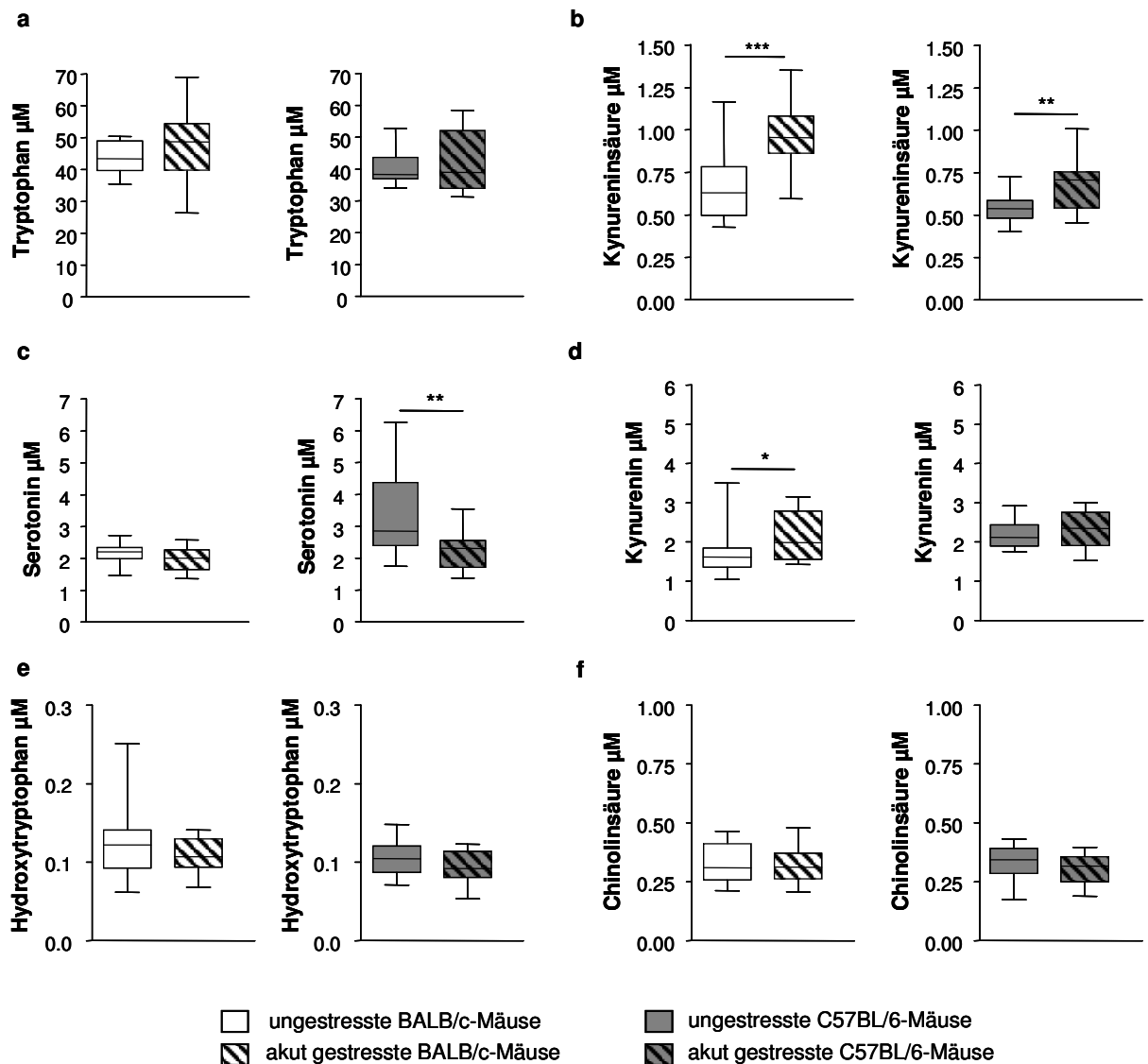


Abb. 18: Tryptophan und Tryptophanmetabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress. Direkt nach akuter Stressexposition wurden die Konzentrationen von Tryptophan (a), Kynureninsäure (b), Serotonin (c), Kynurenin (d), Hydroxytryptophan (e) und Chinolinsäure (f) im Plasma gestresster und ungestresster Tiere mittels Tandemmassenspektrometer bestimmt. $n=18$ Tiere/Gruppe, * $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,0001$ (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

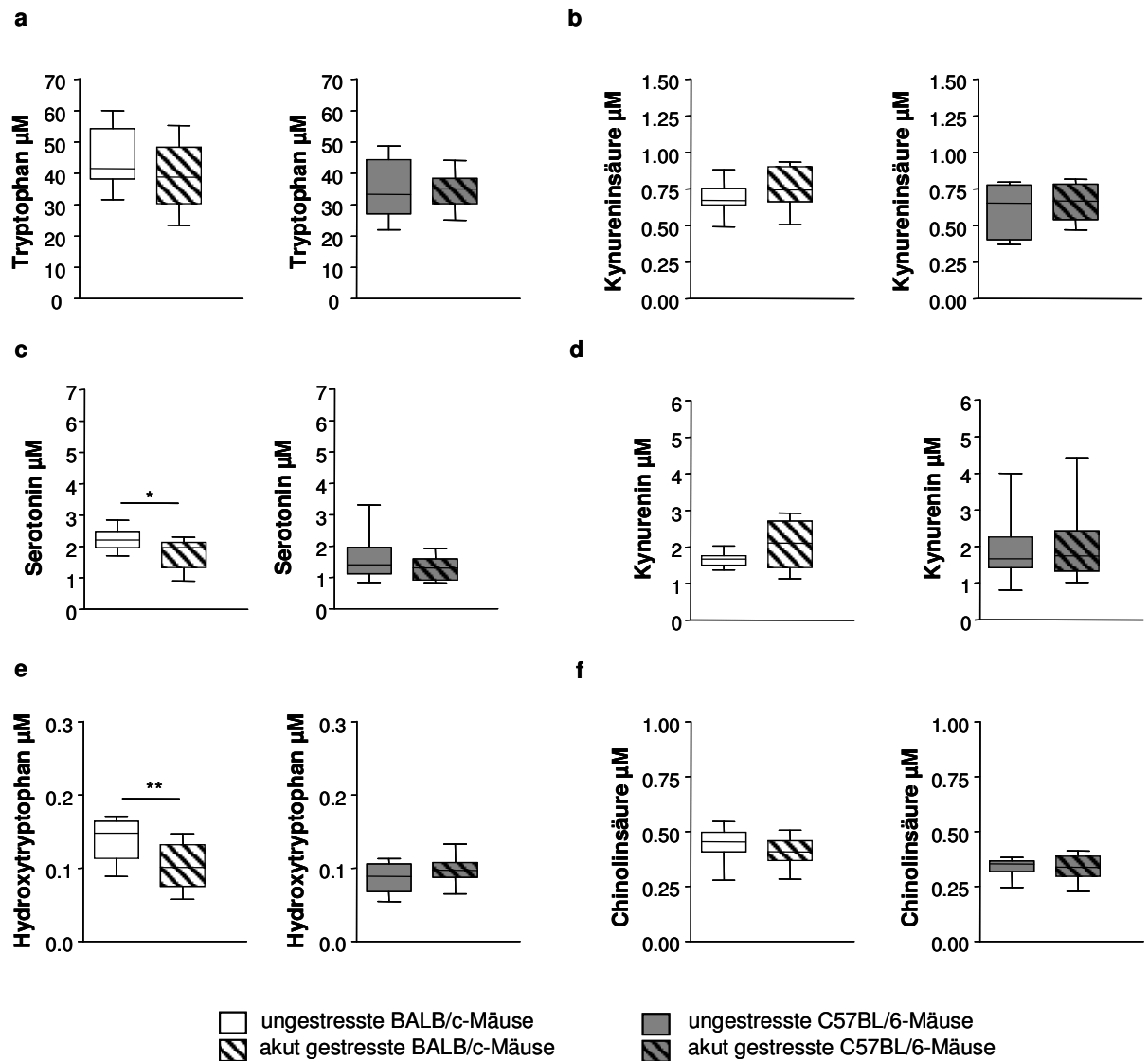


Abb. 19: Tryptophan und Tryptophanmetabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen sechs Stunden nach akutem Stress. Sechs Stunden nach akuter Stressexposition wurden die Konzentrationen von Tryptophan (a), Kynureninsäure (b), Serotonin (c), Kynurenin (d), Hydroxytryptophan (e) und Chinolinsäure (f) im Plasma gestresster und ungestresster Tiere mittels Tandemmassenspektrometer bestimmt. $n=12$ Tiere/Gruppe; * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.4.2. Verstärkter Tryptophankatabolismus nur in chronisch gestressten BALB/c-Mäusen

Dass es in chronisch gestressten BALB/c-Mäusen zu Veränderungen des Tryptophanabbaus kommt, wurde in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt. Hierbei konnte ein Absinken der Tryptophan- und Serotoninspiegel im Plasma gezeigt werden, welches mit einer Kynureninsäureakkumulation einherging. In den durchgeführten Experimenten wurden ebenfalls direkt nach der neunten Stresssitzung die Plasmaspiegel von Tryptophan und seinen Kataboliten bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bestimmt. Im Plasma chronisch gestresster BALB/c-Mäuse wurde ein Abfall der Tryptophan- und Serotoninkonzentrationen bestätigt, welcher hier allerdings nicht signifikant gegenüber den Kontrolltieren war (Abb. 20a, c). Die Plasmaspiegel von Tryptophan und Serotonin in chronisch gestressten C57BL/6-Mäusen waren, verglichen mit denen der Kontrolltiere, unverändert (Abb. 20a, c). Parallel zu den erniedrigten Tryptophan- und Serotoninkonzentrationen wurden signifikant erhöhte Kynureninsäurespiegel im Plasma gestresster BALB/c-Mäuse gemessen (Abb. 20b). Bei C57BL/6-Mäusen kam es im chronischen Stressmodell zum Messzeitpunkt zu keinem Anstieg der Kynureninsäurespiegel (Abb. 20b). Die Konzentrationen von Kynurenin, Hydroxytryptophan und Chinolinsäure im Plasma chronisch gestresster BALB/c- und C57BL/6-Mäuse unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrolltiere (Abb. 20d-f). Anders als im akuten Stressmodell, bei dem eine Aktivierung des Tryptophankatabolismus in beiden Mausstämmen stattgefunden hat, war diese im chronischen Stress nur bei BALB/c-Mäusen nachzuweisen.

