

Aus der Klinik für Anaesthesiologie

LMU-Klinikum

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Der Einfluss allostatischer Last auf die Regulation der innaten und adaptiven
Immunantwort beim Menschen**

Kumulative Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. med. Judith-Irina Carola Buchheim

(2023)

"We do not realize what we have on Earth until we leave it."

Jim Lovell, Apollo 13.

Inhaltsverzeichnis

1	Hintergrund.....	2
1.1	Konzepte stressbedingter, pathophysiologischer Anpassung	2
1.2	Modulation des Immunsystems durch neurobiologische Stressantwortsysteme	4
1.3	Stressforschung auf der Erde und im Weltraum	6
2	Fragestellung.....	8
3	Ergebnisse	9
3.1	In vitro Untersuchungen zur Zytotoxizität, Phagozytose und Zytokinausschüttung.....	9
3.1.1	Noradrenalin reguliert die stimulierte Radikalproduktion über β -AR.....	10
3.1.2	Einfluss des Endocannabinoidsystems auf Phagozytose und die Zytokinantwort	11
3.2	Veränderungen des Transkriptoms während 12-monatiger Isolation in der Antarktis.....	14
3.2.1	Datenerhebung und Workflow	14
3.2.2	Inhibierung zentraler Immunfunktionen während und nach der Isolation.....	15
3.2.3	Expressionsanalyse der Signalwege zeigt Anfälligkeit für Virusinfektionen.....	17
3.2.4	Limitationen und Ausblick.....	19
3.3	Studien an Astronauten während Langzeitmissionen auf der ISS	19
3.3.1	Langzeitmissionen führen zu einem reversiblen „Entzündungsaltern“.....	20
3.3.1.1	Erhebung des Stressniveaus	20
3.3.1.2	Effekte der Langzeitmission auf die angeborene Immunität.....	21
3.3.1.3	Veränderungen in der adaptiven Immunität.....	22
3.3.2	Veränderungen in der humoralen Immunität	24
3.3.2.1	Sequenzierungsdaten und Analyseworkflow.....	25
3.3.2.2	Untersuchungen zur B-Zellreifung	25
3.3.2.3	Unterschiede im IgM-Repertoire bestehen bereits vor der Mission.....	26
3.3.2.4	Individuelle Immunmodulation durch erhöhte Stressexposition	27
3.3.3	Veränderungen bekannter Biomarker für Gehirnverletzungen und -degeneration nach Langzeitmissionen.....	30
4	Zusammenfassung	33
5	Literaturverzeichnis	35
6	Themenrelevante Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift.....	42
7	Danksagung.....	43

1 Hintergrund

1.1 Konzepte stressbedingter, pathophysiologischer Anpassung

Alle biologischen Systeme, von der Zelle zum höher entwickelten, mehrzelligen Organismus, streben nach der Aufrechterhaltung eines stabilen, inneren Gleichgewichts. Der Physiologe Claude Bernard beschrieb diesen Zustand 1846 als *milieu intérieur*¹. Walter Cannon griff den Begriff auf und prägte darauf basierend das Konzept der Homöostase.² Vereinfacht betrachtet besteht Homöostase in einem System, wenn eine über einen definierten Zeitraum variierte Inputvariable einen annähernd konstanten Output liefert.³

Im menschlichen Körper unterliegen zentrale, lebenswichtige Funktionen wie zum Beispiel der pH-Wert, der Blutdruck oder die Körpertemperatur einer sehr engen homöostatischen Regulation. Die lernfähige Selbstregulation ist dabei ein zentrales Funktionsprinzip. Das bedeutet, dass homöostatische Systeme durch positive oder negative Rückkopplung (*feedback loop*) Soll-Ist-Abweichungen erkennen und autonom regulieren. Zudem tragen Erfahrung, Prägung und/oder ein erlerntes Verhalten (Konditionierung) dazu bei, dass ein Organismus Körperfunktionen der zu erwartenden Situation auch antizipatorisch (*feedforward*-Regulation) anpassen kann.⁴ Wenn ein Stimulus jedoch einen Schwellenwert überschreitet, kann die Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden und es müssen Anpassungsvorgänge stattfinden um zu überleben. Walter Cannon beschrieb 1915 die Akutreaktion eines Organismus auf eine Bedrohung, das überlebenswichtige Kampf- oder Fluchtverhalten (*fight- or flight-response*)⁵. Dabei steuern die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin des autonomen Nervensystems (ANS) das programmierte Verhalten (Aggression/Konfrontation oder Flucht). Das sympathikoadrenerge System (SAS) vermittelt u.a. eine Mydriasis, die Steigerung des Herzzeitvolumens, des Blutdruckes und der Atemfrequenz sowie eine Bereitstellung von Glucose. Die Effekte einer chronischen Exposition mit einem überschwelligem Stimulus waren jedoch noch nicht beschrieben.

1936 publizierte Hans Selye im Journal *Nature* das allgemeine Anpassungssyndrom (*general adaptation syndrome*)⁶. Er zeigte, dass ein Organismus nach der Exposition mit einem chronischen, überschwelligem Reiz unerheblich welcher Art (physikalisch, chemisch oder biologisch) drei Phasen durchläuft. Nach der Akutreaktion zeigte sich nach 6-48 Stunden eine Phase der Anspannung, die u.a. den Verlust von Körpertemperatur, Fettgewebe und Muskeltonus, sowie eine Reduktion der chromaffinen Zellen der Nebenniere und Größenabnahme wichtiger lymphatischer Organe beinhaltet. Zeitgleich entstehen die ersten Ulcera im Gastrointestinaltrakt. In der zweiten Phase nach 48 Stunden werden histopathologische Veränderungen der Nebennieren, Hypophyse und Schilddrüse sichtbar, die die endokrine Anpassung zugunsten eines kortikotropen (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse) und thyreotropen (Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse) Regelkreises deutlich macht. Es entsteht im Verlauf die Widerstandsphase, bei der sich die Organmorphologie und -funktion wieder nahezu normalisieren. Hält dieser Zustand jedoch weiter an, tritt nach ca. ein bis drei Monaten, je nach Intensität und Schädigungspotential des Stimulus, die Erschöpfungsphase ein. Der Organismus verliert seine Widerstandsfähigkeit (*Resistance*) und zeigt wiederum die gleichen organomorphologischen Veränderungen, die schließlich zum Tod des Individuums führen können.^{6,7}

Dieses Syndrom nannte er Stress, erkannte dabei als Erster die zentrale Rolle der Kortikoide, deren Nomenklatur er entscheidend prägte,^{8,9} und begründete damit die moderne Stressforschung.¹⁰ Der aus der Materialphysik entlehnte Begriff *Stress* beschreibt die Kraft, die auf ein Material einwirkt und zu einer passageren oder permanenten Deformation (*strain*) als Reaktion führt. Mit Stress

bezeichnete Selye jedoch den beobachteten, immer wieder gleichen Symptomkomplex, der durch qualitativ unterschiedliche Reize auftrat. So verschwammen Ursache und Wirkung zu einem Oberbegriff „Stress“, wofür Selye im Verlauf Kritik erntete und er in Folge die auslösende Kraft als Stressor bezeichnete.¹¹ Dennoch ist diese Ungenauigkeit sicher auch einer der Gründe dafür, dass es bis heute keine allgemein gültige Definition des Begriffes Stress gibt.

Stress ist jedoch nicht nur als etwas Negatives zu werten. Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass kurzzeitige Stressphasen die allgemeine Leistungsfähigkeit und Immunität sogar verbessern können.¹²⁻¹⁴ Ob Stress als gut oder schlecht interpretiert wird, ist jedoch subjektiv. Aktuell wird Stress in Studien meist nach zeitlichen Kriterien, also in akut oder chronisch unterteilt. Inwieweit ein Lebewesen einen chronischen Stressor toleriert, hängt von dessen Fähigkeit ab, diesen zu kompensieren und sich an die neuen Gegebenheiten anzupassen. Sterling und Eyer beschrieben 1988 diese Anpassung als Allostase, die „Stabilität des Organismus durch Veränderung“¹⁵. Dieser durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) vermittelte Prozess führt zu einer Wiederherstellung eines neuen Gleichgewichts unter veränderten Rahmenbedingungen. Das Allostasekonzept kann als Weiterentwicklung der Homöostase verstanden werden, bei dem das Gehirn als wichtigstes Steuerorgan betrachtet wird.^{16,17} Um effizient zu sein, muss das Gehirn neurobiologische Prozesse steuern, den Bedarf antizipieren und Prioritäten setzen. Der Organismus kann so ressourcenschonend und bedarfsgerecht auf seine Umwelt reagieren. Dies dient der Reduktion von nicht planbaren Situationen und damit der Entropie. Als stärkster Auslöser für Allostasereaktionen gelten soziale Stressoren, insbesondere die Veränderung bekannter sozialer Strukturen.¹⁸ Folkman und Lazarus zeigten, dass die Art und Weise wie wir Stressoren wahrnehmen und bewerten (*cognitive appraisal*) in Bezug auf die aktuelle Situation und die verfügbaren Ressourcen ganz entscheidend zu einer erfolgreichen Anwendung von Stressbewältigungsstrategien (Coping) beiträgt.¹⁹ Davon abgeleitet kann eine Neubewertung der Situation (*cognitive reappraisal*) helfen Stress zu reduzieren, ähnliche Situationen in Zukunft zu antizipieren und die eigene Resilienz, also die Fähigkeit überschwelliger Stressoren effizient zu begegnen, steigern.²⁰ Hieraus entwickelte sich das transaktionale Stressmodell (siehe Abb. 1), das diesen Zusammenhang darstellt. Die wiederholte oder chronische Belastung des Körpers durch Stress wird nach McEwen und Stellar mit dem Begriff *allostatische Last* (*allostatic load*) bezeichnet.²¹ Unter *allostatic load* kommt es zu einer Abnutzung des Körpers z.B. durch gesundheitsschädigendes Verhalten

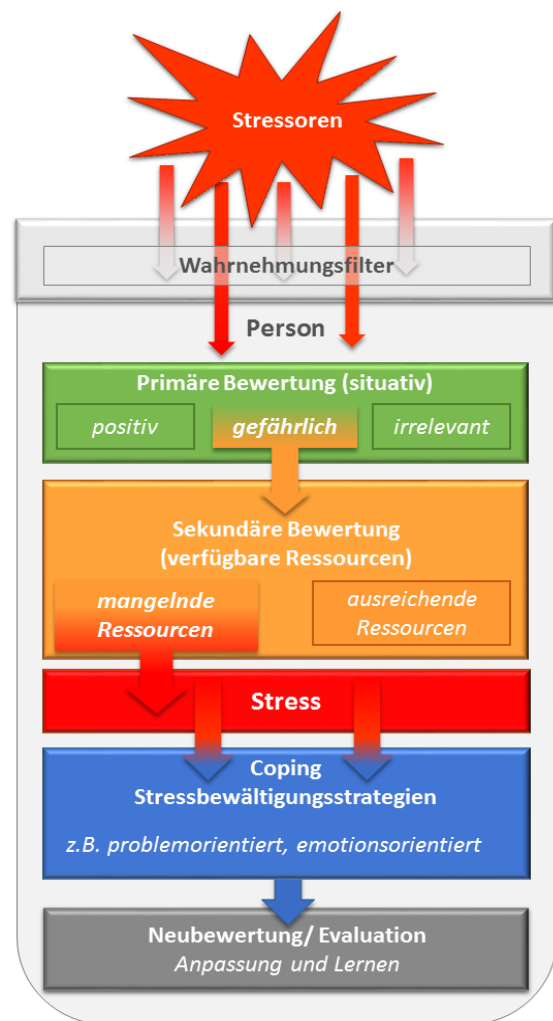


Abbildung 1: Transaktionales Stress nach Lazarus, eigene Darstellung, modifiziert nach¹⁹

Ein überschwelliger Stressor, der den Wahrnehmungsfilter durchdringt, wird primär situativ und sekundär gemäß den verfügbaren Ressourcen bewertet. Sind die Anforderungen größer als die verfügbaren Ressourcen, entsteht Stress, der im Idealfall durch erfolgreich angewandtes Coping zu Anpassung und erlerntem Verhalten führt.

wie stressbedingte Schlafstörungen, Rauchen, erhöhter Konsum von Alkohol oder ungesunder Ernährung. Wenn die Belastung durch einen akuten oder chronischen Stressor nicht sistiert und alle verfügbaren Ressourcen übersteigt, entsteht *allostatic overload*.²² Charakteristisch ist für diese Situation eine erhöhte Reizbarkeit, Energiemangel und das Gefühl der konstanten Überforderung von den Anforderungen des Alltags. Dabei korreliert das Auftreten von *allostatic overload* sehr häufig mit einer erhöhten Stressbelastung am Arbeitsplatz. Eine andauernde Dysbalance des inneren Milieus und eine chronische Aktivierung neurobiologischer Stressachsen führt schließlich unweigerlich zur Organschädigung. Sehr häufig sind davon das Herz-Kreislaufsystem, der Muskel-Skeletapparat, der Stoffwechsel und besonders das Immunsystem betroffen.²²⁻²⁴

Die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie ist ein akutes Krankheitsbild, das durch ein ausgeprägtes emotionales und/oder physisches Stresserlebnis ausgelöst werden kann und mit hohen Katecholaminspiegeln korreliert. Dabei sind strukturelle Veränderungen des Gehirns mittels funktionaler Magnetresonanztomographie (MRT) und *diffusion-tensor-imaging* (DTI) nachweisbar. Betroffene Patienten zeigten eine Volumenreduktion in der grauen und weißen Substanz, sowie Veränderungen der strukturellen und funktionellen Verbindungen, die unter anderem mit Emotionen, Sprache, Denken und autonomer Kontrolle verbunden sind.²⁵ *Allostatic overload* kann sich also längerfristig auf die Gehirnfunktionen auswirken und zu strukturellen Veränderungen des zentralen Nervensystems führen. Die Evaluation von *allostatic load* und die Identifikation kausaler Stressoren kann entscheidend für die Etablierung effektiver Präventivmedizin z.B. am Arbeitsplatz sein.

1.2 Modulation des Immunsystems durch neurobiologische Stressantwortsysteme

Die Funktionen des Immunsystems sind eng mit dem ANS und der HPA-Achse verwoben. Dabei koordinieren die zuvor dargestellten eher übergeordneten kognitiven Resilienzmechanismen des Copings und des *cognitive (re)appraisal* Immunantworten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Gleichzeitig existiert ein zielgerichteter Feedback-Mechanismus über zelluläre Signaltransduktionskaskaden und Inflammationsmediatoren zurück an das ANS und die HPA. Dieses noch nicht ausreichend verstandene Kommunikations- und Steuerungsnetzwerk aus autonomer, neuroendokriner Koordination und immunzellulärer Informationsrückkopplung kann akuten und chronischen Stressoren effizient begegnen und die Homöostase aufrechterhalten; es kann sich aber bei Überbelastung erschöpfen und zu Krankheiten führen.