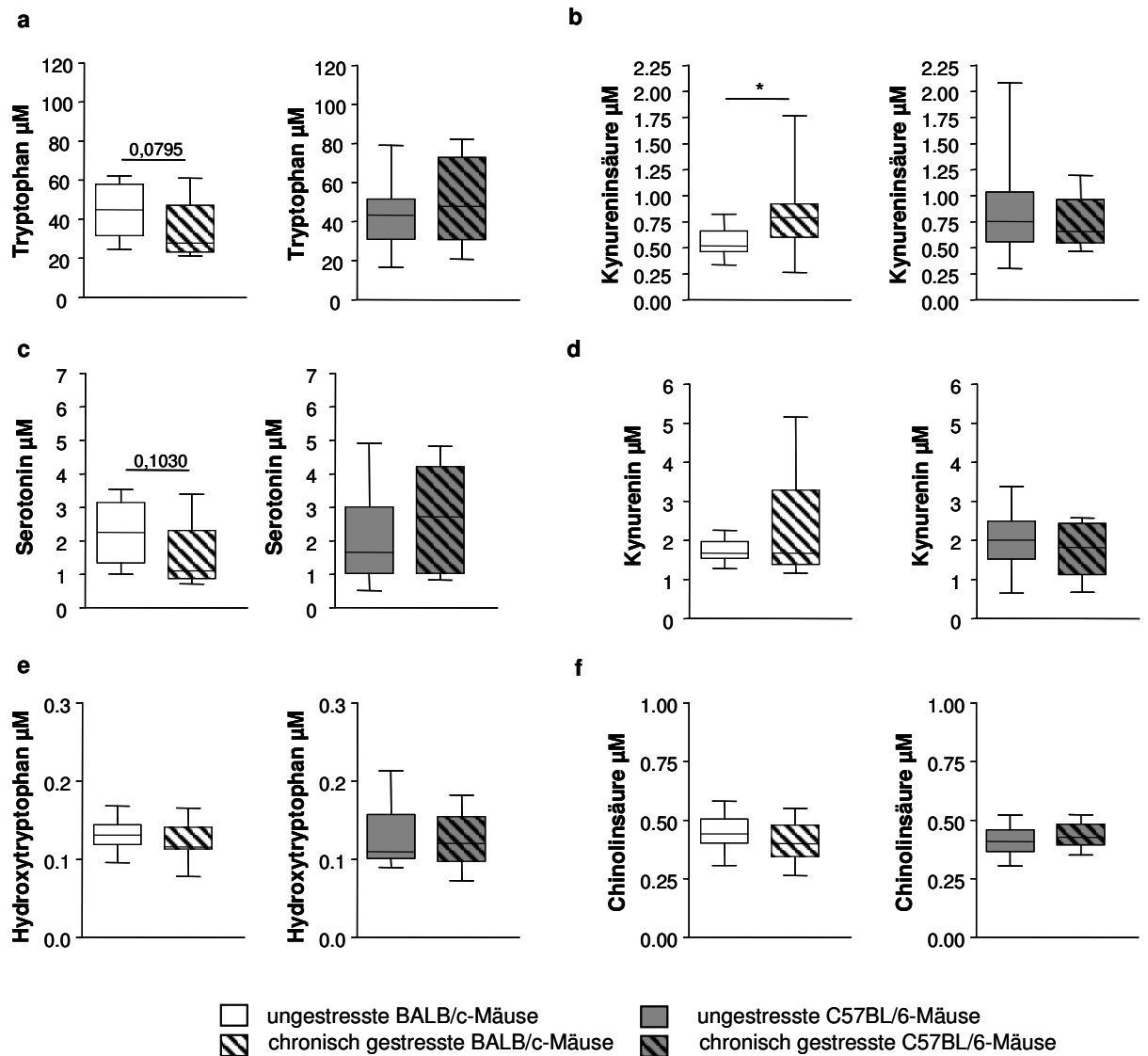


Abb. 20: Tryptophan und Tryptophanmetabolite im Plasma von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach chronischem Stress. Direkt nach der neunten Stresssitzung wurden die Konzentrationen von Tryptophan (a), Kynureninsäure (b), Serotonin (c), Kynurenin (d), Hydroxytryptophan (e) und Chinolinsäure (f) im Plasma gestresster und ungestresster Tiere mittels Tandemmassenspektrometer bestimmt. n=12 Tiere/Gruppe, *p<0,05 (im Mann-Whitney-U-Test). Gezeigt sind aufsummierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

5. Diskussion

Das europäische Regionalbüro der Weltgesundheitsorganisation (WHO Europe) stellte 2003 in einer Studie fest, dass die Anzahl der durch Stress verursachten Erkrankungen in Europa zunehme und die Lebenserwartung in einigen Staaten dadurch sogar vermindert sei ¹³⁷. Die stressbedingten Veränderungen des Immunsystems gehen einher mit einem erhöhten Risiko für maligne Tumorerkrankungen ¹³⁸, der Entwicklung bzw. Verstärkung von Autoimmunerkrankungen ¹³⁹ sowie einem größeren Risiko für postoperative infektiöse Komplikationen ¹⁴⁰. Auf welche Weise interindividuelle Unterschiede die Anfälligkeit für stressbedingte Veränderungen beeinflussen, ist jedoch noch immer ungeklärt.

In unserer Arbeitsgruppe wurden BALB/c-Mäuse bereits hinsichtlich ihrer Stressanfälligkeit untersucht. Die Tiere wurden dazu pro Stresssitzung für zwei Stunden immobilisiert und vor eine Ultraschallquelle platziert. Die Verhaltensänderungen, neuroendokrine und hämatologische Parameter wurden im akuten Stressmodell (eine einzelne Stresssitzung) sowie im chronischen Stressmodell (neun Stresssitzungen) untersucht.

Nach chronischer Stressexposition zeigten weibliche BALB/c-Mäuse ein depressionsähnliches Verhalten, entwickelten eine Immunsuppression und hatten an Gewicht verloren ⁴⁶. Damit einhergehend konnte eine Darmbarrierestörung mit bakterieller Translokation und einer systemischenIDO1-Aktivierung nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit demIDO1-Inhibitor 1-Methyltryptophan ließen sich die Immunsuppression und die Verhaltensänderungen verhindern ⁹³.

Die Konsequenzen von Stress können jedoch für verschiedene Individuen unterschiedlich sein, da die Stressanfälligkeit nicht allein durch die Art des Stressors bestimmt wird, sondern durch viele weitere Faktoren ^{130, 141}. Dass genetische Unterschiede dabei eine Rolle spielen, konnte in vergleichenden Untersuchungen mit BALB/c- und CBA-Mäusen in unserem chronischen Stressmodell gezeigt werden ⁴⁶.

Bei den vergleichenden Untersuchungen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen im akuten und chronischen Stressmodell konnten in dieser Arbeit ebenfalls stammspezifische Verhaltensweisen nach Stressexposition beobachtet werden. Bei BALB/c-Mäusen fiel schon nach der akuten Stressexposition ein Rückzugsverhalten auf. Im Verlauf des chronischen Stressmodells entwickelten BALB/c-Mäuse das schon aus früheren Experimenten bekannte depressionsähnliche Verhalten ⁴⁶. Dieses ist gekennzeichnet durch ein reduziertes Erkundungsverhalten, eine verminderte Fellpflege sowie das Vermeiden sozialer Kontaktaufnahmen. C57BL/6-Mäuse zeigten dagegen nach einer einzelnen Stresssitzung sowie nach chronischer Stressexposition ein ausgeprägtes Erkundungs- und Putzverhalten. Ein ähnliches Verhalten der C57BL/6-Mäuse konnten Schweizer und Mitarbeiter in einem Modell für chronischen milden Stress nachweisen. Sie beobachteten bei gestressten C57BL/6-Mäusen eine gesteigerte Lokomotoraktivität und ein ausgeprägtes Erkundungsverhalten in der vertikalen Ebene ¹⁴². Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass C57BL/6-Mäuse auch in „open-field“-Untersuchungen ein stärkeres Erkundungsverhalten zeigen als BALB/c-Mäuse ^{131, 143}. Nikulina und Arbeitsgruppe konnten außerdem unterschiedliche Reaktionen im „forced-swimming“-Test nachweisen. So war bei BALB/c-Mäusen eine längere Immobilitätsphase im Vergleich zu den sich relativ schnell bewegenden C57BL/6-Mäusen zu beobachten ^{6, 142}. Eine längere Immobilitätsphase deutet dabei auf ein depressionsähnliches Verhalten hin ^{144, 145}. Durch die vermehrte Aktivität im Anschluss an die Stressexposition schienen C57BL/6-Mäuse in unseren Untersuchungen weniger in ihrem Verhalten beeinflusst zu werden als BALB/c-Mäuse. Zur Einschätzung der Stressanfälligkeit wurde die jeweilige Gesamtpunktzahl des ASSS sowie des SSS herangezogen. Im akuten Stressmodell zeigten C57BL/6-Mäuse demnach eine geringere Stressanfälligkeit als BALB/c-Mäuse.

Im chronischen Stressmodell dagegen unterschieden sich die Gesamtpunktzahlen des SSS nicht signifikant. Allerdings ist zu beachten, dass sich die Punktwerte der Einzelparameter bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen signifikant unterschieden. So wurde die Gesamtpunktzahl bei den BALB/c-Mäusen vor allem durch den Parameter des depressionsähnlichen Verhaltens bestimmt, während die vermehrte Kot- und Urinabgabe die Höhe der

Gesamtpunktzahl der C57BL/6-Mäuse stark beeinflusste. Ein Grund für die stärkere Kotabgabe der C57BL/6-Mäuse könnte eine höhere Serotoninkonzentration im Kolon dieser Mäuse sein. Denn die Motilität des Gastrointestinaltraktes wird unter anderem durch die lokale Serotoninkonzentration beeinflusst ¹⁴⁶. Das Schlüsselenzym der Serotoninsynthese ist die Tryptophanhydroxylase (TPH). Bei der TPH-Isoform 2, die vor allem im Darm vorkommt, besteht ein Polymorphismus, der zu unterschiedlichen Serotoninsynthesekapazitäten bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen führt. C57BL/6-Mäuse weisen eine vermehrte Enzymaktivität der TPH-Isoform 2 und somit höhere basale Serotoninkonzentrationen im Kolon auf als BALB/c-Mäuse ¹⁴⁶. Julio-Pieper und Kollegen konnten zeigen, dass nur bei C57BL/6-Mäusen eine stressbedingte Erhöhung der Serotoninspiegel im Kolon auftritt ¹⁴⁶. Es kann vermutet werden, dass auch im chronischen Stressmodell ein Anstieg der lokalen Serotoninspiegel bei C57BL/6-Mäusen stattfindet, welcher die Darmmotilität dieser Mäuse stimuliert und zu einer vermehrten Defäkation führt.

Bezüglich des Angstverhaltens und des stressbedingten Verhaltens wurden auch von Tannenbaum und Anisman stammspezifische Unterschiede beobachtet ^{147, 148}. Die eher neophoben BALB/c-Mäuse zeigten z. B. ein ausgeprägteres Angstverhalten in „open-field“-Untersuchungen ¹⁴⁹. Damit einhergehend konnte in den Gehirnen von BALB/c-Mäusen eine geringere Dichte an Benzodiazepinrezeptoren nachgewiesen werden ^{150, 151}. In der Amygdala, einer Region, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Angst sowie bei der Kontrolle des allgemeinen Aktivierungszustandes spielt, wurde bei C57BL/6-Mäusen eine fünffach höhere Anzahl der Benzodiazepinrezeptoren festgestellt als bei BALB/c-Mäusen ¹⁵². Da Benzodiazepinrezeptoragonisten über diese Rezeptoren angstlösende Effekte bewirken, könnten die Unterschiede im Angstverhalten damit erklärt werden.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das beobachtete Verhalten der gestressten C57BL/6-Mäuse ein Angstverhalten oder gar ein depressionsähnliches Verhalten überlagert. Strekalova und Mitarbeiter beschrieben eine durch chronische Stressoren hervorgerufene erhöhte Lokomotoraktivität bei C57BL/6-Mäusen ¹⁵³. Diese wurde jedoch in Abhängigkeit bestimmter Lichtverhältnisse, und zwar bei heller bis moderater

Beleuchtung, ausgelöst und konnte bei schwacher Beleuchtung nicht beobachtet werden ¹⁵³. In den hier durchgeführten Experimenten erfolgte die Immobilisation stets unter verminderter Beleuchtung (Abdeckung der Versuchsanordnung). Im Anschluss kamen die Tiere zurück in den Heimatkäfig und waren dort wieder dem Tageslicht ausgesetzt. Inwieweit die veränderten Lichtverhältnisse im Heimatkäfig einen Einfluss auf das bei C57BL/6-Mäusen beobachtete Erkundungsverhalten haben, wurde hier jedoch nicht weiter untersucht. Eine Maskierung eines depressionsähnlichen Verhaltens kann somit nicht ausgeschlossen werden.

In vielen Tierexperimenten wurde der Einfluss verschiedener Stressoren auf die Nahrungsaufnahme und das Gewicht untersucht. Milder Stress, wie z. B. kurzfristige Immobilisation, verursachte eine gesteigerte Nahrungsaufnahme bei Ratten ¹⁵⁴. Im Gegensatz dazu verminderte eine chronische Immobilisation ¹⁵⁵ oder ein länger andauernder akustischer Stress ¹⁵⁶ die Nahrungsaufnahme und führte zu Gewichtsverlust bei Ratten. In den vergleichenden Untersuchungen von BALB/c- und CBA-Mäusen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass erstere im Verlauf des chronischen Stressmodells trotz ausreichender Nahrungs- und Trinkwasserzufuhr Gewicht verloren, während das Gewicht der chronisch gestressten CBA-Mäuse konstant blieb, was für eine geringere Stressanfälligkeit dieses Mausstammes spricht ⁴⁶. Eine signifikante Verminderung des Gewichtes konnte bei chronisch gestressten BALB/c-Mäusen erneut nachgewiesen werden. Dass dieser Gewichtsverlust als Folge einer hyperkatabolen Stoffwechsellage durch stressbedingte neuroendokrine sowie metabolische Störungen auftritt, wurde bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt ³⁶. Bei gestressten C57BL/6-Mäusen war ähnlich wie bei chronisch gestressten CBA-Mäusen kein signifikanter Gewichtsunterschied zu den Kontrolltieren messbar.

In Untersuchungen von Schweizer und Mitarbeitern wurde das Gewicht von C57BL/6-Mäusen in einem Modell für chronischen milden Stress beurteilt. Unterstützend zu unseren Experimenten beeinflusste die Stressexposition das Gewicht nicht ¹⁴². Im Gegensatz zu vielen Experimenten mit Ratten und Mäusen konnte bei Hamstern eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und eine Zunahme von Gewicht und Fettgewebsmasse infolge von sozialem Stress und elektrischen Fußschocks nachgewiesen werden ¹⁵⁷.

C57BL/6-Mäuse sind bekannt für die Entwicklung einer Glukoseintoleranz sowie einer Insulinresistenz und neigen zu Adipositas^{158, 159}. Unter kohlenhydrat- und fettreicher Diät entwickeln diese Mäuse einen nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus sowie vermehrtes viszerales Fettgewebe¹⁶⁰. Die Anfälligkeit der C57BL/6-Mäuse für metabolische Störungen könnte durch ihre hohe Kortikosteronsensitivität bedingt sein³⁴. Möglicherweise kommt es bei gestressten C57BL/6-Mäusen durch eine chronische Aktivierung der HPA-Achse und nachfolgender Glukokortikoidausschüttung zu einer veränderten Zusammensetzung der Körpergewebe mit Zunahme des viszeralen Fettgewebes, ohne dass Gewicht verloren wird.

Im Unterschied zu unseren Ergebnissen wiesen Strekalova und Arbeitsgruppe nach chronischem Stress einen Gewichtsverlust bei C57BL/6-Mäusen nach¹⁶¹. In dieser Versuchsanordnung wurden die Tiere über einen längeren Zeitraum (drei bis vier Wochen) als in unserem Stressmodell (viereinhalb Tage) unterschiedlichen Stressoren, wie Immobilisation und Aufhängung am Schwanz, ausgesetzt¹⁶¹. Dass die Intensität des Stressors das Ausmaß des Gewichtsverlustes und die Verminderung der Nahrungszufuhr beeinflusst, wurde unter anderem von Martí und Arbeitsgruppe gezeigt¹⁶². Es ist anzunehmen, dass in den Experimenten von Strekalova und Arbeitsgruppe der stärkere Stressor bei den C57BL/6-Mäusen zu einem Gewichtsverlust führte. Ein weiterer Unterschied zu unseren Experimenten besteht darin, dass dort nur männliche Tiere untersucht wurden¹⁶¹. Dass Geschlechtsunterschiede eine große Rolle bezüglich der Stressanfälligkeit spielen, haben wir bereits in früheren Experimenten gezeigt⁴⁶.

Zu den bekannten Konsequenzen von Stress gehört die Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie der HPA-Achse. Aufgrund des ausgeprägteren Erkundungsverhaltens bei C57BL/6-Mäusen sollte die Frage nach einem stressbedingten gesteigerten Sympathikotonus geklärt werden. Hinweise hierfür geben neben der gesteigerten Aktivität möglicherweise die vermehrte Kot- und Urinabgabe von C57BL/6-Mäusen¹⁶³, wobei sich letztere jedoch erst im Verlauf des chronischen Stressmodells nachweisen ließen.

Erhöhte Adrenalin- und Noradrenalin Spiegel im Plasma infolge von starkem physischen Stress wurden im Plasma weiblicher C57BL/6-Mäuse von Marra

und Arbeitsgruppe nachgewiesen ⁵². In anderen Arbeitsgruppen konnte wiederum, als Zeichen einer Sympathikusaktivierung, ein vermehrter Verbrauch von Noradrenalin und Serotonin vor allem in BALB/c-Mäusen und nur abgeschwächt in C57BL/6-Mäusen nach akutem Stress nachgewiesen werden ^{147, 164}.

Bei den Untersuchungen von BALB/c- und CBA-Mäusen wurden die Plasmaspiegel von Noradrenalin nach der letzten Stresssitzung des chronischen Stressmodells bestimmt ⁴⁶. Ein Abfall der Noradrenalin Spiegel im Plasma chronisch gestresster BALB/c-Mäuse um bis zu 50 % im Vergleich zu den Kontrolltieren, wurde auf die stressbedingte Aktivierung des Sympathikus zurückgeführt ⁴⁶. Die Noradrenalin Spiegel der chronisch gestressten CBA-Mäuse unterschieden sich dagegen nicht von denen der Kontrolltiere ⁴⁶. Durch eine Messung der Plasmakatecholaminspiegel von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen direkt nach akuter Stressexposition konnten zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In weiterführenden Experimenten sollte jedoch eine Kinetik der Katecholaminkonzentration im Plasma beider Mausstämmen im akuten sowie im chronischen Stressmodell durchgeführt werden.