Die Auswirkungen eines überschweligen Stressors auf das Immunsystem unterscheiden sich je nach Dauer des Stimulus. Akuter Stress, der wie oben geschildert, ein überlebenswichtiges Verhalten stimuliert, führt zu analog zur adrenergen Aktivierung zu einer systemischen Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor (TNF) und einer Leukozytenumverteilung in Regionen möglicher Verletzung oder Invasion (z.B. Haut, Schleimhäute).^{26,27} Dadurch verbessert sich zunächst die allgemeine Leistungsfähigkeit und so auch die Wundheilung.^{27,28} Viele dieser förderlichen Effekte werden unter *allostatic overload* grundlegend verändert oder sogar ins Gegenteil verkehrt. So kommt es unter chronischem, psychologischem Stress zu einer Störung der Wundheilung^{26,29,30} oder zu einer Zunahme respiratorischer Infekte.³¹ Die Wirkung der Katecholamine Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA) v.a. auf das kardiovaskuläre System sind gut untersucht und ihre alltägliche therapeutische Anwendung u.a. bei Reanimationen, zur Regulation des Blutdruckes unter Allgemeinanästhesie aber auch zur Unterdrückung der immunvermittelten systemischen anaphylaktischen Reaktion ist aus der klinischen Versorgung von Patienten nicht mehr wegzudenken. Das SAS spielt aber ebenso eine große Rolle für Immunfunktionen, da es alle primären und sekundären Organe des Immunsystems innerviert. NA, als prädominanter postganglionärer

Neurotransmitter, bindet konzentrationsabhängig systemisch freigesetzt vornehmlich an alpha-adrenerge Rezeptoren (α -AR) auf glatten Gefäßmuskelzellen. Bei höheren Konzentrationen wie sie an postganglionären Synapsen auftreten, bindet NA zudem auch an beta-adrenerge Rezeptoren (β -AR).³² An der Oberfläche von Zellen des angeboren und adaptiven Immunsystems werden vornehmlich β -AR exprimiert, sodass das ANS Einfluss auf eine Reihe von Immunfunktionen hat.^{33,34}

Cortisol, als Haupteffektor der HPA-Achse und freigesetzt aus der Nebennierenrinde, ist als medikamentöse Darreichungsform Cortison in der klinischen Anwendung unverzichtbar. 1948 wurden damit erstmals erfolgreich Arthritispatienten therapiert und noch heute findet es in einer Vielzahl von Erkrankungen vor allem als Immunsuppressivum seine Anwendung. Glucocorticoide (GC) binden an den intrazellulären Glucocorticoidrezeptor (GCR), der auf vielen Zelltypen unter anderem auch auf Endothelzellen, Monozyten, B- und T-Zellen exprimiert wird. Der GCR dimerisiert, bindet mit seiner *DNA-Binding Domain* (DBD) an *Glucocorticoid Binding Sites* (GBS) am offenen Chromatin und interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren (TF), rekrutierten Aktivatoren und Repressoren in einem Transkriptionskomplex, der schließlich z.B. über eine Regulation der großen Signalkaskaden wie die Interleukin-, JAK-STAT-, p38 MAPK- und PI3K Signalwege, und der zellulären Rezeptorinteraktion die immunmodulatorischen Effekte vermittelt.³⁵ Somit sind die Effekte der GC zwar langsamer als die des SAS sie regulieren allerdings ca. 20% des gesamten menschlichen Genoms^{36,37} und dies im überwiegenden Anteil in jedem Zelltyp individuell.³⁶ Die zirkadian regulierte Freisetzung mit hohen Spiegeln am Morgen und geringeren Spiegeln am Abend bei tagaktiven und invers bei nachtaktiven Lebewesen spiegelt sich schließlich auch in einer zirkadianen Rhythmik der Immunität wieder.³⁸

Diese Effekte sind keinesfalls isoliert. Das ANS und die HPA-Achse kommunizieren eng miteinander. Einen ausführlichen Überblick geben Mueller et al.³² Stress wird zentral im *Nucleus* (Ncl.) *paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus verarbeitet. Als Koordinator des ANS aktiviert er über Projektionen Ganglia des Sympathikus im Bereich T1-T7³³ und den Parasympathikus über die Motorneurone des *Ncl. dorsalis* des *N. vagus*. Katecholaminerge Afferenzen des *Ncl. tractus solitarii* (NTS) des Hirnstamms, die Stresssignale wie Schmerz wahrnehmen und die am PVN enden, führen zu einer Freisetzung von *Corticotropin Releasing Factor* (CRF) und somit zur Aktivierung der HPA.³² Zusätzlich exprimiert der PVN Adrenorezeptoren, die bei systemischer Freisetzung von Katecholaminen ebenso die HPA-Achse aktivieren.³² Moduliert wird eine Stressantwort vor allem durch den präfrontalen Cortex, die Amygdala und den Hippocampus, die Stress wahrnehmen und mit Emotionen wie Angst verknüpfen können. Der Hippocampus verarbeitet dabei viszerale Afferenzen aus dem NTS und exprimiert zudem auch GCR, die wiederum einen negativen Feedback loop zur HPA-Achse initiieren. So ist zum Beispiel die Schmerzwahrnehmung und Wundheilung entscheidend durch *cognitive appraisal* und *allostatic load* beeinflussbar. Die Plastizität dieser Strukturen wird in messbaren Volumenveränderungen unter Stress deutlich.³⁹

Die zeitversetzte Freisetzung von A, NA und GC führt bei einer physiologischen Stressantwort nach der Immunaktivierung zu einer Auflösung der Inflammationsreaktion und Heilung, vermittelt unter anderem durch typisch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und regulatorische T-Zellen (T_{reg}).⁴⁰ Chronischer Stress und die damit oft verbundenen prävalent hohen Stresshormonkonzentrationen erhält die Inflammationsreaktion jedoch und kann Autoimmunprozesse begünstigen.^{36,41} Bei prolongiert hohen NA Spiegeln kommt es zu einer Desensibilisierung der β -AR aufgrund dauerhafter Stimulation und damit zu einer vermehrten Stimulation der α -AR, die wiederum die Freisetzung von typischen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-6 bedingen und die Anzahl im Blut zirkulierender neutrophiler Granulozyten erhöhen.^{42,43} Zusätzlich wird dieses Steuerungsnetzwerk durch andere Systeme moduliert.

Eines dieser Netzwerke, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist das Endocannabinoidsystem (ECS). Das ECS besteht aus Signallipiden (Endocannabinoide, eCB), den zugehörigen Rezeptoren sowie Proteinen, die die eCB transportieren, synthetisieren und abbauen.⁴⁴ Die am besten beschriebenen Rezeptoren sind der Cannabinoid-Rezeptor (CB) 1 und 2. Sie sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die unter anderem über inhibitorische G-Proteine die Adenylylcyclase hemmen. CB1-Rezeptoren werden im zentralen Nervensystem, besonders an den Synapsen exprimiert.⁴⁵ CB2-Rezeptoren finden sich hingegen vor allem auf Immunzellen.⁴⁶ Die am besten untersuchten eCB sind 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und Anandamid (AEA), die über die Rezeptorbindung ihre Wirkungen entfalten.⁴⁷ Ihr Abbau erfolgt über Hydrolyse durch die *monoacyl glycerollipase* (MAGL) oder *fatty acid amino hydrolase* (FAAH).⁴⁴ Das ECS moduliert viele andere Signaltransduktionskaskaden und wird gleichermaßen von diesen beeinflusst. Akute und chronische Stressoren beeinflussen die eCB-Spiegel. So stimuliert die Freisetzung von CRH die enzymatische Aktivität von FAAH, was zu einer Reduktion der hemmenden Wirkung von AEA führt. Dies aktiviert wiederum die HPA-Achse.⁴⁸ Während eCB zentral zu einer Verstärkung der Stressantwort führen und unter chronischem Stress zentrale eCB Spiegel abfallen, sind die gemessenen Konzentrationen im Blut eher ansteigend und die mechanistischen Effekte weniger klar. Aufgrund der zellspezifischen Wirkung und der Beeinflussung durch subjektiv emotionale Resilienzmechanismen ist der Einfluss der adrenergen und glucocorticoiden Stressantwort sowie die Modulation durch das ECS individuell variabel und in Studien schwer generalisierbar. Insbesondere der Effekt einer individuellen Vorbereitung sowie geschlechtsspezifische Unterschiede auf Langzeiteffekte und die unterschiedlichen pro- und anti-inflammatorischen Wirkungen der Stressantwortssysteme sind mechanistisch noch nicht verstanden.

1.3 Stressforschung auf der Erde und im Weltraum

Stress ist eine zunehmende sozioökonomische Belastung. Die *American Psychological Association* schätzte, dass stressassoziierte Krankheitsausfälle die USA jährlich ca. 300 Milliarden US-Dollar kosten.⁴⁹ In Deutschland schätzt die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) die damit verbundenen Ausfallkosten in Produktion und Bruttowertschöpfung jährlich auf 36,1 Milliarden Euro⁵⁰ und in einer repräsentativen bundesweiten Forsa-Umfrage von 2021 geben an 64% aller Befragten an zumindest gelegentlich gestresst zu sein.⁵¹ Die Tendenz ist in allen Quellen im Vergleich zu den Vorjahren steigend.

Stress hat einen erheblichen Einfluss auf den Heilungsverlauf von Patienten. Schon lange ist bekannt, dass präoperativer Stress die Wundheilung verlangsamt,^{30,52} was wiederum das postoperative Outcome beeinflusst.⁵³ Dies wird zunehmend auch von operativer Seite anerkannt, es ist jedoch noch nicht klar, wie man dies im klinischen Alltag berücksichtigen kann.⁵⁴ Somit wird deutlich wie wichtig es ist, Stress und seine Ursachen zu erkennen und seine Wirkung auf den Patienten und sein Immunsystem zu verstehen. Nur so können Präventivmaßnahmen ergriffen, Therapiemaßnahmen angepasst und im Idealfall negative Auswirkungen auf die Gesundheit sogar ganz vermieden werden. Dies wird in der Medizin im Konzept der individualisierten 4P-Medizin (*predictive, preventative, personalized & participatory*) berücksichtigt. Maßgeschneiderte Behandlungskonzepte bezogen auf den individuellen Immunstatus erhöhen nicht nur die Compliance, sondern auch den Behandlungserfolg. Dies wurde in den letzten Jahren vor allem im Bereich der Tumormimmuntherapie evident und führt zu einer stetigen Erweiterung des Therapieportfolios.⁵⁵

Auch in der Intensivmedizin werden personalisierte Therapiestrategien entwickelt. Eine dem Patienten angepasste Dosierung von Medikamenten um adäquate Medikamentenspiegel bei zum Teil unvorhersehbarer Pharmakokinetik zu erhalten z.B. bei Antibiotika, wird bereits über das

therapeutische Drug Monitoring umgesetzt.⁵⁶ Eine Intensivstation ist eine besonders stressauslösende Umgebung, nicht nur für das betreuende medizinische Personal, sondern auch für den Patienten selbst. Stressoren in der Umgebung sind z.B. eine Störung des Tag-Nacht-Rhythmus durch den Verlust natürlicher Zeitgeber wie Tageslicht und Dunkelheit, Lärm, Schlafstörungen, Infektion und Inflammation, Veränderung der Nutrition sowie Verlust der Knochendichte und Muskelschwund bedingt durch Bettlägerigkeit und der Wirkung stresspermissiver Hormone. Gegenmaßnahmen gegen Stress bei Patienten und Personal werden untersucht, aber noch nicht flächendeckend umgesetzt.^{57,58}

Die Erforschung der Immunmodulation durch Stressoren ist komplex, da subjektive Wahrnehmung, individuelle Ressourcen und Copingstrategien, wie bereits erwähnt, die Resilienz erheblich beeinflussen. Zur Untersuchung mechanistische Fragestellungen sind *in vitro* Versuche am stimulierten Blut gesunder Probanden geeignet, da so die „Menge an Stress“ über eine definierte Konzentration von Stimulanzien oder Inhibitoren kontrolliert werden kann. Diese Methodik wird jedoch Allostasereaktionen im Menschen insbesondere unter chronischem Stress nicht adäquat abbilden können. Zudem ist die individuelle Konstitution (Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand etc.) und psychoemotionale Lage des Menschen zu berücksichtigen. Somit sind klassisch klinische Probandenstudien nur bedingt sinnvoll, beispielsweise mit sehr streng definierten Auswahlkriterien in kleinen Kohorten, was zu einer Rekrutierungsproblematik führen kann. Alternativ kann man durch eine sehr hohe Probandenzahl versuchen die Variabilität der individuellen Konstitution (z.B. Diagnose, Alter, Geschlecht, Immunstatus, Schweregrad der Erkrankung) einerseits und andererseits den durch unterschiedliche Krankheitsverläufe, Komplikationen und Therapiemaßnahmen entstehenden Bias klein zu halten.

Eine andere, hier angewandte Strategie, ist es, Untersuchungen von gesunden Probanden unter standardisierten Lebens- und Arbeitsbedingungen durchzuführen, die Stress auslösen. Hier können Effekte schon mit einer geringeren Anzahl von Probanden beobachtet werden. In der Weltraumforschung lassen Studien an Astronauten auf Langzeitmissionen auf der internationalen Raumstation (ISS) und an Normalpersonen auf verschiedenen analogen Forschungsplattformen auf der Erde bei auch kleiner Probandenzahl umfassende Untersuchungen unter sehr standardisierten Bedingungen zu. Astronauten durchlaufen ein rigoroses Auswahlverfahren und werden im Rahmen Ihres Trainings für ihren Weltraumeinsatz exzellent vorbereitet. Dennoch sind Langzeitmissionen insbesondere ein Außenbordeinsatz (*extra vehicular activity*, EVA), sowie Start und Landung erhebliche mentale und körperliche Belastungssituationen. Die Stressoren eines Astronauten sind denen eines Patienten auf Intensivstation sehr ähnlich. Schon seit den Apollomissionen ist bekannt, dass eine Weltraummission eine Dysregulation des Immunsystems bedingt. Dies kann weitreichende Folgen für geplante interplanetare Missionen haben.⁵⁹

Stressbedingte Allostasereaktionen können entscheidend für den Erfolg oder Misserfolg einer Mission sein. Dabei muss Anpassung nicht notwendigerweise schlecht sein, sondern kann, wie oben dargestellt, vor Krankheit schützen. Auf den unterschiedlichen Analogplattformen werden Studien durchgeführt, um Teilaspekte der speziellen Weltraumumgebung zu simulieren und zu untersuchen⁶⁰. Dazu gehören u.a. die Antarktis Forschungsstation Concordia, Isolationshabitate, Bedrest-Studien zur Simulation von Schwerelosigkeit auf der Erde oder der Parabelflug als Akutstressmodell.⁶¹ Dabei sind die Studienteilnehmer nicht für Ihren Einsatz jahrelang trainiert worden, wie dies bei Astronauten der Fall ist. Dies erlaubt das besondere Kollektiv der Astronauten mit der Allgemeinbevölkerung unter ähnlichen Bedingungen zu vergleichen⁶⁰ (Abbildung 2).



Abbildung 2: Stressoren auf der ISS und auf Intensivstationen:

Venn-Diagramm mit der Darstellung der Stressoren, denen Menschen auf der ISS (blaue Fläche) und auf Intensivstationen (rote Fläche) begegnen. Für viele gibt es eine Überschneidung (violette Farbe). Die Bettruhe auf der Erde findet ihr Äquivalent in der Schwerelosigkeit.

So bieten die ISS und ihre Analogplattformen eine einzigartige Möglichkeit verschiedene Aspekte von *allostatic load* insbesondere chronische Exposition und Langzeiteffekte sowie persönliche Resilienz unter einem standardisierten Umfeld mit definierten Stressoren zu untersuchen. Das Ziel dieser Studien ist zum einen die Etablierung effektiver Präventivmaßnahmen, um die Sicherheit der Raumfahrt zu erhöhen und die geplanten Langzeitmissionen zum Mond und Mars zu ermöglichen. Zum anderen sollen aber Innovationen aus der Raumfahrt insbesondere der Erdbevölkerung zu Nutzen kommen und die gewonnenen Ergebnisse für Fragestellungen auch aus der klinischen Perspektive verwendet werden.

2 Fragestellung

Die übergeordnete Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Anpassungsvorgänge des humanen Immunsystems an akute und chronische Stresszustände. Der Fokus lag hierbei auf dem Einfluss von Stress auf Funktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1.) Wie modulieren die Stressantwortsysteme des SAS und des ECS mechanistisch die angeborene und die adaptive Immunität und welche Oberflächenrezeptoren und intrazellulären Signalwege spielen dabei eine Rolle?
- 2.) Welche allostatistischen Anpassungsvorgänge des humanen Immunsystems finden in extremen Lebensräumen (ISS und Antarktis) statt?
- 3.) Welche Besonderheiten der Weltraumumgebung haben Einfluss auf die Allostase?

Hierzu wurden in dieser Arbeit Fragestellungen anhand von drei Modellen und im Rahmen von drei Isolationsstudien bearbeitet.

- I) *In vitro* Versuche mit Blut gesunder Probanden
- II) Langzeitobservationsstudie (1 Jahr) in der Antarktis (CHOICE-2)
- III) Langzeitisolationsstudien (4-8 Monate) auf der ISS (Studien IMMUNO und IMMUNO-2)

Methodisch wurden die Fragestellungen in den drei Modellen wie folgt adressiert:

zu I) Dabei sollten die mechanistischen Fragestellungen im Rahmen von systematischen *in-vitro* Blutuntersuchungen gesunder Probanden ohne einen akuten psychosozialen Stressor durchgeführt werden. Graduelle Stresseffekte wurden durch die konzentrationsabhängige Zugabe von u.a. Noradrenalin, Agonisten oder Antagonisten simuliert und Liganden-Rezeptor Interaktionen untersucht. Neben der Verwendung synthetischer Agentien wurden die Experimente *in vitro* um einen natürlichen Stimulus erweitert, um Fragestellungen, die für Studien auf der ISS von besonderer Relevanz sind (siehe unten) zu adressieren.