Als direkter Nachweis für eine Aktivierung der HPA-Achse gilt ein Anstieg der Glukokortikoide im Plasma. Dass die Basallevel von Kortikosteron in beiden Mausstämmen ähnlich sind, wurde durch andere Arbeitsgruppen bereits gezeigt ^{165, 166}. Sowohl im akuten als auch im chronischen Stressmodell wurde bei beiden Mausstämmen ein Anstieg der Kortikosteron Spiegel im Plasma gemessen. Damit konnten die Ergebnisse aus früheren Experimenten der Arbeitsgruppe für BALB/c-Mäuse reproduziert werden ⁴⁶. Ansteigende Kortikosteron Spiegel infolge Immobilisationsstress konnten Harizi und Arbeitsgruppe ebenfalls für BALB/c- und C57BL/6-Mäuse zeigen ³⁴. In den hier gezeigten Untersuchungen konnten jedoch nur in Einzelexperimenten signifikante Anstiege der Kortikosteronkonzentration in C57BL/6-Mäusen gemessen werden. Bei der Betrachtung der Kortikosteron Spiegel im Plasma der Kontrolltiere beider Mausstämmen ist auffällig, dass in einigen Experimenten eine große Varianz der Kortikosteronkonzentration innerhalb der Kontrollgruppe besteht. Bei einigen Kontrolltieren wurden höhere Kortikosteronkonzentrationen gemessen, als unter physiologischen Bedingungen zu erwarten wären. Trotz

der möglichst stressarmen Haltung der Kontrolltiere führt jeder Kontakt mit den Tieren, z. B. bei der Käfigreinigung, Futter- und Wassererneuerung, zu einer Aktivierung der HPA-Achse ^{32, 165}, welche wiederum einen Anstieg der Kortikosteronspiegel verursachen kann. Daneben kann das für die Narkose verwendete Ketamin eine ähnliche Erhöhung der Plasmakortikosteronspiegel bewirken wie eine pharmakologische Dosis ACTH ¹⁶⁷. Da auch bei den Kontrolltieren eine Ketaminnarkose durchgeführt wurde, bevor die Entnahme von Blut und Organen erfolgte, könnte dies die gemessenen Kortikosteronkonzentrationen im Plasma der ungestressten Tiere erklären. Hinzukommt, dass gerade bei Stressexperimenten die Erfahrung und Expertise des Versuchsleiters wichtig sind. Aufgrund einer begrenzten Anzahl von Experimenten, die genehmigt wurden, war es schwierig, mögliche methodische Schwächen vollständig zu beheben. In früheren Untersuchungen zur stressbedingten HPA-Achsenaktivierung in BALB/c-Mäusen, die von Frau Dr. C. Kiank durchgeführt wurden, variierten die Kortikosteronkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere nicht so erheblich, wie in diesen Experimenten.

Harizi und Mitarbeiter fanden neben dem stressbedingten Anstieg der Kortikosteronspiegel mausstammspezifische Unterschiede bezüglich der Intensität und Kinetik der HPA-Achsenfunktion ³⁴. BALB/c-Mäuse reagierten auf die Immobilisation mit einem stärkeren Kortikosteronanstieg als C57BL/6-Mäuse ³⁴. Während des Messzeitraumes von 90 Minuten wurden im Plasma der C57BL/6-Mäuse die höchsten Kortikosteronkonzentrationen zum Zeitpunkt 60 Minuten nachgewiesen ³⁴. Anschließend nahmen die Kortikosteronspiegel im Plasma der C57BL/6-Mäuse wieder ab ³⁴. Bei gestressten BALB/c-Mäusen konnte über den gesamten Zeitraum ein Anstieg der Plasmakortikosteronspiegel gemessen werden, mit der höchsten Konzentration nach 90 Minuten ³⁴. Da in unseren Experimenten erst nach der akuten Stressexposition, d. h. nach 120 Minuten, die Kortikosteronspiegel bestimmt werden, könnte bei den gestressten C57BL/6-Mäusen der Zeitpunkt der höchsten Plasmakonzentration des Kortikosterons schon vorbei sein und ein signifikanter Unterschied zu den ungestressten C57BL/6-Mäusen wäre somit möglicherweise zu diesem Zeitpunkt nicht darstellbar.

Zusätzlich zu den Kortikosteronkonzentrationen im Plasma wurden glukokortikoidvermittelte Veränderungen untersucht, die ebenfalls einen Hinweis für eine HPA-Achsenaktivierung geben können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die hämatologischen Parameter, wie Gesamtleukozytenzahlen, Lymphozyten- und Erythrozytenzahlen, direkt und sechs Stunden nach Beendigung der akuten Stressexposition bestimmt. Dabei wurde sowohl bei gestressten BALB/c-Mäusen als auch bei gestressten C57BL/6-Mäusen direkt im Anschluss an eine einzelne Stresssitzung eine signifikante Reduktion der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut nachgewiesen. Dass akuter Stress eine Reduktion der Leukozytenzahlen im peripheren Blut verursacht, zeigten unter anderem Dhabhar und Mitarbeiter^{2, 53}. Ein stressinduzierter Anstieg der Plasmakortikosteronspiegel ging in diesen Experimenten mit den verminderten Leukozyten- und Lymphozytenzahlen einher². Eine alleinige Kortikosterongabe bei Ratten führte zu einer ähnlichen Leukozytenumverteilung, wie sie durch Stressexposition hervorgerufen wird und bei Tieren, denen die Nebennieren entfernt wurden, waren die stressbedingten Änderungen der Leukozytenzahlen weniger stark ausgeprägt⁵³. Womit den Glukokortikoiden eine große Bedeutung bei den Veränderungen der Blutzellpopulationen im Stress zukommt. Zum Zeitpunkt sechs Stunden nach akuter Stressexposition befanden sich die Zellzahlen nur bei den BALB/c-Mäusen wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere. Somit kann angenommen werden, dass es sich bei der Leuko- und Lymphozytopenie um ein reversibles stressbedingtes Phänomen handelt, das auch schon durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnte². Durch die Umverteilung der Leukozyten aus dem peripheren Blut in andere Immunkompartimente soll eine effiziente Immunabwehr an möglichen Eintrittspforten für Erreger gewährleistet werden^{2, 53}.

Anders als bei den BALB/c-Mäusen waren die verminderten Leuko- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut akut gestresster C57BL/6-Mäuse nach sechs Stunden immer noch nachzuweisen, was auf eine länger andauernde Umverteilung der Leukozyten hinweist.

Neben Glukokortikoidrezeptoren besitzen Leukozyten auch Adrenorezeptoren. Über diese können die immunkompetenten Zellen durch Katecholamine

beeinflusst werden. So führt eine Verabreichung von Adrenalin oder Noradrenalin zu einem schnellen Anstieg der neutrophilen Granulozyten- und NK-Zellzahlen, wohingegen die Zellzahlen von B- und T-Lymphozyten vermindert werden⁵⁵. Reduzierte Lymphozytenzahlen im peripheren Blut nach Gabe von Adrenalin wurden ebenfalls durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen⁴⁹. In Untersuchungen von Marra und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Noradrenalin bei C57BL/6-Mäusen zu einem Anstieg der intestinalen Lymphozytenzahlen führte⁵², was auf eine Umverteilung in den Gastrointestinaltrakt auch unter stressreichen Bedingungen hindeutet. Sollte es bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen zu einer verstärkten Sympathikusaktivierung kommen, die zu einer vermehrten Freisetzung von Katecholaminen führt, könnte dies eine länger andauernde Umverteilung der Leukozyten bewirken und die anhaltende Leuko- und Lymphozytopenie im peripheren Blut sechs Stunden nach Stressende erklären. Zusätzlich könnte auch die vermehrte Kortikosteronsensitivität der C57BL/6-Mäuse eine verzögerte Rückkehr der Leukozyten ins periphere Blut bewirken. Die Kortikosteronkonzentrationen im Plasma gestresster C57BL/6-Mäuse waren sechs Stunden nach Beendigung der Stresssitzung noch immer leicht erhöht.

Im chronischen Stressmodell wurde bei beiden Mausstämmen ebenfalls eine Verminderung der Leuko- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut gemessen. Ob diese Zellzahlvermindierungen reversibel sind oder als Folge einer erhöhten Apoptoserate auftreten, konnte nicht abschließend geklärt werden, da die Blutzellpopulationen nur zu einem Zeitpunkt nach Beendigung des chronischen Stressmodells untersucht wurden. Allerdings konnte eine erhöhte Apoptoserate von T-Zellen in den Milzzellsuspensionen chronisch gestresster Tiere beider Mausstämmen nachgewiesen werden. Dieser programmierte Zelltod ist neben der Umverteilung der Leukozyten ein Hinweis für eine stressbedingte Aktivierung des neuroendokrinen Systems. Proapoptotische Wirkungen sind dabei sowohl für Glukokortikoide^{168, 169} als auch für Katecholamine^{170, 171} und proinflammatorische Zytokine⁷⁸ beschrieben worden.

Die Erythrozytopenie in chronisch gestressten C57BL/6-Mäusen könnte als Folge von Hypertension und Veränderungen der hämodynamischen

Verhältnisse zu erklären sein. Ähnliche Verminderungen der Erythrozytenzahlen wurden im Zusammenhang mit sozialem Stress und einer Milzvergrößerung von Cane und Turney beschrieben ^{172, 173}.

Eine stressbedingte Umverteilung immunkompetenter Zellen z. B. aus dem peripheren Blut in andere Immunkompartimente zum Schutz vor eindringenden Erregern wird durch eine veränderte Barrierefunktion ermöglicht und ist somit wahrscheinlich ein physiologischer Bestandteil der Stressbewältigung. Beobachtet wurde dies z. B. im Bereich der Bluthirnschranke und am Darmepithel ¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. In verschiedenen Untersuchungen konnten vor allem das CRH, Mastzellen und cholinerge Neurone als Mediatoren der stressbedingten Funktionsstörungen der Darmschleimhaut, die durch eine veränderte intestinale Sekretion und Permeabilität charakterisiert sind, nachgewiesen werden ^{74, 81, 178, 179}.

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnten sechs Stunden nach akutem Stress im Ileum von BALB/c-Mäusen strukturelle Veränderungen der Epithelbarriere einhergehend mit einer erhöhten Apoptoserate der intestinalen Epithelzellen nachgewiesen werden ¹⁸⁰. Weitere Untersuchungen zeigten, dass TNF einen wichtigen Mediator bei dieser stressbedingten Apoptoseinduktion darstellt, da eine Vorbehandlung der Mäuse mit anti-TNF-Antikörpern den Anteil der apoptotischen Zellen im Ileum reduzierte und auch die bakterielle Last in der Leber signifikant verminderte (unpubliziert). Andere in vitro Daten belegen, dass eine vermehrte TNF-Freisetzung zu einer erhöhten Apoptoserate intestinaler Epithelzellen führt ^{78, 181} und zusätzlich die Durchlässigkeit der Tight junctions erhöht ¹⁸², was schließlich die Darmbarriere beeinträchtigt. Wang und Mitarbeiter fanden heraus, dass IFN- γ und TNF synergistisch auf die Epithelzellen des Darms wirken, um die Permeabilität zu beeinflussen ¹⁸³. Ob akuter Stress in C57BL/6-Mäusen ebenfalls zu einem vermehrten Anteil apoptotischer intestinaler Epithelzellen führt, konnte aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht abschließend geklärt werden. Im Hinblick auf mögliche stammspezifische Unterschiede sollte der Darm aber in weiteren Experimenten, z. B. mittels HE-Färbung und TUNEL-Assay, auf stressbedingte morphologische Veränderungen untersucht werden. Auch die Beurteilung von Mastzellen als bedeutende Quelle für Mediatoren, die eine Epithelschädigung

hervorrufen können, wie z. B. TNF, Histamin, Prostaglandine und andere Zytokine, sowie deren Verteilung im Ileum wäre denkbar^{73, 184}.

Zu den möglichen Folgen einer Darmbarrierestörung gehört ein Übertritt von kommensalen Bakterien. Dieser Übertritt kann durch eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität erfolgen⁸⁸. Daneben erfolgt die Aufnahme luminaler Antigene und Bakterien jedoch auch über Paneth-Zellen in die intestinalen Krypten oder über das follikelassoziierte Epithel^{71, 82}.

Die bakterielle Translokation wurde durch Entnahme der mesenterialen Lymphknoten sechs Stunden nach Beendigung einer einzelnen Stresssitzung mit Hilfe von Anreicherungskulturen untersucht. Bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen wurden signifikant erhöhte Keimzahlen in den mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen. Daraus ist zu schließen, dass eine stressbedingte Darmbarrierestörung in beiden Mausstämmen zum Übertritt von kommensalen Bakterien geführt hat. Eine bakterielle Translokation aus dem Darm in inguinale sowie mesenteriale Lymphknoten nach wiederholtem psychischen Stress bei C57BL/6-Mäusen wurde auch in Untersuchungen von Bailey und Kollegen nachgewiesen⁶⁶. Mit der verwendeten Methode konnte die Translokation von vor allem Gram-positiven Bakterien wie Enterokokken und Streptokokken nachgewiesen werden. Dass Gram-positive Bakterien aufgrund ihres größeren Vorkommens im Ileum öfter translozieren als Gram-negative Erreger, ist beschrieben⁶⁵. In weiteren Untersuchungen könnte eine Überprüfung der bakteriellen Translokation durch eine andere Methode wie z. B. die Ausplattierung homogenisierter Organe stattfinden.

Zeitgleich zu der bakteriellen Translokation konnte in vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe eine vermehrte Expression vonIDO1-mRNA vor allem im Gehirn der akut gestressten BALB/c-Mäuse gezeigt werden. Eine Induktion der IDO1-Expression ist durch proinflammatorische Zytokine wie z. B. IFN- γ , IFN- α ^{185, 186}, synergistisch durch IL-1 oder TNF mit IFN- γ ¹⁸⁷, durch bakterielle Bestandteile wie LPS¹⁰⁴ sowie durch CTLA-4¹⁰⁶ möglich. Aber auch Stressoren wie Elektroschock oder Immobilisation können die IDO1 aktivieren^{86, 188}. Insofern wäre es möglich, dass LPS als Bestandteil von translozierenden Bakterien die vermehrte IDO1-mRNA-Expression nach akutem Stress verursacht. Daneben konnten Chen und Kollegen zeigen, dass

auch Zellwandbestandteile von endogenen Gram-positiven Bakterien eine Zytokinproduktion in menschlichen immunkompetenten Zellen induzieren können¹⁸⁹. Durch die freigesetzten Zytokine könnten auf diese Weise ebenfalls zentrale Stoffwechselprozesse, wie der Katecholamin- oder Indolaminstoffwechsel, beeinflusst werden¹⁹⁰.

Da bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen Hinweise für eine bakterielle Translokation gefunden wurden, sollte geklärt werden, ob auch bei diesem Mausstamm eine Aktivierung des Tryptophanabbaus entlang des Kynureninstoffwechselweges stattfindet. Dazu wurden direkt und sechs Stunden nach Beendigung des akuten Stressmodells die Konzentrationen von Tryptophan und seinen Metaboliten im Plasma bestimmt. Tryptophan war im Plasma der akut gestressten Mäuse nicht vermindert. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Plasmaspiegel für Tryptophan relativ hoch sind verglichen mit denen der Tryptophanmetabolite und dass somit zu Beginn des Tryptophanabbaus noch keine signifikante Verminderung von Tryptophan nachgewiesen werden kann. Direkt nach Stressende konnten jedoch Zeichen für einen aktivierten Tryptophanabbau entlang des Kynureninstoffwechselweges in beiden Mausstämmen gefunden werden. Im Plasma akut gestresster C57BL/6- und BALB/c-Mäuse wurden erhöhte Kynureninsäurespiegel nachgewiesen. Im zentralen Nervensystem besitzt dieser Tryptophanmetabolit zum einen neuroprotektive¹¹⁹ und antikonvulsive¹²⁰ Eigenschaften. Andererseits ist bekannt, dass Kynureninsäure auch bei der Entwicklung psychischer Störungen, wie Depression und Schizophrenie eine Rolle spielt¹⁹¹. Kynureninsäurekonzentrationen außerhalb des Gehirns wurden in einigen physiologischen Körperflüssigkeiten gefunden, wie z. B. im menschlichen Urin¹⁹² oder im Darm von Ratten¹⁹³. Turski und Mitarbeiter konnten geringe Mengen von Kynureninsäure aus pflanzlichen Nahrungsbestandteilen isolieren¹⁹⁴. Daneben sollen auch Bakterien wie *E. coli* den Tryptophanmetaboliten produzieren können¹⁹⁵. Somit stellt sich die Frage, ob die erhöhten Kynureninsäurekonzentrationen bei akut gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen möglicherweise durch translozierte Bakterien bedingt sein könnten. Für einen Tryptophanabbau würden jedoch die direkt nach Stressende verminderten Serotoninspiegel im Plasma von akut gestressten C57BL/6-Mäusen sprechen, da Tryptophan das Vorläufermolekül für die

Serotoninsynthese darstellt. Bei den akut gestressten BALB/c-Mäusen wurde zusätzlich zu den erhöhten Kynureninsäurespiegeln ein Anstieg der Kynureninkonzentration im Plasma gemessen, was auf einen stressbedingten Tryptophanabbau über den Kynureninweg hindeutet. In nachfolgenden Experimenten sollte die IDO1-mRNA-Expression im Gehirn von C57BL/6-Mäusen direkt nach akutem Stress untersucht sowie ein direkter Nachweis des aktiven IDO1-Proteins z. B. durch einen Western Blot unternommen werden.

Interessanterweise fanden sich sechs Stunden nach akuter Stressexposition nur noch bei BALB/c-Mäusen veränderte Konzentrationen der Tryptophanmetabolite. Die Konzentrationen von Hydroxytryptophan, einem Zwischenprodukt der Serotoninsynthese, und Serotonin waren im Plasma akut gestresster BALB/c-Mäuse vermindert. Bei C57BL/6-Mäusen befanden sich die Konzentrationen der Tryptophanmetabolite zu diesem Zeitpunkt wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere. Dass die Aktivierung des Kynureninstoffwechselweges bei akut gestressten BALB/c-Mäusen transient ist, konnte bereits gezeigt werden ¹⁸⁰. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann vermutet werden, dass die Homöostase des Tryptophanstoffwechsels bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen rascher wiederhergestellt wird. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, sollte in weiteren Untersuchungen eine Kinetik des Tryptophanstoffwechsels bei akut gestressten C57BL/6-Mäusen durchgeführt werden.

Anders als bei BALB/c-Mäusen konnten im chronischen Stressmodell bei C57BL/6-Mäusen keine Hinweise für einen aktivierten Kynureninstoffwechselweg gefunden werden. Aufgrund dessen könnte vermutet werden, dass chronisch gestresste C57BL/6-Mäuse keine Immunsuppression entwickeln. Dies müsste in weiteren Experimenten überprüft werden. Dazu könnten die *ex vivo* Zytokininduzierbarkeit von Milzzellen chronisch gestresster C57BL/6-Mäuse sowie verschiedene Infektionsmodelle untersucht werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mausstammspezifische Unterschiede bezüglich der Aktivierung des Kynureninstoffwechsels und der nachfolgenden Konsequenzen bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass das akute Stressmodell in beiden Mausstämmen eine Darmbarrierestörung mit erhöhter Permeabilität verursacht, da eine bakterielle Translokation in die mesenterialen

Lymphknoten von gestressten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nachgewiesen wurde. Die bei chronisch gestressten BALB/c-Mäusen nachgewiesene Immunsuppression sowie die Entwicklung des depressionsähnlichen Verhaltens werden auf diese stressbedingte Darmbarrierestörung mit nachfolgender bakterieller Translokation und systemischer IDO1-Aktivierung zurückgeführt⁹³. Aufgrund ihrer TH1-dominanten Immunantwort verfügen C57BL/6-Mäuse möglicherweise über effektivere lokale Abwehrmechanismen im Bereich des Darms, durch die eine stressbedingte bakterielle Translokation schneller kontrolliert werden kann. Das wiederum könnte zu einer geringeren systemischen IDO1-Induktion bei C57BL/6-Mäusen führen, was den kürzer andauernden Tryptophanabbau über den Kynureninweg erklären könnte.

In weiteren Untersuchungen sollten die Mechanismen, die zu einer stressbedingten IDO1-Aktivierung führen aufgeklärt und auf stammspezifische Unterschiede überprüft werden.

Mit den C57BL/6-Mäusen wurde ein weiterer Mausstamm im akuten und chronischen Stressmodell unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es konnte erneut gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund die Stressanfälligkeit beeinflusst.

In Bezug auf Patienten können somit verschiedene Stressbewältigungstypen erklärt werden. In Abhängigkeit der individuellen Ressourcen unterscheiden sich die stressbedingten Konsequenzen hinsichtlich der Gesundheit von Patient zu Patient. So werden z. B. bei einem Patienten durch Stress vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht, während ein anderer Patient eher psychische Störungen und eine Immunschwäche entwickelt. Für den klinischen Alltag könnte dies bedeuten, individuelle Therapiekonzepte für die Patienten zu entwickeln, um eine größtmögliche Stressreduktion zu erreichen und damit die Wiederherstellung der Gesundheit zu verbessern.