Der Einfluss von chronischem Stress sollte im Rahmen von Langzeitisolationsstudien untersucht werden:

zu II) Die Probanden in der Antarktis auf der Forschungsstation Concordia waren für 11 bis 13 Monate der extremen Antarktischen Umwelt ausgesetzt, lebten circa 9 Monate völlig isoliert und auf sich gestellt. Die Erforschung ihrer Stressantworten basierte auf vorab vielfach getesteten und standardisierten Untersuchungsverfahren und auch der Verarbeitung der vielfältigen Proben vor Ort. Dies war nur möglich, da dort ein Immunlabor von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors aufgebaut und auch in den antarktischen Sommermonaten auf der Concordia-Station betrieben wurde. Dabei waren auch die Überwinterungsscrews mit eingebunden und v.a. der verantwortliche Arzt dort erneut instruiert worden. Die untersuchten Probanden waren Wissenschaftler, Ingenieure und ein Koch. Während sie aus der „Normalbevölkerung“ kamen, und nur nach fachlicher Eignung ausgewählt wurden, sind im Modell III) speziell dafür aufwändig ausgewählte und trainierte Probanden im Rahmen von Langzeitmissionen auf der ISS untersucht worden. Die Inklusion und logistische Studienbetreuung der ISS-Crew während der 6-monatigen Mission erfolgte durch die Raumfahrtagenturen ESA und Roscosmos. Die unmittelbare Interaktion auf der Erde erfolgte vor Ort in Moskau durch unser Labor. Insgesamt wurden bis zu neun Abnahmezeitpunkte vor, während und nach der Mission ermöglicht. Die Effekte eines akuten Stressors auf ein prävalentes, chronisches Stressniveau konnte am Tag nach der Rückkehr von der ISS auf die Erde untersucht werden, da die Landung mit der Soyuz-Kapsel auch bei sehr routinierten Astronauten einen überschwelligem, akuten Stressor darstellt.

3 Ergebnisse

3.1 In vitro Untersuchungen zur Zytotoxizität, Phagozytose und Zytokinausschüttung

Zunächst untersuchten wir *in vitro* welche Effekte das SAS und das ECS auf Funktionen des angeborenen Immunsystems haben. Dabei fokussierten wir auf Noradrenalin als Haupttransmitter im Sympathikus und auf Stimulation des CB2 Rezeptors mittels Agonisten und inversen Agonisten. Ziel dieser Experimente war es, die konzentrationsabhängigen Auswirkungen auf die Zytotoxizität polymorphkerniger Leukozyten (PML) anhand der Produktion von Radikalen (Bestimmung mittels Farbstoff Dihydrorhodamin 123 im Durchflusszytometer) und während der Dectin-1-abhängigen Phagozytose zu untersuchen. Schließlich wurde die kumulativ-zelluläre Zytokinantwort gegen *Candida* im Vollblut in einem Stimulationsassay untersucht und den Zeitverlauf der zellulären Aktivierung bewertet.⁶²

3.1.1 Noradrenalin reguliert die stimulierte Radikalproduktion über β -AR

Extern zugefügtes NA konnte in steigenden Konzentrationen die TNF und formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) - stimulierte Radikalproduktion in durch Zellseparation gewonnenen PMLs konzentrationsabhängig hemmen, wobei NA-Konzentrationen ab 100nM ($p=0,005$) Signifikanz erreichten und die stärkste Hemmung ($p=0,002$) bei 500nM beobachtet wurde. Eine Reduktion der Zellviabilität als Ursache für die beobachtete Abnahme der Radikalfreisetzung wurde mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung überprüft und ausgeschlossen. Zudem konnte eine höhere antioxidative Kapazität als Grund für die beobachteten Veränderungen nicht bestätigt werden, da die mittels Western Blot gemessene Expression von Superoxiddismutase 1 (SOD1) und Katalase in den PML über die Zeitdauer von zwei Stunden und unterschiedlichen NA Konzentrationen stabil blieb.

Um zu verifizieren, ob die beobachtete Abschwächung der Radikalfreisetzung auf eine adrenerge Rezeptorstimulation zurückzuführen ist, wurde unter 200nM NA (die aus der Hemmkurve ermittelte IC_{50}) durch Zugabe von adrenergen Antagonisten Titrationskurven erstellt (Abbildung 3).

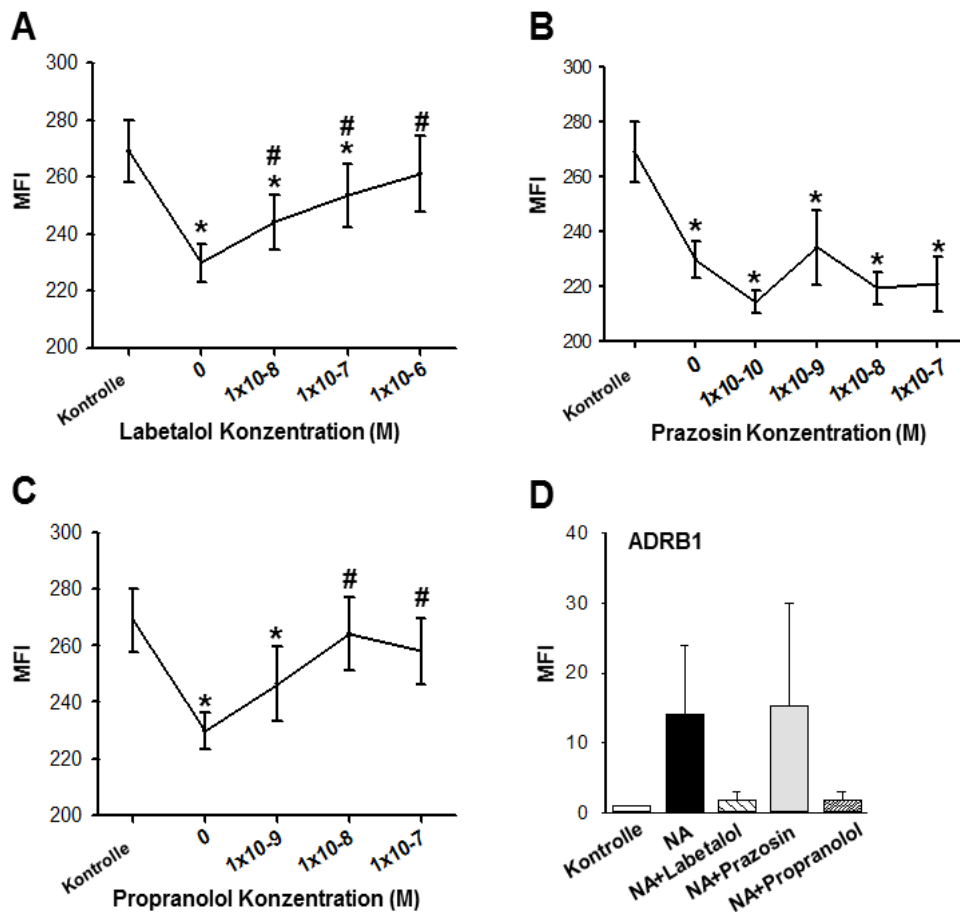


Abbildung 3: NA beeinflusst den oxidativen Burst (modifiziert nach⁶²)

Liniendiagramm: NA führte zu einer signifikanten Abnahme der DHR-Fluoreszenz (MFI) im Vergleich zur Kontrolle („0“= 200nM NA, * $P<0,05$ vs. Kontrolle). **A:** Labetalol wirkte ab 10nM. Mit 1 μ M wurde die Wiederherstellung der Radikalproduktion erreicht (# $P<0,050$ vs. 200nM NA) (Mittelwert \pm Standardabweichung, Einzelspender $n=7$). **B:** Die Zugabe von Prazosin hatte keinen Effekt (MW \pm SD, $n=4$). **C:** Propranolol glich die NA-Wirkung ab 10nM aus (# $P<0,01$) (MW \pm SD, $n=7$). **D:** Balkendiagramm: Relative Veränderungen der ADRB1-Expression in PML nach Inkubation und Stimulation mit 200nM NE allein oder in Kombination mit entweder 1 μ M Labetalol, 10nM Prazosin oder 10nM Propranolol. (MW \pm SD, $n=3$).

Labetalol ist das Razemat aus einem α_1 -selektiven und einem nicht-selektiven β (β_1 und β_2) Rezeptorantagonisten.⁶³ Interessanterweise konnte durch Vorinkubation von PML mit Labetalol die Radikalfreisetzung dosisabhängig wieder hergestellt werden. Ein signifikanter Anstieg der Radikalbildung begann bei Zugabe von 10nM Labetalol im Vergleich zur Kontrolle. Eine vollständige Regeneration der Radikalfreisetzung gelang unter 1 μ M Labetalol. Der selektive α -Antagonist Prazosin hatte keinen Einfluss auf die Radikalfreisetzung, während der β -selektive Antagonist Propranolol bei 10nM sehr ähnliche Effekte hatte wie Labetalol, was eine β -AR vermittelte Wirkung nahelegte.

Um zu klären über welchen β -Rezeptor NA seine Wirkung vermittelt, wurde die RNA-Expression der β -AR-Subtypen 1-3 (ADRB1-3) nach Inkubation der PML mit NA und Antagonisten mittels TaqMan[®] qPCR analysiert. Proben von drei individuellen Spendern zeigten eine RNA-Expression von ADRB1 und 2, jedoch keine ADRB3-RNA. Während die ADRB2-Expression weitgehend unverändert blieb, führte die Inkubation mit 200nM NA bzw. 200nM NA und Prazosin bei allen Spendern zu einem Anstieg der relativen Expression von ADRB1 im Vergleich zu den Kontrollen. Interessanterweise veränderten 10nM Labetalol oder 10nM Propranolol die Expression nicht. Aufgrund der hohen interindividuellen Unterschiede erreichten die Daten keine statistische Signifikanz

Es wurde gezeigt, dass NA die oxidative Burst-Reaktion und die Stimulus geleitete Migration in PMNs modulieren kann.^{64,65} Darüber hinaus korrelierte bei Schlaganfallpatienten unter kontinuierlicher NA-Therapie die Hemmung des oxidativen Burst *in vitro* mit den NA-Plasmaspiegeln.⁶⁶ Diese und unsere Daten zeigen, dass hohe NA-Spiegel analog zu der bekannten Rezeptorbindungsaffinität offenbar durch Bindung an β -Rezeptoren eine additive immunsuppressive Wirkung hat, die bei kritisch Kranken nicht unerheblich sein kann.

In einem ähnlichen Versuchsaufbau evaluierten wir den CB2 Rezeptor des ECS. Der synthetische und hochselektive CB2-Rezeptor-Agonist AM1241 hemmte konzentrationsabhängig die Radikalfreisetzung bei 5 μ M als auch bei 10 μ M allerdings nur in unstimulierten PML. Rekonstituierungsversuche mit dem inversen Agonisten SR144528, zeigten eine Normalisierung der Radikalfreisetzung bei einer Konzentration von 5 μ M im Vergleich zur Kontrolle. Die Dosis war für den Agonisten und den inversen Agonisten identisch; höhere Konzentrationen (10 μ M) zeigten keine weitere Wirkung.⁶² Die stimulierte Freisetzung von Radikalen kann eindringende Krankheitserreger wirksam beseitigen. Ein Anstieg der freien Radikale über einen Schwellenwert hinaus oder eine unkontrollierte Freisetzung unter basalen Bedingungen führt zu Zellschäden und kann schließlich den Zelltod verursachen.⁶⁷ Unsere Experimente zeigten, dass das ECS über den CB2-Rezeptor Einfluss auf die basale Radikalproduktion nimmt und so entscheidend an der Regulation der Homöostase beteiligt ist.

3.1.2 Einfluss des Endocannabinoidsystems auf Phagozytose und die Zytokinantwort

Die zelluläre Adhäsion an Fremdpartikel und deren Phagozytose evaluierten wir in PML mittels FITC-konjugierten Zymosanpartikeln, einem β -Glucan, das aus der Zellwand von Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) gewonnen wird und an den Rezeptor Dectin-1 auf phagozytosefähigen Leukozyten bindet. Während die Zugabe von NA keinen Einfluss hatte, reduzierte AM1241 die Adhäsion der Partikel bei Konzentrationen von 5 μ M ($p=0,037$) und 10 μ M ($p=0,021$) und die Phagozytose bei 10 μ M ($p=0,036$) signifikant.⁶² Da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Adhäsion von Zymosanpartikeln durch Integrine vermittelt wird untersuchten wir die β_2 -Integrine (CD11b/CD18) und L-Selektin (CD62L) auf der Zelloberfläche mit AM1241 in verschiedenen Konzentrationen mittels FACS.

Es zeigten sich aber keinerlei Veränderungen. Dies kann am verwendeten Agonisten liegen, oder dass die quantitative Expression nicht unbedingt die qualitative Funktion widerspiegelt.⁶⁸

Den kumulativen Effekt der untersuchten Mechanismen bei einer simulierten Infektion untersuchten wir mit einem *in vitro* Stimulationsassay⁶⁹, (Abbildung 4).

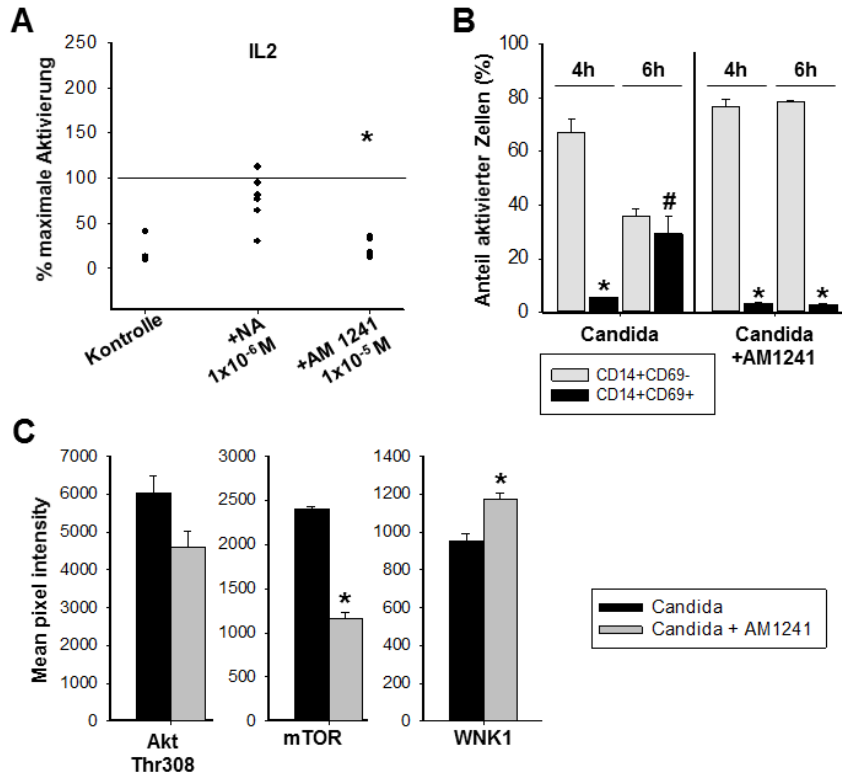


Abbildung 4. Zytokinreaktion gegenüber Candida unter dem Einfluss von NE und AM1241 (modifiziert nach⁶²).
A: Vertikales Punktdiagramm (Einzeldaten in %): Prozentsatz der Aktivierung im Vergleich zur stimulierten Probe (=100 %, horizontale Linie, MW± SD, n=6 Einzelspender). Kontrolle = Ausgangsprobe ohne Stimulation. AM1241 hemmte die Freisetzung von IL-2 im Gegensatz zu NA signifikant (*P<0,05). **B:** Balkendiagramm mit dem prozentualen Anteil nicht aktivierter (CD14⁺CD69⁻) und aktivierter Monozyten (CD14⁺CD69⁺) nach 4- bzw. 6-stündiger Inkubation mit *C. albicans* oder in einer Kombination mit AM1241. (MW ± SD, n=4). Nach 4 Stunden waren die Mehrzahl der Monozyten im nicht-aktivierten Zustand (*P<0,05 vs. CD14⁺CD69⁻ Zellen). Nach 6 Stunden begann der Anteil der CD14⁺CD69⁺ Zellen anzusteigen, jedoch nicht unter AM1241 (#P<0,05 im Vergleich zu CD14⁺CD69⁻ Monozyten nach 4 Stunden Inkubation mit *Candida* und im Vergleich zu CD14⁺CD69⁺ Monozyten nach 4 und 6 Stunden unter gleichzeitiger Inkubation mit *Candida* und AM1241) **C:** Balkendiagramm mit Arraydaten für phosphorylierte Proteine Akt (Thr308), mTOR (Ser2448) und WNK1. Signifikant geringere Mengen an phosphoryliertem mTOR und größere Mengen an WNK1 wurden unter AM1241 gefunden, (MW ± SD, Daten aus zwei separaten Messungen; *P<0,05).