6. Zusammenfassung

1. Chronischer psychischer Stress, der durch die wiederholte Kombination von akustischem und Immobilisationsstress erzeugt wurde, führt bei BALB/c-Mäusen zu einer Immunsuppression. Im Verlauf der chronischen Stressbehandlung zeigen BALB/c-Mäuse außerdem ein reduziertes Erkundungsverhalten sowie verminderten Kontakt zu den Artgenossen, was einem depressionsähnlichen Verhalten entspricht. Die Immunsuppression und die Verhaltensänderungen werden auf eine stressbedingte Darmbarrierestörung mit bakterieller Translokation und systemischer IDO1-Aktivierung zurückgeführt.
2. Um zu prüfen, ob die beobachteten Veränderungen mausstammspezifische Stresseffekte darstellen, wurden C57BL/6- und BALB/c-Mäuse, die generelle Unterschiede in der Qualität ihrer Immunantwort aufweisen, in einer einzelnen Stresssituation (akutes Stressmodell) oder in neun aufeinanderfolgenden Stresssituationen (chronisches Stressmodell) verglichen.
3. Nach akuter Stressexposition kam es, ebenso wie bei BALB/c-Mäusen, bei C57BL/6-Mäusen zu einer bakteriellen Translokation in die mesenterialen Lymphknoten, womit auch bei C57BL/6-Mäusen eine stressbedingte Schädigung der Darmbarriere aufzutreten scheint.
4. Eine systemische IDO1-Aktivierung infolge bakterieller Translokation erfolgte im akuten Stressmodell unabhängig vom Mausstamm. Allerdings hielt der Tryptophanabbau entlang des Kynureninweges in C57BL/6-Mäusen kürzer an als in BALB/c-Mäusen. Im chronischen Stressmodell war nur bei BALB/c-Mäusen ein aktivierter Kynureninstoffwechsel messbar.
5. Da keine Hinweise auf einen aktivierten Tryptophanabbau in chronisch gestressten C57BL/6-Mäusen gefunden wurden, kann vermutet werden, dass diese Mäuse keine Immunsuppression entwickeln.
6. Desweiteren könnten damit die unterschiedlichen Verhaltensänderungen während chronischer Stressexposition erklärt werden. Die Entwicklung

eines depressionsähnlichen Verhaltens im Verlauf des chronischen Stressmodells wurde nur bei BALB/c-Mäusen aber nicht bei C57BL/6-Mäusen beobachtet. Bei chronisch gestressten C57BL/6-Mäusen wurde jedoch eine deutlich vermehrte Kot- und Urinabgabe nachgewiesen, was auf eine durch den Sympathikus getriebene Pathologie der Stressantwort bei diesen Mäusen hindeuten könnte.

7. Eine stressbedingte Aktivierung der HPA-Achse, gekennzeichnet durch ansteigende Plasmakortikosteronspiegel sowie durch eine periphere Leuko- und Lymphozytopenie, konnte bei beiden Mausstämmen sowohl im akuten als auch im chronischen Stressmodell nachgewiesen werden.
8. Während der akuten Stressantwort eine aktivierende Funktion bezüglich des Organismus zukommt, die meist keine gefährlichen Auswirkungen hinterlässt, kann eine chronische Stressexposition hingegen das Individuum schädigen. Dass sich dabei die stressbedingten Konsequenzen zwischen verschiedenen Individuen unterscheiden, konnte durch die vergleichenden Untersuchungen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen gezeigt werden.

V. Literaturverzeichnis

1. McEwen, B.S. & Seeman, T. Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 896, 30-47 (1999).
2. Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. & Spencer, R.L. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 154, 5511-27 (1995).
3. Selye, H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1, 1383-92 (1950).
4. Selye, H. [The stress syndrome]. *Kango Gijutsu* 11, 92-8 (1965).
5. Selye, H. The stress of life (McGraw-Hill, New York, 1976).
6. Kasprowicz, A.L., Manuck, S.B., Malkoff, S.B. & Krantz, D.S. Individual differences in behaviorally evoked cardiovascular response: temporal stability and hemodynamic patterning. *Psychophysiology* 27, 605-19 (1990).
7. Folkman S, L.R. in Psychological and biological approaches to emotion (ed. Stein N, L.B., Trabasso T) 313-329 (1990).
8. Dhabhar, F.S. & McEwen, B.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11, 286-306 (1997).
9. McEwen, B.S. & Lasley, E.N. The end of stress as we know it (Dana Press/Joseph Henry Press, Washington, D.C., 2002).
10. Henry, J.P., Stephens, P.M. & Santisteban, G.A. A model of psychosocial hypertension showing reversibility and progression of cardiovascular complications. *Circ Res* 36, 156-64 (1975).
11. Pickering, T.G. Mental stress as a causal factor in the development of hypertension and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 3, 249-54 (2001).
12. Alboni, P. & Alboni, M. [Psychosocial factors as predictors of atherosclerosis and cardiovascular events: contribution from animal models]. *G Ital Cardiol (Rome)* 7, 747-53 (2006).
13. Glaser, R. et al. Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. *Health Psychol* 12, 435-42 (1993).
14. Kiecolt-Glaser, J.K., McGuire, L., Robles, T.F. & Glaser, R. Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *J Consult Clin Psychol* 70, 537-47 (2002).
15. Sapolsky, R.M. Why zebras don't get ulcers : a guide to stress, stress-related diseases, and coping (W.H. Freeman, New York, 1994).
16. Bremner, J.D. Does Stress Damage the Brain?: Understanding Trauma-Related Disorders from a Mind-Body Perspective (W. W. Norton & Co, New York, 2002).
17. Kehlet, H. & Wilmore, D.W. Multimodal strategies to improve surgical outcome. *Am J Surg* 183, 630-41 (2002).
18. Wilmore, D.W. & Kehlet, H. Management of patients in fast track surgery. *Bmj* 322, 473-6 (2001).

19. Krohne, H.W. & Slangen, K.E. Influence of social support on adaptation to surgery. *Health Psychol* 24, 101-5 (2005).
20. Rowe, J.W. & Troen, B.R. Sympathetic nervous system and aging in man. *Endocr Rev* 1, 167-79 (1980).
21. Pacak, K., Palkovits, M., Kopin, I.J. & Goldstein, D.S. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16, 89-150 (1995).
22. Sanders, V.M. Interdisciplinary research: noradrenergic regulation of adaptive immunity. *Brain Behav Immun* 20, 1-8 (2006).
23. Kohm, A.P. & Sanders, V.M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev* 53, 487-525 (2001).
24. Sanders, V.M. & Straub, R.H. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 16, 290-332 (2002).
25. Panuncio, A.L., De La Pena, S., Gualco, G. & Reissenweber, N. Adrenergic innervation in reactive human lymph nodes. *J Anat* 194 (Pt 1), 143-6 (1999).
26. Mignini, F., Streccioni, V. & Amenta, F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol* 23, 1-25 (2003).
27. Tracey, K.J. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853-9 (2002).
28. Benarroch, E.E. The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc* 68, 988-1001 (1993).
29. Dhein, S., van Koppen, C.J. & Brodde, O.E. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol Res* 44, 161-82 (2001).
30. Beishuizen, A. & Thijs, L.G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res* 9, 3-24 (2003).
31. Watkins, L.R. et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett* 183, 27-31 (1995).
32. Lightman, S.L. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 20, 880-4 (2008).
33. Windle, R.J. et al. Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol* 13, 905-11 (2001).
34. Harizi, H., Homo-Delarche, F., Amrani, A., Coulaud, J. & Mormede, P. Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosenstivity. *J Neuroimmunol* 189, 59-68 (2007).
35. Chrousos, G.P. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2, S50-5 (2000).
36. Depke, M. et al. Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology* 149, 2714-23 (2008).

37. Gold, P.W., Goodwin, F.K. & Chrousos, G.P. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *N Engl J Med* 319, 413-20 (1988).
38. Gold, P.W., Goodwin, F.K. & Chrousos, G.P. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N Engl J Med* 319, 348-53 (1988).
39. de Kloet, E.R., Sibug, R.M., Helmerhorst, F.M. & Schmidt, M.V. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 271-81 (2005).
40. DeBattista, C. & Belanoff, J. The use of mifepristone in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Trends Endocrinol Metab* 17, 117-21 (2006).
41. Janeway, C. *Immunobiology : the immune system in health and disease* (Garland Science, New York, 2005).
42. Stojanovich, L. & Marisavljevich, D. Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 7, 209-13 (2008).
43. Teunis, M.A. et al. Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis at adult age. *J Neuroimmunol* 133, 30-8 (2002).
44. Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., Salzet, M. & Zasloff, M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 6, 558-64 (2005).
45. Dhabhar, F.S. 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 (2000).
46. Kiank, C. et al. Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun* 20, 359-68 (2006).
47. Ishigami, T. The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. *American Review of Tuberculosis* 2, 470-484 (1919).
48. Solomon, G.F. & Moos, R.H. The Relationship of Personality to the Presence of Rheumatoid Factor in Asymptomatic Relatives of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Psychosom Med* 27, 350-60 (1965).
49. Dhabhar, F.S., McEwen, B.S. Changes in blood leukocyte distribution: interactions between catecholamine and glucocorticoid hormones. *Neuroimmunomodulation* 6, 213 (1999).
50. Engler, H. et al. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *J Neuroimmunol* 156, 153-62 (2004).
51. Dhabhar, F.S., Satoskar, A.R., Bluethmann, H., David, J.R. & McEwen, B.S. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2846-51 (2000).
52. Marra, S., Burnett, M. & Hoffman-Goetz, L. Intravenous catecholamine administration affects mouse intestinal lymphocyte number and apoptosis. *J Neuroimmunol* 158, 76-85 (2005).
53. Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. & Spencer, R.L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol* 157, 1638-44 (1996).

54. Sprent, J. & Tough, D.F. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 265, 1395-400 (1994).
55. Benschop, R.J., Rodriguez-Feuerhahn, M. & Schedlowski, M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun* 10, 77-91 (1996).
56. Sternberg, E.M. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol* 169, 429-35 (2001).
57. Elenkov, I.J., Papanicolaou, D.A., Wilder, R.L. & Chrousos, G.P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 108, 374-81 (1996).
58. Agarwal, S.K. & Marshall, G.D., Jr. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 21, 147-55 (2001).
59. Marshall, G.D., Jr. et al. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun* 12, 297-307 (1998).
60. Li, J. et al. Effects of chronic stress and interleukin-10 gene polymorphisms on antibody response to tetanus vaccine in family caregivers of patients with Alzheimer's disease. *Psychosom Med* 69, 551-9 (2007).
61. Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R., Gravenstein, S., Malarkey, W.B. & Sheridan, J. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3043-7 (1996).
62. Glaser, R. & Kiecolt-Glaser, J.K. Chronic stress modulates the virus-specific immune response to latent herpes simplex virus type 1. *Ann Behav Med* 19, 78-82 (1997).
63. Glaser, R.K.-G., JK. in Herpesvirus infections (ed. Glaser, R.J., J.) 245-270 (Dekker, New York, 1994).
64. Kiank, C., Daeschlein, G. & Schuett, C. Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice. *Brain Behav Immun* 22, 1173-7 (2008).
65. Ando, T., Brown, R.F., Berg, R.D. & Dunn, A.J. Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R2164-72 (2000).
66. Bailey, M.T., Engler, H. & Sheridan, J.F. Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 171, 29-37 (2006).
67. Gritsenko, V.A., Brudastov lu, A., Zhurlov, O.S. & Chertkobv, K.L. [The properties of Escherichia isolated from the bodies of mice in bacterial translocation after immobilization stress]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 37-41 (2000).
68. Dunn, A.J., Ando, T., Brown, R.F. & Berg, R.D. HPA axis activation and neurochemical responses to bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 992, 21-9 (2003).
69. Soderholm, J.D. et al. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123, 1099-108 (2002).
70. Meddings, J.B. & Swain, M.G. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119, 1019-28 (2000).

71. Velin, A.K., Ericson, A.C., Braaf, Y., Wallon, C. & Soderholm, J.D. Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut* 53, 494-500 (2004).
72. Madara JL, T.J. in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. (ed. LR, J.) 1577-1622 (Walsh JH, New York, 1994).
73. Santos, J., Yang, P.C., Soderholm, J.D., Benjamin, M. & Perdue, M.H. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 48, 630-6 (2001).
74. Castagliuolo, I. et al. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 271, G884-92 (1996).
75. Shanahan, F., Denburg, J.A., Fox, J., Bienenstock, J. & Befus, D. Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* 135, 1331-7 (1985).
76. Bani-Sacchi, T. et al. The release of histamine by parasympathetic stimulation in guinea-pig auricle and rat ileum. *J Physiol* 371, 29-43 (1986).
77. Tang, C.W., Lan, C. & Liu, R. Increased activity of the intestinal mucosal mast cells in rats with multiple organ failure. *Chin J Dig Dis* 5, 81-6 (2004).
78. Diebel, L.N., Liberati, D.M., Baylor, A.E., 3rd, Brown, W.J. & Diglio, C.A. The pivotal role of tumor necrosis factor-alpha in signaling apoptosis in intestinal epithelial cells under shock conditions. *J Trauma* 58, 995-1001 (2005).
79. Fukuzuka, K. et al. Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury. *J Trauma* 49, 710-6 (2000).
80. Santos, J., Saunders, P.R., Yates, D., Benjamin, M. & Perdue, M.H. Peripheral corticotropin releasing-hormone increases colonic permeability and ionic secretion through nicotinic pathways and mast cells. *Gastroenterology* 114, A413 (1998).
81. Saunders, P.R., Hanssen, N.P. & Perdue, M.H. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol* 273, G486-90 (1997).
82. Kiliaan, A.J. et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 275, G1037-44 (1998).
83. Mertz, H. Role of the brain and sensory pathways in gastrointestinal sensory disorders in humans. *Gut* 51 Suppl 1, i29-33 (2002).
84. Chang, J.X. et al. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroenterol* 11, 5485-91 (2005).
85. Trampuz, A., Zimmerli, W. Pathogenese und Therapie der Sepsis. *Schweiz Med Forum* 35, 811-818 (2003).
86. Dunn, A.J. Stress-related changes in cerebral catecholamine and indoleamine metabolism: lack of effect of adrenalectomy and corticosterone. *J Neurochem* 51, 406-12 (1988).
87. Ferrier, L. et al. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125, 795-804 (2003).
88. Demaude, J., Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L. & Bueno, L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55, 655-61 (2006).

89. Lyte, M. et al. Norepinephrine induced growth and expression of virulence associated factors in enterotoxigenic and enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 412, 331-9 (1997).
90. Freestone, P.P. et al. Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. *Shock* 18, 465-70 (2002).
91. Russo, S. et al. Tryptophan as a link between psychopathology and somatic states. *Psychosom Med* 65, 665-71 (2003).
92. Taylor, M.W. & Feng, G.S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *Faseb J* 5, 2516-22 (1991).
93. Kiank, C., Zeden, J-P., Drude, S., Domanska, G., Fusch, G., Otten, W., Schuett, C. Psychological Stress-Induced, IDO1-Dependent Tryptophan Catabolism: Implications on Immunosuppression in Mice and Humans. *PLoS ONE* 5(7): e11825. doi:10.1371/journal.pone.0011825 (2010).
94. Rafice, S.A., Chauhan, N., Efimov, I., Basran, J. & Raven, E.L. Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans* 37, 408-12 (2009).
95. Stone, T.W. & Darlington, L.G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609-20 (2002).
96. Grohmann, U., Fallarino, F. & Puccetti, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24, 242-8 (2003).
97. Mellor, A.L. & Munn, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-74 (2004).
98. Ishiguro, I., Naito, J., Saito, K. & Nagamura, Y. Skin L-tryptophan-2,3-dioxygenase and rat hair growth. *FEBS Lett* 329, 178-82 (1993).
99. Haber, R., Bessette, D., Hulihan-Giblin, B., Durcan, M.J. & Goldman, D. Identification of tryptophan 2,3-dioxygenase RNA in rodent brain. *J Neurochem* 60, 1159-62 (1993).
100. Bender, D.A. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med* 6, 101-97 (1983).
101. Maes, M. et al. Suppressant effects of dexamethasone on the availability of plasma L-tryptophan and tyrosine in healthy controls and in depressed patients. *Acta Psychiatr Scand* 81, 19-23 (1990).
102. Mellor, A.L. & Munn, D.H. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 170, 5809-13 (2003).
103. Wirleitner, B., Neurauter, G., Schrocksnadel, K., Frick, B. & Fuchs, D. Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem* 10, 1581-91 (2003).
104. O'Connor, J.C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14, 511-22 (2009).
105. Schrocksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C. & Fuchs, D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta* 364, 82-90 (2006).
106. Belladonna, M.L. et al. Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* 84, S17-20 (2007).

107. O'Connor, J.C. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci* 29, 4200-9 (2009).
108. Munn, D.H. et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189, 1363-72 (1999).
109. MacKenzie, C.R., Heseler, K., Muller, A. & Daubener, W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab* 8, 237-44 (2007).
110. Fallarino, F. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9, 1069-77 (2002).
111. Chen, W., Liang, X., Peterson, A.J., Munn, D.H. & Blazar, B.R. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 181, 5396-404 (2008).
112. Galarraga, E., Surmeier, D.J. & Kitai, S.T. Quinolinic acid and kainate neurotoxicity in neostriatal cultures is potentiated by co-culturing with neocortical neurons. *Brain Res* 512, 269-76 (1990).
113. Khaspekov, L., Kida, E., Victorov, I. & Mossakowski, M.J. Neurotoxic effect induced by quinolinic acid in dissociated cell culture of mouse hippocampus. *J Neurosci Res* 22, 150-7 (1989).
114. Miura, H. et al. A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. *Stress* 11, 198-209 (2008).
115. Rios, C. & Santamaria, A. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* 16, 1139-43 (1991).
116. Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H. & Katsuki, H. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12553-8 (1996).
117. Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H. & Katsuki, H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem* 70, 299-307 (1998).
118. Guidetti, P., Amori, L., Sapko, M.T., Okuno, E. & Schwarcz, R. Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain. *J Neurochem* 102, 103-11 (2007).
119. Turski, W.A. et al. Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. *Brain Res* 454, 164-9 (1988).
120. Wejksza, K., Rzeski, W. & Turski, W.A. Kynurenic acid protects against the homocysteine-induced impairment of endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61, 751-6 (2009).
121. Varga, G. et al. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 22, 217-25, e68.
122. Barry, S., Clarke, G., Scully, P. & Dinan, T.G. Kynurenine pathway in psychosis: evidence of increased tryptophan degradation. *J Psychopharmacol* 23, 287-94 (2009).
123. Myint, A.M. et al. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. *J Affect Disord* 98, 143-51 (2007).

124. Hwu, P. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164, 3596-9 (2000).
125. Barabino, S., Rolando, M., Chen, L. & Dana, M.R. Exposure to a dry environment induces strain-specific responses in mice. *Exp Eye Res* 84, 973-7 (2007).
126. Guinazu, N. et al. Immune response to a major Trypanosoma cruzi antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes Infect* 6, 1250-8 (2004).
127. Babay, B.E. et al. Inbred strains derived from feral mice reveal new pathogenic mechanisms of experimental leishmaniasis due to Leishmania major. *Infect Immun* 72, 4603-11 (2004).
128. Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K. & Matsukawa, A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 22, 460-6 (2004).
129. Kiank, C., Voss, S., Starke, A., Zeden, J., Domanska, G., et al. Proinflammatory cytokines mediate acute stress-induced loss of intestinal barrier function in the terminal ileum which enhances tryptophan catabolism in BALB/C mice. *Brain Behav Immun* 23, S42-S43 (2009).
130. Nikulina, E.M., Skrinkskaya, J.A. & Popova, N.K. Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 105, 525-9 (1991).
131. Bindra, D. & Thompson, W.R. An evaluation of defecation and urination as measures of fearfulness. *J Comp Physiol Psychol* 46, 43-5 (1953).
132. Nishina, P.M. et al. Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids* 28, 599-605 (1993).
133. Huber, S.A., Sakkinen, P., David, C., Newell, M.K. & Tracy, R.P. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation* 103, 2610-6 (2001).
134. Kennedy, B.P. et al. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 270, 22378-85 (1995).
135. Qiu, B.S., Vallance, B.A., Blennerhassett, P.A. & Collins, S.M. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 5, 1178-82 (1999).
136. Nagy, K., Takats, Z., Pollreisz, F., Szabo, T. & Vekey, K. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 983-90 (2003).
137. WHO. Mental health in the WHO European Region. *Fact sheet EURO/03/03* (2003).
138. Godbout, J.P. & Glaser, R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 421-7 (2006).
139. Levenstein, S. et al. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 95, 1213-20 (2000).
140. Takagi, K. et al. Preoperative immunosuppression: its relationship with high morbidity and mortality in patients receiving thoracic esophagectomy. *Nutrition* 17, 13-7 (2001).
141. Ladd, C.O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122, 81-103 (2000).