Hierbei wurde Vollblut über 48 Stunden mit *C. albicans* Antigen bei 37°C stimuliert und die Zytokinantwort mit demselben Antigen unter Zugabe von 200nM NA oder 10µM AM1241 verglichen. Es zeigte sich mit AM1241 eine signifikante Abnahme von IL-2 und IL-6 (p=0,013 bzw. p=0,001) vergleichbar mit Werten ohne jegliche Antigenstimulation, nicht jedoch unter NA. Die Prozentsätze der Lymphozytensubpopulationen blieben dabei im normalen Bereich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Granulozyten 47,89 % ±0,48, Lymphozyten 36,47 % ±1,83, T-Lymphozyten 62,69 % ±4,28) (Daten nicht gezeigt). Der zeitliche Verlauf der Zellaktivierung war jedoch verändert. Der im FACS gemessene zelluläre Aktivierungsmarker CD69 auf der Zelloberfläche⁷⁰ war unter Stimulation ab 6 Stunden nach Beginn der Inkubation auf CD14⁺-Monozyten nachweisbar, nicht jedoch

unter Zugabe von AM1241. Zusätzlich zeigte sich in einem durchgeführten Phosphokinase-Proteinarray von isolierten PBMCs 6 Stunden nach Beginn der Inkubation mit Candida Antigen und AM1241 eine signifikant reduzierte Menge an phosphoryliertem *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), einem Protein *downstream* des PI3-Kinase/Akt-Wegs, unter AM1241. Ähnliche Tendenzen zeigten sich für Akt, ohne statistische Signifikanz. Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Anstieg der phosphorylierten WNK-Lysin-defizienten Proteinkinase 1 (WNK1), die Adhäsion über *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und über Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen 1 (LFA-1) negativ reguliert und die Bildung von Zellkomplexen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und T-Zellen hemmt⁷¹, was die beobachteten Veränderungen bei der Adhäsion erklären kann.

Es wurde bereits gezeigt, dass PML⁷², die *C. albicans* ausgesetzt sind, ex-vivo eine starke IL6-Antwort auslösen und dass der aktivierte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine zentrale Rolle beim Schutz gegen Candida an der Schleimhaut- und Epithelbarriere spielt⁷³. Darüber hinaus haben Karnam et al. gezeigt, dass mTOR dem durch Dectin-1 aktivierten Syk-Weg nachgeschaltet ist und die proinflammatorische Zytokinantwort über NFκB und damit die Immunität gegen Candida vermittelt.⁷⁴ Es wurde zudem gezeigt, dass auch WNK1 dem PI3K/Akt-Signalweg nachgeschaltet ist. Daher weisen unsere Ergebnisse auf einen gekoppelten Mechanismus hin, durch den das ECS die Immunität gegen Candida wirksam unterdrücken kann.

Zusammengefasst beeinträchtigt also die Aktivierung des CB2-Rezeptors die Immunität gegen den Opportunisten Candida. Einerseits greift das ECS in den Dectin-1/Syk- und den PI3K/Akt-Signalweg ein, was zu einer Verringerung von aktiviertem mTOR (Ser2448) und in der Folge zu einer erheblich niedrigeren Freisetzung von IL-2 und IL-6 führt. Andererseits ist die zelluläre Adhäsion und Phagozytose von β-Glucanen durch Aktivierung von WNK1 reduziert und die frühe Aktivierung von Monozyten unterdrückt, was schließlich zu einer reduzierten Zytokinantwort führt (Abbildung 5).

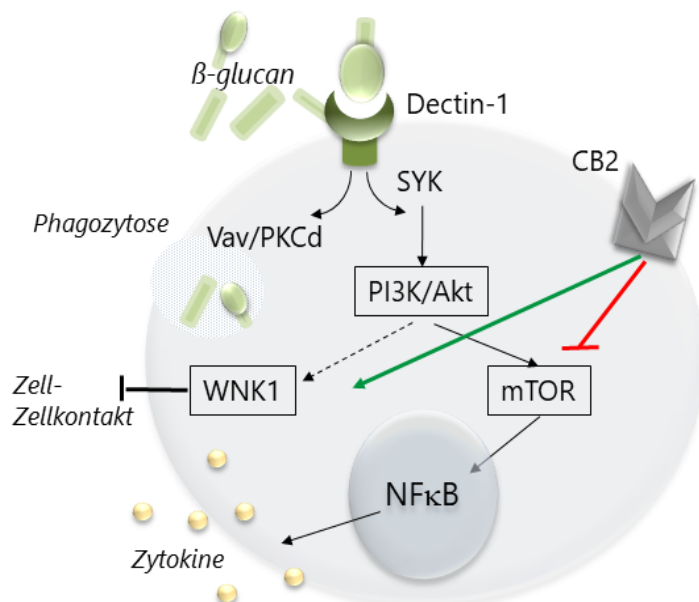


Abbildung 5. Intrazelluläre Signalwege nach Aktivierung des CB2-Rezeptors in Leukozyten.

Schematische Darstellung der beobachteten Effekte nach Aktivierung des CB2 Rezeptors: Eine Hemmung der Phosphorylierung von mTOR (roter Pfeil) erklärt die unterdrückte Zytokinantwort nach langer Stimulation. Die beobachtete Reduktion der Zelladhäsion kann mit einer Aktivierung von WNK1 (grüner Pfeil) erklärt werden.

3.2 Veränderungen des Transkriptoms während 12-monatiger Isolation in der Antarktis

Nach der Simulation von Stress *in vitro* wurden mit den im Folgenden zusammengefassten RNA-Sequenzierungsdaten (RNA-Seq) Probanden untersucht, die chronischem, psychoemotionalem und physischem Stress ausgesetzt waren, da sie 12 Monate in der Antarktis überwinterten.

Die auf einem Eisplateau in Höhe von 3233 m liegende, französisch-italienische Forschungsstation Concordia wird seit 2005 ganzjährig betrieben. Im antarktischen Sommer (November bis Februar) befinden sich ca. 50-70 Personen und im antarktischen Winter (Mai bis August) nur 13-15 Personen auf der Station. Die extremen klimatischen Bedingungen mit unter anderem geprägt durch eine lebensfeindliche Umgebung mit Tiefsttemperaturen bis -80°C , der veränderte Tag-Nacht-Rhythmus mit 24 Stunden Helligkeit (Dezember/Januar) und Dunkelheit (Juni/Juli) zusammen mit der ausgeprägten Isolation durch die stark reduzierte Möglichkeit der Außenkommunikation machen diese Station zu einem gut etablierten Langzeitstressmodell und zählt zu den anerkannten Forschungsplattformen für die Simulation einer Weltraummission auf der Erde.⁶¹

Während Astronauten jedoch ein jahrelanges Spezialtraining absolvieren, werden die Besatzungen von Überwinterungsmissionen lediglich einer medizinisch-psychologischen Untersuchung unterzogen, um sich zu qualifizieren. Es handelt sich also um ein sehr gutes Modell, um die chronischen Auswirkungen von Stress und Isolation zu untersuchen, die nicht durch eine bereits bestehende Ausbildung, Anpassung oder Krankheit beeinträchtigt sind.

3.2.1 Datenerhebung und Workflow

Die hier gezeigten Sequenzierungsdaten wurden im Rahmen der CHOICE-II-Studie erhoben, die während der Überwinterungskampagne 2016/2017 durchgeführt wurde (Protokollnummern: 524-15, 332-08). 8 männlichen Probanden wurde 2-3 Monate vor dem Einsatz (t_0), vor Ort auf der Concordia-Station im Januar, April, Juli, Oktober und 5-6 Monate nach der Isolationsphase (post) 2,5 ml venöses Blut direkt in ein PAXgene® RNA-Röhrchen (BD Biosciences) entnommen und bis zur Weiterverwendung im Labor in München bei -80°C gelagert.

Nach RNA-Isolation, Aufreinigung und mehreren Qualitätskontrollen wurden die Proben mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) bei Eurofins® (Konstanz, Deutschland) auf einer Illumina HiSeq2500-Plattform in einer Paired-End-Konfiguration (2x150bp) mit mindestens 30 Millionen Reads pro Probe sequenziert. Der Arbeitsablauf des RNA-Seq-Alignments und die differentielle Genexpression jedes Zeitpunkts im Vergleich zu t_0 mittels DESeq2⁷⁵ erfolgte mit der Software Array Studio v10.0.1.118 (QIAGEN, Cary, NC, USA)⁷⁶. Differenziell exprimierte Gene wurden zur Analyse an Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com>) gesendet, wobei die folgenden Grenzwerte verwendet wurden: q-Wert $\leq 0,01$ (false discovery rate (FDR) unter Anwendung des Benjamini-Hochberg-Verfahrens), *fold change* (fc) $\geq |2|$ und mean counts min ≥ 100 , wobei 2000 Gene für die Analyse abgerufen wurden. Aufgrund geringerer Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt nach der Isolierung und dem Zeitpunkt vor der Isolierung (t_0) wurden für den Zeitpunkt nach der Isolierung folgender cut-off gewählt: Expression p-value $\leq 0,01$, fc $\geq |1,5|$ und mean counts von ≥ 10 , womit 560 Gene für die Analyse ausgewählt wurden.

Die IPA-Analyse basiert auf zwei Werten. Ein p-Wert, der aus einem Fisher's Exact Test abgeleitet wird, gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass eine Assoziation zwischen einer Funktion oder einem Signalweg und einer Reihe von Genen besteht. Die Aktivierung oder Deaktivierung einer Funktion, eines Signalwegs oder einen *upstream* Regulators wird durch den z-Score vorhergesagt und

farblich kodiert (orange bzw. blau) wiedergegeben. Der z-Score beschreibt die Anzahl der Standardabweichungen der Daten, die über oder unter dem Mittelwert liegen. Ein z-Score ≥ 2 wurde als signifikant erhöht, ein z-Score ≤ -2 als signifikant erniedrigt definiert.⁷⁷

3.2.2 Inhibierung zentraler Immunfunktionen während und nach der Isolation

Im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt zeigte sich eine überraschend deutliche Inaktivierung zahlreicher Schlüsselfunktionen der Immunität über alle Isolationszeitpunkte hinweg. Zudem normalisierten sich nur wenige Funktionen und Signalwege nach der Rückkehr (Abbildung 6).

Die Funktionen mit den stärksten negativen z-Scores, also einer starken Inaktivierung, waren *Chemotaxis* und *Homing of cells*. Einige Funktionen blieben auch nach der Rückkehr bestehen, wie *Inflammatory response*. Unter den wenigen aktivierten Funktionen zeigte *Infection of mammalia* die stärksten positiven z-Scores, passend zum Gesamteindruck einer stark eingeschränkten Immunität.

Das Expressionsmuster zahlreicher Signalwege (Abbildung 6B) zeigte eine ähnlich starke Inhibierung über alle Zeitpunkte von Januar bis Oktober. Der am stärksten aktivierte Signalweg war *eukaryotic initiation factor-2 (eIF2) signaling* (mittlerer z-score: $4,35 \pm 0,20$), was auf eine Aktivierung der Translation hinweist. Darüber hinaus zeigte *Interferon-Signaling* signifikant negative z-Scores und war der Signalweg mit den zweitstärksten Veränderungen im Zeitverlauf. Zu den signifikant inhibierten Signalwegen gehörten zudem p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK, mittlerer z-Score: $-2,73 \pm 0,42$), *Triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM1) Signalweg (mittlerer z-Score: $-2,66 \pm 0,34$) sowie die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose in Makrophagen (mittlerer z-Score: $-2,95 \pm 0,65$).

Die drei am stärksten inhibierten *upstream* Regulatoren waren IFN γ Transglutaminase 2 (TGM2) und TNF. IFN γ und TNF zeigten nach Rückkehr sogar eine Verstärkung des bereits negativen z-Scores (Abbildung 6C).

Trotz undulierender Expressionsintensitäten zwischen den Zeitpunkten blieb die allgemeine Tendenz bis zum Ende der Isolation oder sogar nach der Rückkehr bestehen. Während die tiefgreifenden psychosozialen Auswirkungen des antarktischen Winters, der Phase der völligen Dunkelheit, die durch kognitive Beeinträchtigungen, Spannungen oder Konflikte zwischen den Teammitgliedern gekennzeichnet sind,⁶¹ und sich im Laufe der Zeit verschlimmern können ("*third quarter phenomenon*")⁷⁸, scheinen die Expressionsmuster auf Transkriptomebene nicht diesem Muster zu folgen. Subtilere Veränderungen zwischen den Zeitpunkten sind nur in funktionellen Tests⁷⁹ sichtbar, die nicht der Fokus dieser Arbeit waren.

Vorangegangene Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Überwinterung auf Concordia nicht nur zur Ausschüttung von Stresshormonen führt, sondern auch die funktionale Immunantwort auf einen Stimulus so verändert, dass eine Hypersensibilisierung entstehen kann.⁷⁹⁻⁸¹ Eine Anpassung scheint hierbei nicht effizient oder in der Expositionszeit noch nicht abgeschlossen zu sein. So zeigte sich während der ersten Woche eine Stressreaktion mit erhöhten Katecholamin- und Adenosinkonzentrationen im Blut aufgrund der Hypoxie zusammen mit einer Hemmung angeborener Immunfunktionen.⁸¹ Dennoch zeigen eine anhaltend niedrigen Sauerstoffsättigung und ein erhöhter pH-Wert im Blut ein Ausbleiben der vollständigen Akklimatisierung an die chronisch hypoxischen Bedingungen.⁸² Unsere Daten stimmen mit diesen Beobachtungen überein und lassen vermuten, dass dasselbe auch für die Signaltransduktion gilt.

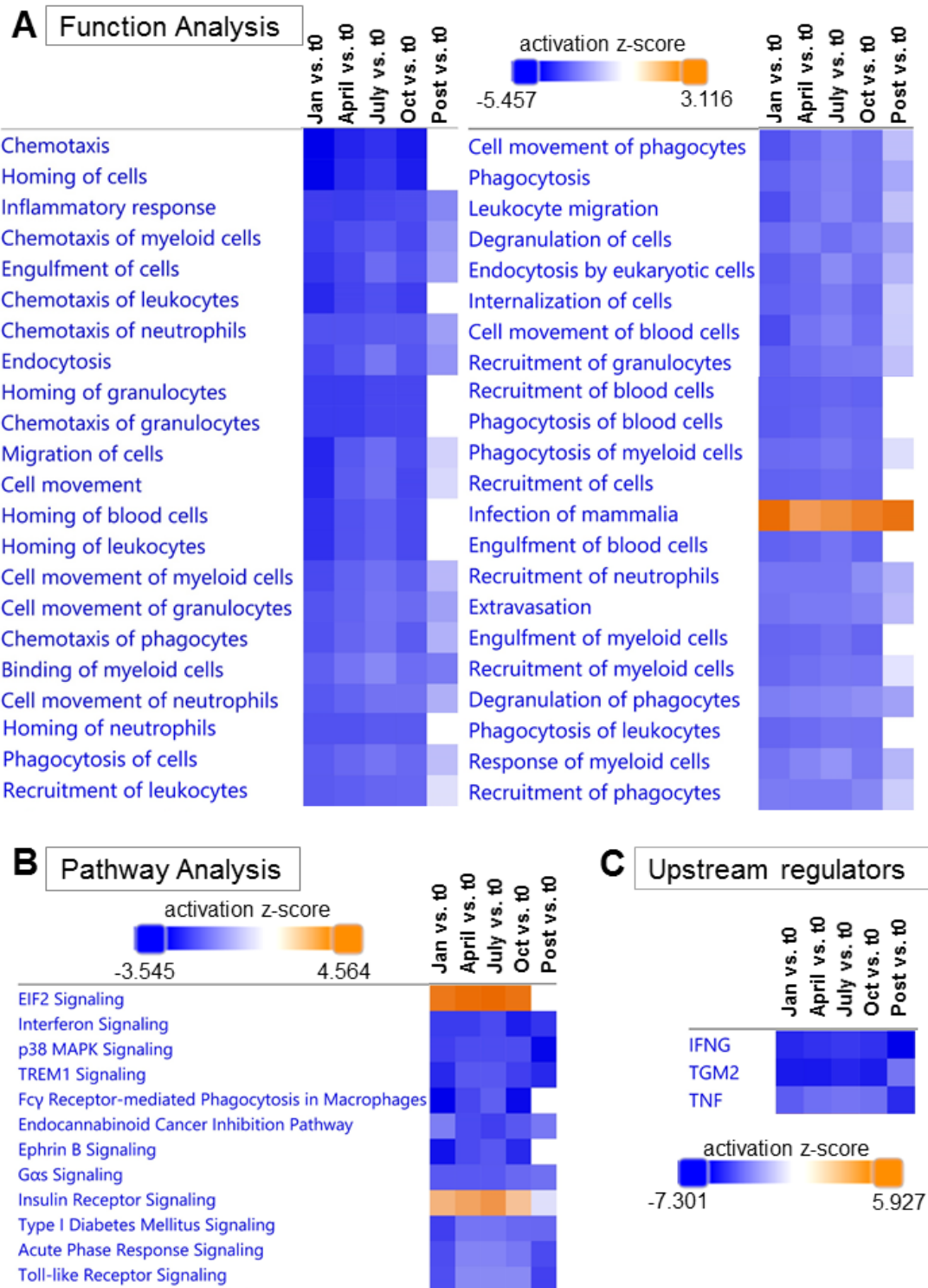


Abbildung 6: Vergleichsanalyse über alle Zeitpunkte⁸³

A: Farbkodierte Darstellung der z-Scores (Heatmap), die die Inaktivierung (negativer z-Score, blau) zahlreicher Immunfunktionen im Vergleich zu t0 zeigt. "Infektion von Säugetieren" war aktiviert (positiver z-score, orange).

B: Heatmap mit z-Scores für die am stärksten veränderten Signalwege im Vergleich zu T0.

C: Heatmap mit den drei am stärksten inaktivierten upstream Regulatoren: IFN γ , Transglutaminase 2 (TGM2) und TNF.

3.2.3 Expressionsanalyse der Signalwege zeigt Anfälligkeit für Virusinfektionen

Die Signalwege IFN γ (Abbildung 7A), p38MAPK (Abbildung 7B) und TREM1 (Abbildung 7C) wurden hinsichtlich der gemessenen Genexpression im Vergleich zu t0 analysiert.

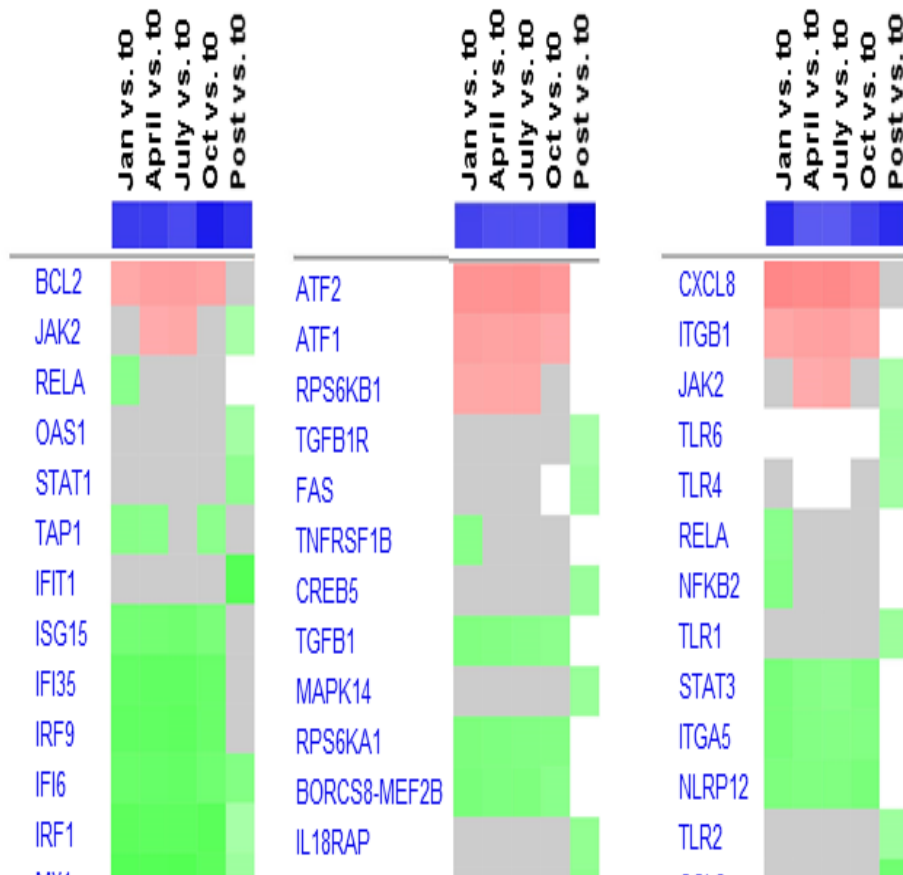


Abbildung 7: Detaillierte Signalweganalyse⁸³

Heatmaps zeigen die Expressionsveränderungen von Genen, die im IFN (A), p38MAPK (B) und TREM1 (C) - Signalweg hoch- (rot) oder herunterreguliert (grün) waren. Nicht signifikante Veränderungen sind grau dargestellt. Die Farbintensität spiegelt das Ausmaß der Expression wider. Oberhalb sind die über alle Zeitpunkte berechneten negativen z-Scores dargestellt. Analyseparameter: Fold Change $\geq |2|$, q-Wert (FDR) $< 0,01$.

Bei den meisten Genen, die im eIF2-Signalweg hochreguliert wurden, handelte es sich um Gene für ribosomale Proteine (RP) (Daten nicht gezeigt). Von den Genen des IFN-Wegs wurden insgesamt 14 Gene an allen Zeitpunkten herunterreguliert und 2 hochreguliert. Die deutlichsten Veränderungen zeigten sich für das Interferon-induzierte Transmembranprotein 2 (IFITM2; Jan: -4,16 (FDR: $p=9.24^{-30}$), April: -4,11($p=1.22^{-34}$), Juli: -4,08($p=1.54^{-31}$), Okt: -4,22($p=1.40^{-30}$), post: n.s.) und 3 (IFTIM3), sowie für Interferon- α Induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3). Die Gene der p38 MAPK- und TREM1-Signalwege, die an allen Zeitpunkten in herunterreguliert wurden, sind an der Zytokinfreisetzung beteiligt, wie z. B. Interleukin-1-Rezeptor (IL1R), IL1-beta (IL1- β) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie 1A (TNFRSF1A). Die Gene des IFN-Signalwegs, die herunterreguliert waren, sind Teil der antiviralen Immunantwort, wie am Beispiel des Zeitpunktes Oktober (Abbildung 8) zu sehen ist.

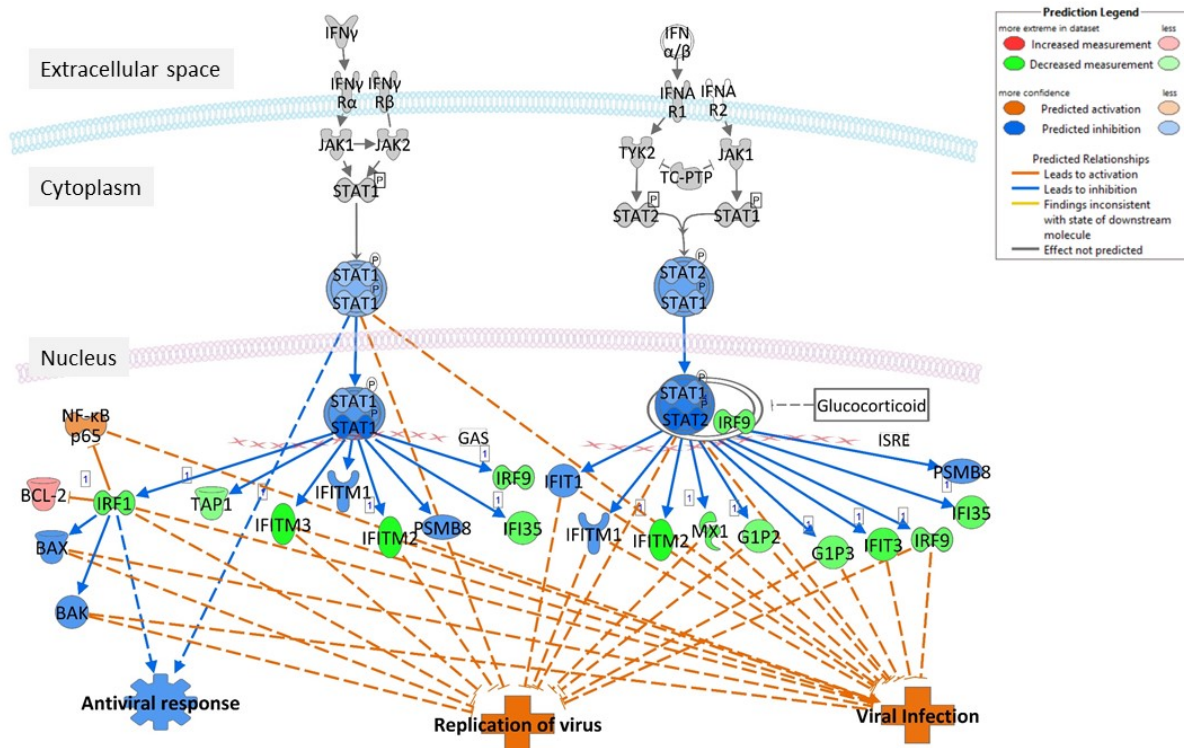


Abbildung 8: Prädiktionsanalyse der gemessenen Expressionsveränderungen am Zeitpunkt Oktober⁸³

Der exemplarisch für Oktober gezeigte IFN-Signalweg mit herunterregulierten (grün), hochregulierten (rot) oder nicht-differenziell exprimierten (grau) Genen. Die Prädiktionsanalyse zeigt Gene und biologische Funktionen farblich kodiert als inaktiviert (blau) oder aktiviert (orange) sind. Pfeile mit spitzem Ende (→) zeigen verstärkte Wirkungen, Pfeile mit einer vertikalen Linie am Ende (—) zeigen inhibierte Effekte, gestrichelte Pfeile zeigen indirekte Wirkungen, gerade Pfeile direkte Wirkungen, Legende oben rechts. Analyseparameter: Fold Change ≥ 2 , q-Wert (FDR) $< 0,01$.

Mehrere IFN-stimulierte Gene (ISG) waren herunterreguliert oder wurden aufgrund einer Inaktivierung von STAT1 als ebenso inaktiviert interpretiert. Andere Zeitpunkte zeigten ein ähnliches Muster (Daten nicht gezeigt). Die Prädiktionsanalyse zeigte, dass die Funktion *antiviral response* inhibiert und die Funktionen *replication of virus* und *viral infection* auf der Grundlage des Genexpressionsmusters aktiviert waren.

Es wurde bereits gezeigt, dass es, wie auch bei Astronauten, zu einer Reaktivierung von Herpesviren (EBV) im Speichel der überwinterten Besatzung kommt.⁸⁴ Der Zusammenhang zwischen Stressexposition z.B. täglicher Arbeits- oder anderer Umweltbelastung und viraler Reaktivierung ist gut beschrieben,⁸⁵⁻⁸⁷ der kausale Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Wir stellten eine starke Aktivierung des eIF2-Signalwegs in Verbindung mit der Inaktivierung der IFN, p38 MAPK und TREM1-Signalwege fest. Von den 14 Genen *downstream* von IFN zeigten IFITM und IFIT die stärksten Expressionsveränderungen. Beide haben wichtige antivirale Eigenschaften.⁸⁸ IFITM-Proteine vermitteln die Restriktion während der Virusfusion mit Wirtszellmembranen, z. B. beim *severe acute respiratory syndrome* (SARS), dem Influenza-A-Virus oder dem Cytomegalovirus.^{89,90} Außerdem werden IFITM2 und 3 von murinen T-Zellen exprimiert und regulieren die Differenzierung von CD4⁺-Helferzellen.⁹¹

Der *eukaryotic initiation factor 2* (eIF2) ist ein wichtiger Vermittler der Initiierung der Translation am Ribosom und ein integraler Bestandteil der zellulären Stressreaktion.^{92,93} IFIT-Proteine üben ihre antiviralen Eigenschaften durch direkte Bindung von nicht-methylierter, fremder mRNA aus. Dadurch kann eIF seine Funktion nicht ausüben und der Translationsprozess viraler RNA wird gehemmt.⁹⁴ Die Kombination aus einer integrierten zellulären Stressreaktion, die die Translation

aktiviert, und der Herunterregulierung von Genen, die für eine wirksame antivirale Abwehr entscheidend sind, weist jedoch auf einen möglichen Mechanismus hin, durch den Personen anfällig für Virusinfektionen werden können.

Zusammengefasst zeigten die Transkriptomprofile aus RNA-Seq Daten, dass zentrale Funktionen des Immunsystems während der mehrmonatigen Isolation in der Antarktis signifikant und nachhaltig inhibiert wurden und so immunologisch eine günstige Ausgangslage für virale Reaktivierungen und Infektionen entstand.

3.2.4 Limitationen und Ausblick

Ein Vergleich der geschlechtsspezifischen Unterschiede war nicht möglich, da auf der Concordia-Station die Zahl der Frauen, die an den Überwinterungskampagnen teilnehmen, zu gering ist. Arbeiten aus unserer eigenen Gruppe, die geschlechtsspezifische Unterschiede bei Überwinterungscrews an der Küstenstation NeumayerIII verglichen, zeigten, dass Frauen eine etwas andere Stressreaktion zeigen.⁹⁵ Es wäre daher interessant, diese Ergebnisse in Zukunft mit dem Transkriptom von Frauen auf Concordia zu vergleichen, RNA-Seq Analysen auf andere antarktische Stationen auszuweiten und die Rolle der epigenetischen Regulierung (z. B. über miRNAs) bei den hier berichteten Genen zu klären. Die Entwicklung von Virusinfektionen (oder anderen Infektionen) nach dem Isolationszeitraum sollte in Zukunft untersucht werden, da eine Nachbeobachtung jedes einzelnen Individuums zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war, wäre aber für künftige Studien zu empfehlen, um die Theorie einer höheren Anfälligkeit für Infektionen, wie sie von den Datensätzen und der Interpretation vorgeschlagen wird, besser zu unterstützen.

3.3 Studien an Astronauten während Langzeitmissionen auf der ISS

Langzeitmissionen zum Mond und zum Mars sind die nächsten zwei großen Meilensteine der bemannten Raumfahrt. Mit dem ersten erfolgreichen unbemannten Mondflug des Orion Raumschiffes innerhalb der Artemis-I-Mission ist eine erneute Mondlandung des Menschen in greifbare Nähe gerückt. Wie bereits erwähnt, sind die Stressoren, die im Rahmen von Langzeitmissionen auf die Astronauten einwirken trotz aller Vorbereitung belastend. So führen die besonderen Lebensbedingungen in Isolation unter Schwerelosigkeit mit Strahlungsexposition und Schlafstörungen durch eine Veränderung des zirkadianen Rhythmus zu Veränderungen der Immunität.

Bereits während der Apollomissionen wurde über eine erhöhte Infektanfälligkeit bei Astronauten berichtet. Bei 15 der 29 Apolloastronauten, also etwa 50%, entwickelte sich eine bakterielle oder virale Infektion während ihrer Mission oder innerhalb einer Woche nach Landung.⁹⁶ In einer 2016 publizierten Analyse der Krankenakten von 46 Astronauten berichteten ebenso ca. 50% der Probanden von einem „erwähnenswerten“ gesundheitlichen Problem, wobei die größte Gruppe (40%) der beschriebenen Symptome Hautexantheme und Infektionen waren.⁹⁷ Trotz aller durchgeführten Präventivmaßnahmen mit Quarantäne und exzellenter Vorbereitung auf die Mission hat sich offenbar an der Inzidenz für immunologische Erkrankungen wenig geändert. Vorarbeiten zeigen, dass sich das Immunsystem durch einen Weltraumaufenthalt z. B. hinsichtlich der Leukozytenpopulationen,⁹⁸⁻¹⁰⁰ der Monozyten- und Granulozytenfunktion,^{101,102} oder der messbaren Plasmazytokinspiegel^{103,104} verändert. Die meisten der verfügbaren Daten basieren jedoch aufgrund der sehr speziellen Untersuchungsbedingungen auf Analysen, die vor oder nach der Mission durchgeführt werden oder sind im Rahmen von Kurzzeitflügen erfolgt.^{105,106}

Die hier zusammengefassten Ergebnisse wurden im Rahmen von Studien an vornehmlich russischen Astronauten (Kosmonauten) erhoben, die eine Langzeitmission auf der ISS absolvierten. Es werden insgesamt 3 Arbeiten präsentiert, von denen zwei im Rahmen der Studie IMMUNO und die dritte Publikation im Rahmen der erst kürzlich beendeten Studie IMMUNO-2 erarbeitet wurden.