142. Schweizer, M.C., Henniger, M.S. & Sillaber, I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One* 4, e4326 (2009).
143. Makino J, K.K., Maes FW. Temporal structure of open-field behavior in inbred strains of mice. *Jpn Psychol Res* 33, 145-52 (1991).
144. Porsolt, R.D., Bertin, A. & Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-36 (1977).
145. Petit-Demouliere, B., Chenu, F. & Bourin, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177, 245-55 (2005).
146. Julio-Pieper, M. Strain-specific alterations in colon 5-HT levels correlate to defecation responses in chronically stressed mice. *7th World Congress on Stress. In Leiden, The Netherlands 25 to 27 August, 2010.*
147. Tannenbaum, B. & Anisman, H. Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. *Biol Psychiatry* 53, 292-303 (2003).
148. Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T. & Merali, Z. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. *Behav Neurosci* 115, 443-54 (2001).
149. Griebel, G., Belzung, C., Misslin, R. & Vogel, E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol* 4, 637-644 (1993).
150. Robertson, H.A. Benzodiazepine receptors in "emotional" and "non-emotional" mice; comparison of four strains. *Eur J Pharmacol* 56, 163-6 (1979).
151. Caldji, C., Diorio, J., Anisman, H. & Meaney, M.J. Maternal behavior regulates benzodiazepine/GABAA receptor subunit expression in brain regions associated with fear in BALB/c and C57BL/6 mice. *Neuropsychopharmacology* 29, 1344-52 (2004).
152. Tang, X., Yang, L., Fishback, N.F. & Sanford, L.D. Differential effects of lorazepam on sleep and activity in C57BL/6J and BALB/cJ strain mice. *J Sleep Res* 18, 365-73 (2009).
153. Strekalova, T., Spanagel, R., Dolgov, O. & Bartsch, D. Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol* 16, 171-80 (2005).
154. Badiani, A., Jakob, A., Rodaros, D. & Stewart, J. Sensitization of stress-induced feeding in rats repeatedly exposed to brief restraint: the role of corticosterone. *Brain Res* 710, 35-44 (1996).
155. Harris, R.B., Palmondon, J., Leshin, S., Flatt, W.P. & Richard, D. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav* 49, 615-25 (2006).
156. Alario, P., Gamallo, A., Beato, M.J. & Trancho, G. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 40, 29-32 (1987).
157. Foster, M.T., Solomon, M.B., Huhman, K.L. & Bartness, T.J. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R1284-93 (2006).
158. Michel, C., Duclos, M., Cabanac, M. & Richard, D. Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Horm Behav* 48, 172-9 (2005).

159. Alexander, J., Chang, G.Q., Dourmashkin, J.T. & Leibowitz, S.F. Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains. *Int J Obes (Lond)* 30, 50-9 (2006).
160. Rebuffe-Scrive, M., Surwit, R., Feinglos, M., Kuhn, C. & Rodin, J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 42, 1405-9 (1993).
161. Strelakova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A. & Gass, P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29, 2007-17 (2004).
162. Marti, O., Marti, J. & Armario, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55, 747-53 (1994).
163. Choudhury, B.K., Shi, X.Z. & Sarna, S.K. Norepinephrine mediates the transcriptional effects of heterotypic chronic stress on colonic motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G1238-47 (2009).
164. Roy, V., Merali, Z., Poulter, M.O. & Anisman, H. Anxiety responses, plasma corticosterone and central monoamine variations elicited by stressors in reactive and nonreactive mice and their reciprocal F1 hybrids. *Behav Brain Res* 185, 49-58 (2007).
165. Shanks, N., Griffiths, J., Zalcman, S., Zacharko, R.M. & Anisman, H. Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 36, 515-9 (1990).
166. Anisman, H., Lacosta, S., Kent, P., McIntyre, D.C. & Merali, Z. Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, ACTH and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. *Stress* 2, 209-20 (1998).
167. Fahringer, E.E., Foley, E.L. & Redgate, E.S. Pituitary adrenal response to ketamine and the inhibition of the response by catecholaminergic blockade. *Neuroendocrinology* 14, 151-64 (1974).
168. Cohen, J.J. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin Immunol* 4, 363-9 (1992).
169. Schmidt, M. et al. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol* 163, 3484-90 (1999).
170. Stevenson, J.R. et al. Prolonged alpha-adrenergic stimulation causes changes in leukocyte distribution and lymphocyte apoptosis in the rat. *J Neuroimmunol* 120, 50-7 (2001).
171. Oberbeck, R. et al. Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Neuroimmunomodulation* 11, 214-23 (2004).
172. Cane, L.S., Hilton, F.K., Gray, R.D. & Harris, B.W. Further evidence for behaviorally induced hypoxic conditions in subordinate mice. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 79, 695-9 (1984).
173. Turney, T.H. & Harmsen, A.G. Splenomegaly and other hematological parameters in the socially dominant mouse. *Physiol Behav* 33, 559-62 (1984).
174. Esposito, P. et al. Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 888, 117-127 (2001).
175. Esposito, P. et al. Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 1061-6 (2002).

176. Collins, S.M. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G315-8 (2001).
177. Saunders, P.R., Kosecka, U., McKay, D.M. & Perdue, M.H. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol* 267, G794-9 (1994).
178. Castagliuolo, I. et al. Colonic mucin release in response to immobilization stress is mast cell dependent. *Am J Physiol* 274, G1094-1100 (1998).
179. Barreau, F. et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* 580, 347-56 (2007).
180. Kiank, C. Immun- und verhaltensmodulatorische Effekte von psychischem Stress. *Doktorarbeit*, 1-156 (2006).
181. Gitter, A.H., Bendfeldt, K., Schulzke, J.D. & Fromm, M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb J* 14, 1749-53 (2000).
182. Ma, T.Y. et al. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G367-76 (2004).
183. Wang, F. et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology* 131, 1153-63 (2006).
184. Bischoff, S.C. et al. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 44, 643-52 (1999).
185. Fujigaki, S. et al. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. *Eur J Immunol* 31, 2313-8 (2001).
186. Pemberton, L.A., Kerr, S.J., Smythe, G. & Brew, B.J. Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-gamma, TNF-alpha, and IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 17, 589-95 (1997).
187. Babcock, T.A. & Carlin, J.M. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 12, 588-94 (2000).
188. Dunn, A.J. Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. *Life Sci* 42, 1847-53 (1988).
189. Chen, T., Isomaki, P., Rimpilainen, M. & Toivanen, P. Human cytokine responses induced by gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota. *Clin Exp Immunol* 118, 261-7 (1999).
190. Dunn, A.J., Wang, J. & Ando, T. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol* 461, 117-27 (1999).
191. Müller, N. & Schwarz, M.J. Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders. *Expert Rev Neurother* 6, 1017-38 (2006).
192. Milart, P. & Sikorski, R. [Kynurenic acid concentration in blood and urine during normal pregnancy]. *Ginekol Pol* 69, 968-73 (1998).

193. Kuc, D., Zgrajka, W., Parada-Turska, J., Urbanik-Sypniewska, T. & Turski, W.A. Micromolar concentration of kynurenic acid in rat small intestine. *Amino Acids* 35, 503-5 (2008).
194. Turski, M.P., Turska, M., Zgrajka, W., Kuc, D. & Turski, W.A. Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids* 36, 75-80 (2009).
195. Kuc, D. et al. Kynurenic acid in human saliva--does it influence oral microflora? *Pharmacol Rep* 58, 393-8 (2006).

VI. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

VII. Lebenslauf

Anne Baumgart
Fischstraße 12
17489 Greifswald
Tel.: 0049-(0)3834-254251
e-mail: anne_baumgart@hotmail.de

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 09.05.1984
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Eva und Hans-Jürgen Baumgart

Schulbildung

1990-1996 Besuch der Paul-und-Charlotte-Kniese-Grundschule, Berlin-Lichtenberg
1996-2003 Besuch des Hans-und-Hilde-Coppi-Gymnasiums, Berlin-Karlshorst
Juni 2003 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Studium

Oktober 2003 Beginn des Studiums der Medizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
September 2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2005 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
November 2006 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Greifswald, Förderung durch das Graduiertenkolleg 840 der Universität Greifswald
Februar 2009 Beginn des praktischen Jahres (PJ)
Mai 2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich bei der Erstellung der Doktorarbeit unterstützt haben:

Mein Dank geht an Frau Prof. Dr. Christine Schütt, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit im Institut für Immunologie anfertigen zu können. Ich danke ihr für die Betreuung und ihre kritischen und hilfreichen Hinweise.

Ich danke dem DFG-Graduiertenkolleg 840 „Host-pathogen interactions in generalized bacterial infections“ für die finanzielle Unterstützung, die die Durchführung des Projektes ermöglichte. Besonders danken möchte ich Frau Prof. Barbara Bröker und Susanne Kühl, die die Zusammenarbeit im Graduiertenkolleg ermöglichten.

Ich danke Frau Dr. Cornelia Kiank für die Hilfestellungen beim Erlernen der Methoden, für ihre stete Diskussionsbereitschaft und für ihre Anregungen.

Bei Grazyna Domanska bedanke ich mich für die Probenpräparation zur Bestimmung der Konzentrationen von Tryptophan und den Tryptophanmetaboliten. Ich danke ihr für ihre Unterstützung, ihre Anregungen und die entspannte Zusammenarbeit.

Ich danke Kathleen Spring, Sylvia Voß, Dominique Muschter, Solveig Drude, Annett Geißler, Jakob Olfe und Felix Schwenteit für die angenehme Atmosphäre im Labor.

Dank an die Abteilung Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin, besonders Dr. Gerhard Fusch, für die Analyse der Tryptophanmetaboliten im Tandem-Massenspektrometer.

Ich bedanke mich bei Charlotte Braeuer für ihre Hilfe bei der Formatierung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium und auch diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Ich danke meinen Eltern und Großeltern, meinem Bruder und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.