3.3.1 Langzeitmissionen führen zu einem reversiblen „Entzündungsaltern“

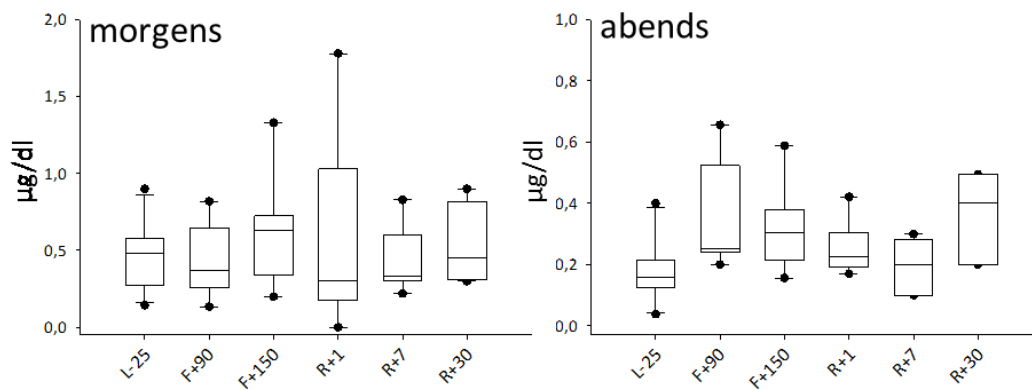
Die IMMUNO-Studie wurde gemeinsam mit der European Space Agency (ESA) und der Russischen Raumfahrtorganisation (ROSCOSMOS) durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der russischen Ethikkommission (*Biomedicine Ethics Committee*) am Institut für biomedizinische Probleme (IBMP), Moskau, evaluiert und erhielt die Protokollnummer MBI-29. Ebenso wurde es von der Ethikkommission der ESA (*ESA Medical Board*) und der russischen Weltraumbehörde evaluiert und genehmigt. Alle Probanden gaben nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung.

Es wurden insgesamt 12 männlichen Probanden rekrutiert, die für eine Langzeitmission (mindestens 140 Tage) auf der ISS geplant waren. Dabei handelte es sich um 11 russische und einen europäischen Astronauten (mittleres Alter 46 Jahre (41/51)) mit einer medianen Missionsdauer von 162 Tagen (142/181). Im Folgenden werden alle Probanden als Kosmonauten bezeichnet. Die Probenentnahme erfolgte zu maximal 6 Zeitpunkten. Die Basisdatenerfassung (BDC) wurde 25 Tage vor dem Flug (L-25) angesetzt und die Probenentnahme nach dem Flug erfolgte am Tag 1 (R+1), am Tag 7 (R+7) und am Tag 30 (R+30) nach der Landung. Zwei Zeitpunkte während des Fluges waren für den Flugtag 90 (F+90) und den Flugtag 150 (F+150) vorgesehen. Am Boden fand die Probenentnahme im *Gagarin Cosmonaut Training Center* (GCTC) in der Nähe von Moskau bzw. am Trainingszentrum des Deutschen Luft und Raumfahrtzentrums (DLR) in Köln, Deutschland statt.

3.3.1.1 Erhebung des Stressniveaus

Die Stressbelastung der Kosmonauten wurde mittels Fragebogen, Cortisol im Speichel und Endocannabinoidspiegeln (2-AG und AEA) im Blut untersucht. Das subjektive Stressempfinden wurde mittels Fragebogen zur aktuellen Beanspruchung (*Current Stress Test, CST*), einem validierten, standardisierten, einseitigen Papierfragebogen erhoben, der innerhalb von 1 Minute durchgeführt werden kann.¹⁰⁷ Alle Kosmonauten berichteten über die gesamte Studienlaufzeit über keine erhöhte Belastung.¹⁰⁸ Die gemessenen Cortisolspiegel im Speichel zeigten starke individuelle Unterschiede in den Morgenspiegeln nach Landung und eine mäßige Erhöhung für die Abendspiegel. Obwohl es zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Cortisolkonzentration im Speichel kam, bilden die undulierenden Abendspiegel den Missionsablauf ab. Hier zeigen sich Einzelwerte die zum Teil über den Morgenspiegeln lagen, was ein Hinweis auf eine individuell unterschiedliche Störung des circadianen Rhythmus ist. Die Evaluation der Aktivität und des Schlafrythmus sollte Teil einer Folgestudie sein. Die Blutkonzentrationen von 2-AG und AEA wurden in Kooperation am Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie, Kreischa mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS/MS) bestimmt. AEA zeigte einen signifikanten Anstieg am zweiten Messzeitpunkt nach ca. 150 Tagen der Mission (F+150), was auf eine Stressreaktion auf die Umgebung und somit eine allostatiche Last an Bord der ISS hinweist. Die Spiegel für 2-AG zeigten ebenso höhere Werte für den ersten Messzeitpunkt nach ca. 90 Tagen auf der ISS (F+90), die jedoch aufgrund individueller Unterschiede statistisch nicht signifikant waren (Abbildung 9).

A Cortisol (Speichel)



B Endocannabinoide (Blut)

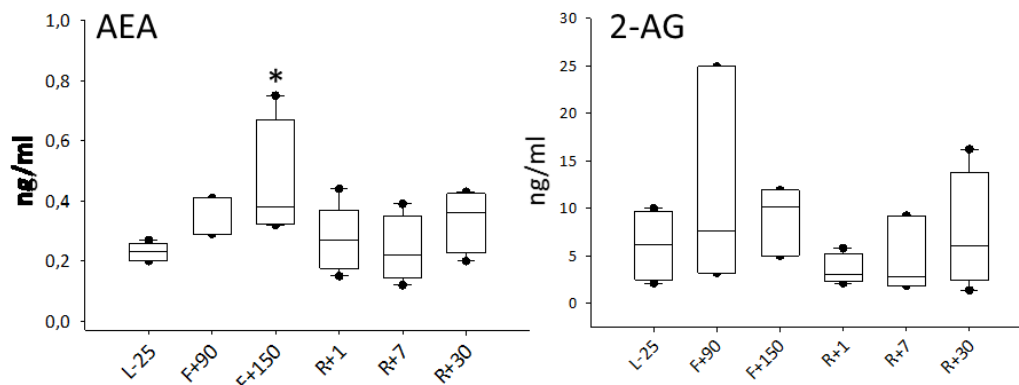


Abbildung 9: eCB Spiegel während Langzeitmissionen (modifiziert nach¹⁰⁸).

A: Cortisolkonzentration im Speichel morgens (links) und abends (rechts) im zeitlichen Verlauf, (n=8)

B: eCB-Spiegel von AEA (links) und 2-AG (rechts) im Blut. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg für AEA am zweiten Zeitpunkt während der Mission, n=5, Median± 95./5. Perzentil (schwarzer Punkt), *P<0,05 im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten.

Ebenso Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass ein Parabelflug zu einer erhöhten Freisetzung von AEA und 2-AG im Blut führt.¹⁰⁹ Die Erkenntnisse aus den weiter oben zusammengefassten *in vitro* Versuchen zeigten, dass das ECS Schlüsselfunktionen der angeborenen und adaptiven Immunität modulieren kann.⁶² Nach einem starken, akuten Stressereignis wie der Landung auf der Erde (R+1) blieben die AEA Werte jedoch niedrig. Es scheint, dass die eCB-Freisetzung durch die Bedingungen im Weltraum und nicht durch den akuten Landungsstress angeregt wird. Somit zeigte sich, dass AEA den chronischen physischen Stress, der durch die allostatiche Last auf der ISS entsteht, gut abbilden kann, auch wenn die Resilienz der Probanden hoch ist und zu keiner psychischen Stresswahrnehmung führt, wie die niedrigen Werte im Selbsteinschätzungsfragebogen zeigen.

3.3.1.2 Effekte der Langzeitmission auf die angeborene Immunität

Die Gesamtzahl der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten war unmittelbar am Tag 1 nach der Landung (R+1) signifikant erhöht.¹⁰⁸ Zudem zeigte sich bei uns eine Abnahme von L-Selektin (CD62L) auf der Zelloberfläche der PML nach Rückkehr (R+1), was auf eine Aktivierung hindeutet. Die gemessene Radikalbildung blieb über den ganzen Beobachtungszeitraum gleich und war auch nach Rückkehr stabil. Es wäre interessant gewesen, die Radikalfreisetzung unter Flugbedingungen mit den

gemessenen AEA-Spiegels zu korrelieren, da das ECS wie bereits gezeigt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der oxidativen Homöostase spielt.¹¹⁰ Aufgrund technischer Limitationen ist dies bisher auf der ISS nicht möglich. Unsere Ergebnisse stimmen weitgehend mit früheren Berichten über Immunveränderungen nach Kurzzeitmissionen⁹⁹ und einer Pilotstudie nach Langzeitmissionen überein.¹⁰⁰ Eine andere Studie zu Kurzzeitmissionen berichteten auch über eine erhöhte Chemotaxis und Adhäsion der PML an Endothelzellen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen nach Langzeitmission, zeigte sich dort aber eine signifikant erhöhte L-Selektin-Expression.¹¹¹ Die beobachteten Erhöhung der Leukozytenkonzentrationen im Blut sind zumindest teilweise durch den Landevorgang ausgelöst, der aufgrund der Kombination von Mikrogravitation, Hypergravitation und starken Vibrationen auch für routinierte Kosmonauten einen akuten physischen Stressor darstellt. Die Daten zeigen, dass diese akute Stressreaktion mit Leukozytenrekretierung bei Kosmonauten aber auch nach einer Langzeitmission noch ausgelöst werden kann.

3.3.1.3 Veränderungen in der adaptiven Immunität

Die im Blutausstrich untersuchte relative Lymphozytenzahl stieg während des Fluges signifikant an. Bei der Untersuchung der Lymphozytenpopulation nach Landung zeigten sich die T-Zellen im Vergleich zu den Werten vor Flug prozentual stabil, es wurde aber eine Zunahme der B-Zellen an R+1 festgestellt. Die Zahl der natürlichen Killerzellen (NK) sank bei R+1 um 60%.¹⁰⁸ Die Besiedlung der ISS u.a. mit Pilzen wie *Aspergillus spp.*,¹¹² die auch in Abstrichen aus Nase und Rachen bei Astronauten nachweisbar sind¹¹³, ist ein bekanntes Problem. NK-Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die Abwehr von Pilzinfektionen, und umgekehrt können Pilze immunsuppressive Wirkungen auf NK-Zellen ausüben.¹¹⁴ Vollblutproben von Kosmonauten, die vor und nach ihrer Langzeitmission für 48 Stunden mit Pilzantigenen stimuliert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine TNF und IL-1 β , bis 7 Tage nach Rückkehr (R+7).¹⁰⁸ Allerdings waren die Plasmaspiegel auch während der Mission deutlich erhöht und sanken nach dem Flug zügig ab, was darauf hindeutet, dass die gemessene überschießende Reaktion nicht einfach auf höhere Plasmakonzentrationen der Zytokine selbst an diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist. Wir konnten also feststellen, dass die Plasmakonzentrationen der Zytokine nicht unbedingt mit der Zytokinantwort nach Antigenstimulation korrelierten (Abbildung 10).

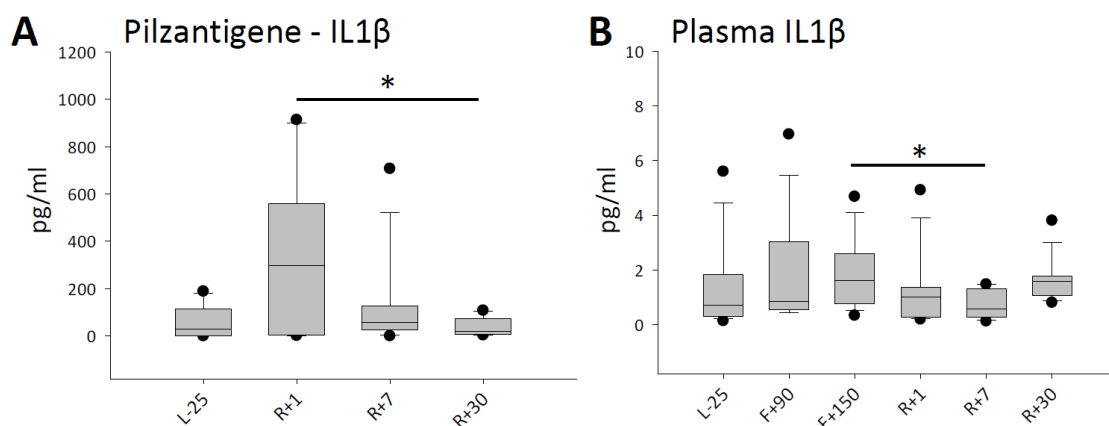


Abbildung 10: Immunantwort auf Pilzantigene Langzeitmissionen (modifiziert nach¹⁰⁸).

A: IL-1 β -Konzentration nach Stimulation mit Pilzantigenen, Median \pm 95./5. Perzentil, n=5, *P<0,05 **B:** IL-1 β Plasmakonzentrationen im Studienverlauf, Median \pm 95./5. Perzentil, n=9 (F+90) bzw. n=11 (F+150), *P<0,05.

Um die deutlich verstärkte Immunreaktion nach Flug zu verstehen, untersuchten wir die antiinflammatorische Kapazität der Probanden. Wir beobachteten einen signifikanten Anstieg der regulatorischen Zytokine IL-1ra, IL-10 und besonders TGF- β während des Fluges, der nach Rückkehr rasch abfiel. Regulatorische (T_{reg}) T-Zellen sind in der Lage, antigenspezifische T-Zell-Reaktionen zu modulieren oder ganz zu unterdrücken.¹¹⁵ TGF- β spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der T_{reg} und ist als Signal für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz entscheidend.^{116,117}

Unsere Phänotypisierungen wiesen eine Verringerung der regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$) nach Rückkehr bis zu Tag 7 um fast 30% auf, was auf eine eingeschränkte Unterdrückung proinflammatorischer Zytokine schließen lässt. Die Veränderungen in den entzündungshemmenden Plasmazytokinkonzentrationen lassen darauf schließen, dass die Funktion der T_{reg} -Zellen nach der Mission reduziert war. Leider stehen T_{reg} Zellzahlen während der Mission nicht zur Verfügung. Somit bleibt die Frage offen, ob eine erhöhte Zahl an T_{reg} für die erhöhte Konzentration regulatorischer Zytokine während der Mission verantwortlich war, oder ob T_{reg} -Zellen bereits während der Mission in ihrer Funktion gehemmt waren und somit die Inflammation nicht unterdrücken konnten. Gleichzeitig beobachteten wir eine Verschiebung der Zellen in Richtung $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen, die bis zum Ende der Studie anhielt, während die Populationen der naiven $CD4^+$ -T-Zellen und der Gedächtniszellen weitgehend unverändert blieben (Abbildung 11).

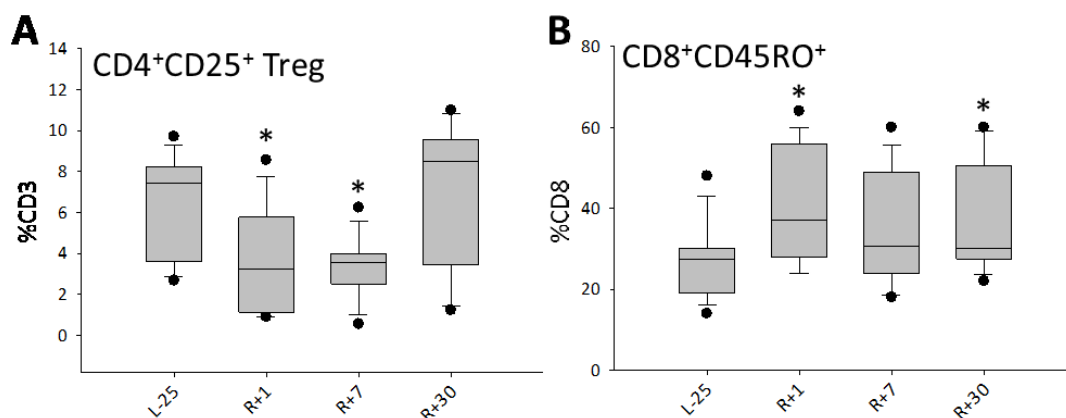


Abbildung 11: T-Zell Verschiebungen nach Langzeitmissionen begünstigen Inflammaging (modifiziert nach¹⁰⁸).
A: Prozentualer Anteil der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen Zellen (T_{reg}) an den $CD3^+$ Zellen im Zeitverlauf, $n=12$
B: Prozentualer Anteil von $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen. Median \pm 95./5. Perzentil, $n=12$, * $P<0,05$ vs. L-25.

Es wurde bereits gezeigt, dass $CD8^+$ -T-Zellen instabiler sind und beim Entzündungsaltern zunehmen.¹¹⁸ Dies hat nicht unbedingt etwas mit dem chronologischen Alter zu tun, sondern ist vielmehr Ausdruck eines Ungleichgewichts zwischen entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Mechanismen.¹¹⁹ Bleiben diese Veränderungen bestehen, könnten sie zu Krankheiten führen, die mit einem Ungleichgewicht des Immunsystems einhergehen, darunter chronische Entzündungen, Autoimmunerkrankungen oder andere entzündungsbedingte Krankheiten.¹²⁰

Zusammengefasst konnte diese Arbeit zeigen, dass eine starke akute Stressreaktion auf ein potenziell lebensbedrohliches Ereignis wie die Rückkehr zur Erde als Immunaktivator wirkt, der unabhängig vom allgemeinen Immunstatus Immunzellen mobilisiert und PML aktiviert. Bei der akuten Stressreaktion werden T-Zellen, wie einleitend bereits erwähnt, auf überlebenskritische Aktionsbereiche wie z.B. die Haut umverteilt, da hier Verletzungen entstehen können, die den Eintritt von Erregern begünstigen. Besteht chronischer Stress und somit ein andauerndes Alarmsignal, reagieren zunehmend weniger T-

Zellen auf die Rekrutierung, wie dies auch bereits während einer Mission bei Hauttests zur verzögerten Immunreaktion nach 48 Stunden nachgewiesen wurde.¹²¹ Zudem zeigte sich auch eine Verringerung der T-Zell-Proliferation und -Aktivität in der Haut.^{122,123} In ähnlicher Weise können bei chronischem Stress eine verzögerte Wundheilung der Schleimhäute und ein Rückgang des Zytokins IL-1 β beobachtet werden.¹²⁴

Ein typisches Muster bei chronischem Stress ist eine Verschiebung hin zu einer T-Helferzellen-Typ-2-Reaktion durch den Rückgang proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1 β , IL-6 und IFN- γ) und höhere Werte entzündungshemmender Zytokine (IL-10, TGF- β).^{125,126} Diese Veränderungen wurden auch in unserer Studie während des Fluges beobachtet, was zeigt, dass die Kosmonauten *allostatic load* ausgesetzt waren, auch wenn sie dies subjektiv nicht als Stress wahrgenommen haben.

Eine chronische Exposition gegenüber Antigenen zusammen mit einer anhaltenden allostatistischen Entzündungsreaktion kann zu einem pathogenen Phänotyp führen, der Merkmale einer vorzeitigen Immunalterung aufweist, die von erhöhten Zytokinplasmaspiegeln und der Anhäufung von Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen geprägt ist.¹²⁷⁻¹²⁹ Dieses so genannte *Inflammaging* oder „Entzündungsaltern“ ist mit einem Risiko für latente Virusreaktivierungen, -infektionen, Allergien oder Autoimmunerkrankungen assoziiert, wie es oft bei älteren Patienten beobachtet wird.¹³⁰⁻¹³³ Die hier gezeigten Daten zusammen mit Vorarbeiten zu Virusreaktivierungen von Mehta et al^{134,135} und den Beobachtungen zu den gehäuft auftretenden Hautexanthemen⁹⁷ weisen darauf hin, dass Langzeitmissionen einen solchen eigentlich altersbedingten Entzündungsphänotyp hervorrufen können, der auch einen Monat nach Rückkehr noch anhält. Um den Pathomechanismus und eventuelle langfristige Folgen für die Gesundheit der Kosmonauten, besser verstehen zu können, sind eine längere Nachbeobachtungsdauer sowie ein weiteres Spektrum an Immunfunktionstest vor allem während des Fluges notwendig.

3.3.2 Veränderungen in der humoralen Immunität

Das humorale Immunsystem von Astronauten ist bisher noch nicht ausreichend untersucht. In einer ersten Studie bei US-Astronauten konnte zwar gezeigt werden, dass die gemessene Menge an Immunglobulin (Ig) G während Langzeitaufenthalten und der Anteil der zirkulierenden B-Zell-Untergruppen konstant bleibt,¹³⁶ andere Daten basierend auf Tiermodellen zeigten jedoch, dass die Gentranskripte der schweren Ketten von IgM durchaus verändert werden.^{137,138}

Immunglobuline der Klasse M bestehen aus zwei schweren Ketten (*heavy chain*, H) und zwei kurzen, leichten Ketten (*light chain*, L). Die H- Ketten enthalten vier konstante (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}) Anteile und eine variable (V_H) Region, die zusammen mit der variablen Region der L-Kette (V_L) die Antigenbindungsstelle generiert. Die Entstehung einer funktionsfähigen, schweren Kette ist ein zentraler Schritt bei der B-Zellreifung im Knochenmark. Die Variabilität der Antigenbindungsstelle wird dabei durch die somatische Rekombination der DNA-Genabschnitte (V= *variable* (D= *diversifying*) J= *joining*) im Genlocus der schweren Kette (IGH) erreicht. Initial kommt es bei der Rekombination der schweren Kette zu einer Verknüpfung eines D- und eines J-Segments, bevor dies an ein *upstream* liegendes V-Segment angefügt wird. Das Vorliegen mehrerer Kopien der Segmente (V:44, D:27, J:6) ermöglicht so die variable Kombination.^{139,140} Die Beobachtung einer höheren Anzahl von B-Zellen am Tag nach der Rückkehr zur Erde führte zu einem Folgeprojekt gemeinsam mit der Forschungsabteilung „Stress, Immunité, Pathogènes-SIMPA“ der Universität Lothringen, in dem wir das IgM-Repertoire von einer Subgruppe der IMMUNO-Probanden näher untersuchten.

Fünf Kosmonauten aus der IMMUNO-Studie (Durchschnittsalter von 48 ± 2 (*Interquartile range*, IQR, zwischen 39 und 54 Jahre)) wurde zu den oben genannten Zeitpunkten mittels *transcription profiling* untersucht. Die Besonderheit bei diesem Projekt war das Hinzufügen einer Kontrollgruppe aus Normalpersonen, mit der die Ergebnisse verglichen wurden. Die Kontrollgruppe wurde nach den folgenden Kriterien ausgewählt: (a) erwachsen, (b) männlich, (c) Alter >35 Jahre, (d) keine systemische Pathologie und (e) keine tägliche Medikamenteneinnahme und bestand aus vier Männern mit einem Durchschnittsalter von 41 ± 4 (IQR, zwischen 36 und 46 Jahren). Die lokale Ethikkommission der LMU München, genehmigte das Protokoll für die Kontrollgruppe unter den Protokollnummern 025/02 und 269-15. Alle Probanden gaben ihre schriftliche Einwilligung nach gründlicher Aufklärung und ausreichend Bedenkzeit. Von diesen Freiwilligen wurden zu den Zeitpunkten Kontrolle (T0) und nach 8 Monaten (T+8) Proben entnommen.

3.3.2.1 Sequenzierungsdaten und Analyseworkflow

Die RNA-Extraktion und Sequenzierung wurde am Partnerinstitut durchgeführt. Für die RNA-Seq-Analysen wurde die aus 300 μ L Vollblut gewonnene Gesamt-RNA beider Gruppen, zunächst mittels *random primer* und MML-V reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die variablen Leader (VHL) und *Joining* (JH) Genregionen der schweren Immunglobulinkette der IgM-cDNA mittels LymphoTrack® IGHV Leader Somatic Hypermutation MiSeq Kit schließlich auf einer MiSeq Illumina-Plattform UMS2008 der Universität Lothringen (Vandoeuvre-les-Nancy, Frankreich) sequenziert. Die Sequenzierungsdaten wurden im NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) unter der Zugriffsnummer PRJNA627324 hinterlegt. Die Sequenzen wurden zunächst mit der LymphoTrack® IGH SHM MiSeq-Software und anschließend mit der Software IMGT/High V-quest (<http://www.imgt.org>) bearbeitet.¹⁴¹ Zusätzlich wurden die Daten mit einer Software der Partneruniversität¹⁴² analysiert und folgende Parameter kalkuliert:¹⁴³

i) Häufigkeit der einzelnen IGHV, IGHD und IGHJ Segmente; *ii*) die Häufigkeit von sogenannten IGHV *replacement footprints* (Ersatzsignaturen) nach Lange et al.¹⁴⁴, *iii*) die Anzahl der Nukleotide, die beidseits der IGHD Segmente, der 3'-IGHV und 5'-IGHJ-Enden entfernt wurden; und *iv*) Assoziationen von IGHV-Segmenten der Untergruppen IGHV3 und IGHV4 mit den Segmenten IGHJ4 bis IGHJ6.

3.3.2.2 Untersuchungen zur B-Zellreifung

Wir bestätigten zunächst in der Subgruppe die Ergebnisse aus der gesamten IMMUNO-Kohorte, dass es am Tag nach Landung zu einem Anstieg des prozentualen Anteils an CD19⁺ B-Zellen im Lymphozytenkompartiment kam (L-25: $11,58 \pm 6,54\%$ vs. R+1: $16,11 \pm 6,88\%$, $P = 0,025$), während der Prozentsatz der CD19⁺ B-Zellen in der Kontrollgruppe über 8 Monate hinweg stabil blieb (T0: $14,48 \pm 5,96\%$ vs. T+8m: $13,23 \pm 4,92\%$, $P = 0,738$). Dieser Anstieg normalisierte sich innerhalb von sieben Tagen. B-Zell Subtypen konnten nicht bestimmt werden, da keine Frischblutproben für dieses Projekt zur Verfügung standen. Während der B-Zell-Differenzierung ist IgM der einzige Isotyp, der von unreifen B-Zellen exprimiert wird. IgD wird erst dann exprimiert, wenn die B-Zelle das Knochenmark verlässt, also einen reifen Zustand erreicht.¹⁴⁰ Die mittels qRT-PCR gemessenen, relativen mRNA-Expressionsniveaus der schweren IgM- und IgD-Ketten blieben über den Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen stabil, sodass der beobachtete Anstieg nicht z.B. durch eine Zunahme von naiven oder reifen IgM-Gedächtnis-B-Zellen begründet war,¹⁴⁵ wie dies auch bereits in der bereits publizierten Studie zu Langzeitmissionen gezeigt wurde.¹³⁶

3.3.2.3 Unterschiede im IgM-Repertoire bestehen bereits vor der Mission

Zunächst stellten wir fest, dass eine große Menge an IGHV1-, IGHV3-, IGHV4-, IGHD1-, IGHD2-, IGHD3- und IGHD6-Untergruppen sowie an IGHJ4-, IGHJ5- und IGHJ6-Segmenten in den IGMH-Transkripten in beiden Gruppen vorlag, was mit Studien an gesunden Erwachsenen übereinstimmt.¹⁴⁶ Darüber hinaus war die Verwendung dieser IGHV- und IGHD-Untergruppen sowie einzelner IGHJ-Segmente bei Kontrollpersonen und Kosmonauten ähnlich, was darauf hindeutet, dass die natürlichen Unterschiede in den Untergruppen und Segmentverwendungen durch eine Langzeitmission nicht beeinflusst wurden.¹⁴³

Mit Hilfe der eigenen Software des Partnerinstituts wurde für die Daten ein Verteilungsindex (*dispersion index*) berechnet, anhand dessen Aussagen über bestehende Unterschiede in den VDJ-Assoziationen der IGHV-, IGHD- und IGHJ-Gensegmenten bei Kontrollpersonen und Kosmonauten im Zeitverlauf getroffen werden können.¹⁴² Die Indizes der Kontrollpersonen bei T0 wurden mit denen der Kosmonauten vor dem Start (L-25) und die der Kontrollpersonen nach 8 Monaten mit denen der Kosmonauten 7 Tage nach der Landung (R+7) verglichen (Abbildung 12).

Die Verteilungsindizes und damit die VDJ-Kombinationen in den schweren IgM-Ketten waren bei Kontrollpersonen über den Beobachtungszeitraum von acht Monaten stabil. Diese Stabilität wurde bereits für das IGHV-Repertoire des adulten peripheren Blutes gezeigt¹⁴⁷ und war somit erwartet. Es fanden sich jedoch zu beiden Zeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Somit unterschied sich das IgM-Repertoire der Kosmonauten bereits vor dem Flug und auch nach der Landung von dem der Kontrollpersonen signifikant. Diese Beobachtung wurde gestützt durch die Analyse der IGHV *replacement footprints* (Ersatzsignaturen) nach Lange et al.¹⁴⁴, die aus dem Austausch von IGHV-Segmenten resultierten.

IGHV-Ersatzsignaturen entstehen durch die sekundäre Rekombination von zuvor neu rekombinierten IGHV-Segmenten über *recombination activating genes* (RAG). Bei diesem Prozess wird fast die gesamte kodierende V-Region erneuert, wobei jedoch ein kurzer Abschnitt von Nukleotiden als „Fußabdruck“ an der neu entstandenen IGHV-IGHD-Schnittstelle erhalten bleibt. Dieser Prozess ermöglicht die Rettung von B-Zellen, die z. B. nach einer V(D)J-Rekombination non-funktionale Sequenzen zeigen, und ist somit an der Bildung des primären Repertoires während der B-Lymphopoese beteiligt.¹⁴⁸

Wir stellten auch für die Ersatzsequenzen ähnliche Unterschiede zwischen den Gruppen fest. Es ist unwahrscheinlich, dass dieser Unterschied auf eine lebenslange Exposition gegenüber Krankheitserregern in verschiedenen Ländern zurückzuführen ist, da ein Kosmonaut aus demselben Land wie die Kontrollpersonen stammte und dieselben Veränderungen im IgM-Repertoire aufwies wie die anderen Kosmonauten. Naheliegender ist eine sekundäre Veränderung der B-Lymphopoese, da mehr RAG-vermittelte sekundäre Rekombination von bereits rekombinanten IGH-Gensegmenten stattfand, wie die Untersuchung zu den IGHV-Ersatzsignaturen zeigt. Der beobachtete Unterschied im Repertoire lässt sich am ehesten auf die besonderen Maßnahmen zurückführen, die Kosmonauten zur Vorbereitung auf den Weltraumflug absolvieren müssen, denn es wurde bereits gezeigt, dass Training die humorale Immunität beeinflussen kann.^{149,150}

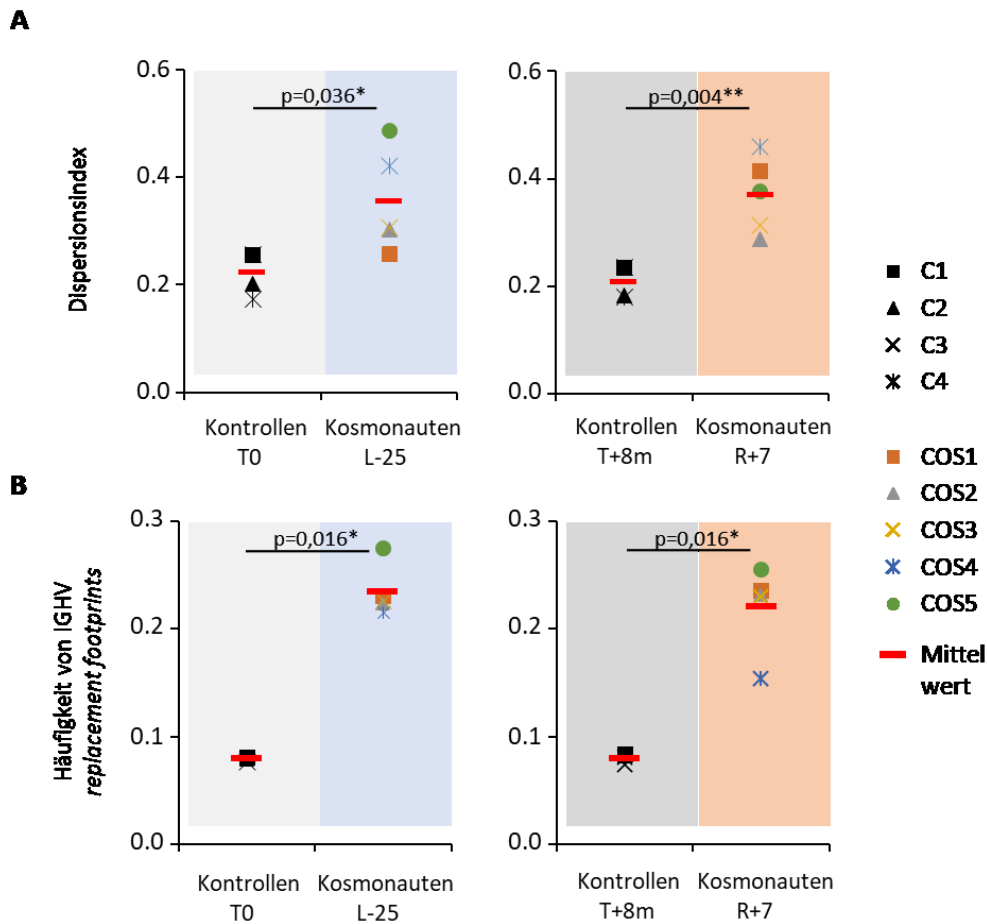


Abbildung 12: IgM-Repertoire der Kosmonauten (modifiziert nach¹⁴³).

A: Dot-Blots mit individuellen Dispersionsindizes für VDJ-Assoziationen der Kontrollen (C1-C4, n = 4) und Kosmonauten (COS1-COS5, n = 5) zu Beginn der Studie (links) und 8 Monate später bei Kontrollen oder 7 Tage nach Landung bei Kosmonauten (rechts). **B:** Dot-Blots mit der Häufigkeit von IGHV-Ersatzsequenzen zu denselben Zeitpunkten. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

3.3.2.4 Individuelle Immunmodulation durch erhöhte Stressexposition

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Mittelwerte der für die Kontrollen bei T0 und T+8m ermittelten Dispersionsindizes als Referenzkonfidenzintervall festgelegt und mit den einzelnen Kosmonauten verglichen. Die Unterschiede wurden mit Hilfe von Heatmaps dargestellt, wobei farbliche Veränderungen Unterschiede zu den Kontrollen anzeigten. Zwei Kosmonauten (COS4 und COS5) lagen stets über der oberen Grenze des Konfidenzintervalls. Somit waren ihre VDJ-Assoziationen variabler als die der Kontrollen. COS1, 2 und 3 verhielten sich ähnlich zu den Kontrollen.¹⁴³ Die gleichen Analysen wurden für VDJ-Assoziationen mit IGHV-Segmenten der am häufigsten exprimierten IGHV-Untergruppen (IGHV3 und IGHV4) und den am häufigsten verwendeten IGHJ-Segmenten (IGHJ4 bis IGHJ6) durchgeführt (Abbildung 13).

Diese Analysen bestätigten, dass das IgM-Repertoire von COS4 und 5 während des Aufenthalts auf der ISS, aber auch während des 30-tägigen Nachbeobachtungszeitraums nach Rückkehr stärker verändert war als das von COS1, 2 und 3. Somit war die Diversität der schweren IgM-Ketten bei zwei der fünf untersuchten Kosmonauten verändert. Zudem zeigte sich, dass auch einige spezifische Verbindungen (IGHV3-48 mit IGHJ5 und IGHV3-23 mit IGHJ6) bei allen Kosmonauten im Vergleich zu den Kontrollen verschieden waren

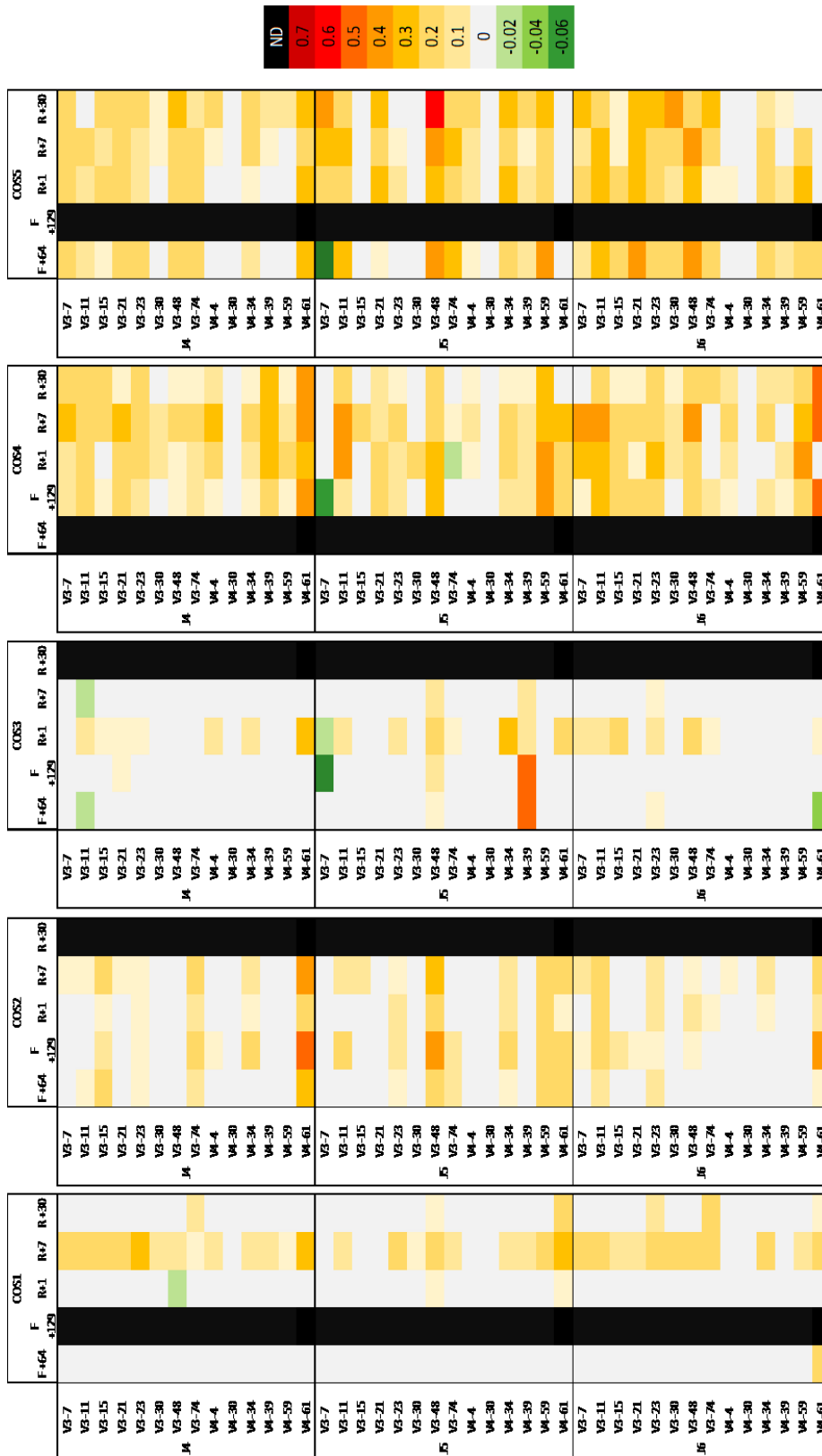


Abbildung 13: Einfluss auf das individuelle IgM-Repertoire.¹⁴³

Heatmap, mit der farblichen Darstellung der Dispersionsindizes der am häufigsten exprimierten IGHV-Untergruppen (IGHV3 und IGHV4) und den am häufigsten verwendeten IGHJ-Segmenten (IGHJ4 bis IGHJ6) im funktionellen IgM-Repertoire einzelner Probanden (COS: Kosmonauten 1-5) im Vergleich zum Referenzkonfidenzintervall der Kontrollpersonen. Dispersionsindizes in Gelb bis Rot liegen über bzw. in Grün, liegen unter dem Kontrollintervall. Die schwarzen Rechtecke entsprechen nicht verfügbaren Proben, graue Rechtecke bedeuten keinen Unterschied.

Zur weiteren Charakterisierung der Veränderungen bei COS 4 und COS 5 untersuchten wir anschließend die hypervariablen Regionen der Antigenbindungsstelle von IgM. Die *complementarity-determining region 3* (CDR3) -Region der H-Kette besteht aus dem 3'-Ende des IGHV, des gesamten IGHD und dem 5'-Ende der IGHJ-Gensegmente, die während der V(D)J-Rekombination zusammengefügt werden. Die Anzahl der einzelnen Aminosäuren an jeder Position innerhalb der CDR3-Regionen zwischen 9 und 24 Aminosäuren (AA) wurde mit Weblogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>) bestimmt und erneut Dispersionsindizes berechnet.

Die durchschnittliche Länge der IgM CDR3 betrug 15,7 AA in Kontrollpersonen und Kosmonauten, ein Wert, der sehr nahe an dem Wert (15,5 AA) liegt, der in einer bereits durchgeführten Studien an gesunden Probanden ermittelt wurde.¹⁴⁶ Die CDR3-AA-Zusammensetzung in COS4 und COS5 war während der Langzeitmission und nach Rückkehr stärker variabel als in COS1, 2 und 3. Somit veränderte die Langzeitmission die CDR3-Schleifen, aus denen die IgM-Bindungsstellen bestehen.¹⁴³

Um zu evaluieren, ob die beobachteten Veränderungen auf eine Modifikation des V(D)J-Rekombinationsprozesses zurückzuführen sein könnten, untersuchten wir die von RAG-Proteinen 1 und 2 hinterlassenen Signaturen in den IgM-Transkripten. Während der V(D)J-Rekombination schneiden diese Proteine die DNA zwischen kodierenden Segmenten und RSS. Dabei können einige Nukleotide (nt) am 3'-Ende von IGHV, auf beiden Seiten von IGHD und am 5'-Ende von IGHJ-Segmenten entfernt werden. Daher untersuchten wir die Länge der IGHD sowie die von den IGHV- und IGHJ-Gensegmenten gestrichenen Nukleotide im Vergleich zur Kontrollgruppe, berechneten wie zuvor Dispersionsindizes und erstellten Heatmaps.¹⁴³ Auch hier lagen COS4 und COS5 systematisch über dem Konfidenzintervall der Kontrolle für zwei der drei von RAG hinterlassenen Signaturen (IGHD-Länge und nt an den 5'-IGHJ-Enden entfernt). Der Vergleich der Ergebnisse von COS1, 2 und 3 mit denen von COS4 und 5 diesen Unterschied, was darauf hindeutet, dass die RAG1/2-Aktivität in COS4 und COS5 während der Langzeitmission verändert wurde.

Schließlich untersuchten wir die Stressexposition in der Subgruppe der Kosmonauten mittels der bereits oben erwähnten Methoden Fragebogen und Cortisolkonzentration im Speichel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier konnten wir im Gruppenvergleich zwischen COS1 – 3 und COS4 und 5 zeigen, dass die abendlichen Cortisolwerte bei F+64 während der Mission und am Tag 1 nach Rückkehr einen signifikanten Anstieg aufwiesen, der auf COS4 und COS5 zurückzuführen war. Diese Gruppenvergleiche zeigten keine Unterschiede in den morgendlichen Cortisolwerten, jedoch waren die abendlichen Cortisolwerte bei Kosmonauten generell höher als die der Kontrollgruppe (T0: $0,03 \pm 0,03 \mu\text{g/dl}$ im Vergleich zu L-25: $0,13 \pm 0,06 \mu\text{g/dl}$, $p = 0,01$). Besonders erwähnenswert ist, dass COS5 aus unbekanntem Gründen ungewöhnlich hohe morgendliche Cortisolwerte bei F+64 und hohe abendliche Cortisolwerte bei R+1 aufwies, was möglicherweise auf die ballistische Flugbahn bei der Rückkehr zur Erde zurückzuführen war, bei der die Versuchsperson während der Landephase 8g ausgesetzt, was selbst für einen trainierten Kosmonauten eine ungewöhnliche akute Stressbelastung darstellt.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass sich das IgM-Repertoire der Kosmonauten bereits vor der Langzeitmission von dem der Kontrollpersonen unterschied und dass zwei der fünf untersuchten Kosmonauten während ihrer Mission signifikante Veränderungen in ihrem IgM-Repertoire aufwiesen. Diese Veränderungen hielten bis zum Ende der Studie an, wirkten sich wahrscheinlich auf die Spezifität der IgM-Bindungsstellen aus, korrelierten mit Veränderungen im V(D)J-Rekombinationsprozess, der für die Bildung von Antikörpern verantwortlich ist, und fielen mit einer erhöhten Stressreaktion zusammen. Zudem zeigen die Daten, dass das humorale Immunsystem trotz intensiver Vorbereitung individuell unterschiedlich auf die Bedingungen im Weltraum reagiert. Dies betont erneut, dass ein

personalisierter Ansatz nicht nur bei der Vorbereitung und Prävention, sondern auch bei der Nachbeobachtung von Weltraummissionen verfolgt werden sollte.

3.3.3 Veränderungen bekannter Biomarker für Gehirnverletzungen und -degeneration nach Langzeitmissionen.

Wie zu Beginn erläutert (siehe Unterabschnitte 1.1 und 1.2), ist das Gehirn das zentrale Verschaltungsorgan bei der Verarbeitung von Stress. Ein zentrales neuronales Monitoring wäre in der Weltraumumgebung also besonders interessant. Die Selbsteinschätzung von psychischem Stress durch Fragebögen ist bei dieser sehr speziellen Probandenkohorte jedoch wenig aussagekräftig.¹⁰⁸ Bereits kurz nach Ankunft auf der ISS kommt es bei Astronauten durch die fehlende Gravitationskraft zu deutlich sichtbaren, kopfwärts gerichteten Flüssigkeitsverschiebungen. Die Gesichter von Astronauten erscheinen geschwollen, was als sogenanntes „*puffy-head/bird-legs*“ bekannt ist.¹⁵¹ Die damit einhergehenden und gut dokumentierten Visusverschlechterungen, zusammengefasst unter dem Begriff *Spaceflight Associated Neuro-Ocular Syndrome* (SANS) sind in diesem hochsensiblen Arbeitsplatz äußerst gefährlich und belastend.¹⁵²

Die Frage nach der neuronalen Homöostase und die Suche nach geeigneten Biomarkern für ein neuronales Monitoring führte im Rahmen einer Folgestudie zusammen mit dem Institut für diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie am LMU Klinikum München. Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse basieren auf der Studie „*Consequences of Stress Challenges on stress response systems and Immunity in Space: a multidisciplinary approach* (IMMUNO2)“. Das Protokoll des Folgeprojekts der IMMUNO-Studie wurde von der russischen Ethikkommission (*Biomedicine Ethics Committee*) am Institut für biomedizinische Probleme (IBMP), sowie von der Medizinischen Kommission der ESA, dem Human Research Multilateral Review Board (HRMRB) und der Russischen Weltraumorganisation (Roscosmos) evaluiert und genehmigt. Die lokale Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München bewertete das Protokoll ebenfalls (Protokollnummer 245-14). Alle Probanden gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis.

Im Vorfeld unserer Studie konnte mit Hilfe von kranialen kernspintomographischen Volumenmessungen vor und nach Aufenthalt auf der ISS gezeigt werden, dass es nach Rückkehr aus der Schwerelosigkeit eine deutliche Vergrößerung des Liquorraums gibt, die nur zum Teil reversibel ist. Zudem kam es in zu einer Reduktion der grauen Substanz in den analysierten Datensätzen.^{153,154} Die intrakranielle Expansion der Liquorräume scheint also auf Kosten der grauen und weißen Substanz zu gehen. Dies lässt auf eine reduzierte Liquorresorption auf der ISS schließen und lässt eine chronische Schädigung des Gehirns durch das Auftreten von erhöhtem Hirndruck vermuten. Da man den intrakraniellen Druck nicht auf der ISS messen kann und Liquor als Probe von Astronauten nicht für Studien zur Verfügung steht, stellte sich die Frage, ob es im Blut Hinweise auf eine neuronale Schädigung bei Kosmonauten gibt.

Hierzu untersuchten wir das Serum von fünf Kosmonauten mittels hochsensitivem *single molecule array* (Simoa) vor und nach Ihrer Langzeitmission, die durchschnittlich 169 Tage dauerte auf *neurofilament light chain* (NFL), *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), die amyloid beta Proteine 40 (A β 40) und 42 (A β 42) und auf *total tau* (t-tau). Fünf männlichen Kosmonauten (Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM), Alter 49,2 \pm 2,7 Jahre) wurden vor und nach einer sechsmonatigen Mission an Bord der ISS Blut abgenommen und Serum gewonnen. Die Probenentnahme am Boden erfolgte im Gagarin Cosmonaut Training Center in der Nähe von Moskau an Tag 20 vor Missionsstart (L-20, n = 5) und nach Landung an den Tagen 1 (R+1d, n = 5), 7 (R+7, n = 5) und 21-25 (R+21, n = 5). Diese Kohorte hatte auch an der zuvor zitierten MRT-Studie (*Brain-DTI*) teilgenommen, sodass etwaige

Veränderungen im Blut mit den nachgewiesenen morphologischen Veränderungen im Gehirn korrelierten.

Alle Simoa-Analysen wurden im *Institute of Neuroscience and Physiology* der Universität Göteborg in Mölndal, Schweden, mit einer Teilverblindung durchgeführt. Den Untersuchern waren der Zeitpunkt und die Identität der Probanden unbekannt. Die Proben wurden in Doppelansätzen unter Verwendung des HD-X-Analysegerät (Quanterix Billerica, MA, USA) analysiert. Zwischen den Duplikaten bestand ein Intra-Assay-Variationskoeffizient (CV) kleiner 5 % (NFL, GFAP, A β -Peptide) bzw. kleiner 10% (t-tau). Es wurden bei dieser Untersuchung keine Korrekturen für Mehrfachvergleiche durchgeführt, bei hypothesengesteuerten Studien in kleinen Kohorten mit einer begrenzten Anzahl von Vergleichen einen Verzicht zulassen.¹⁵⁵

Von den fünf untersuchten bekannten Biomarkern für Neurodegeneration zeigte sich bei NFL, GFAP, A β 40 und A β 42 ein signifikanter Anstieg nach Rückkehr, (Abbildung 14).

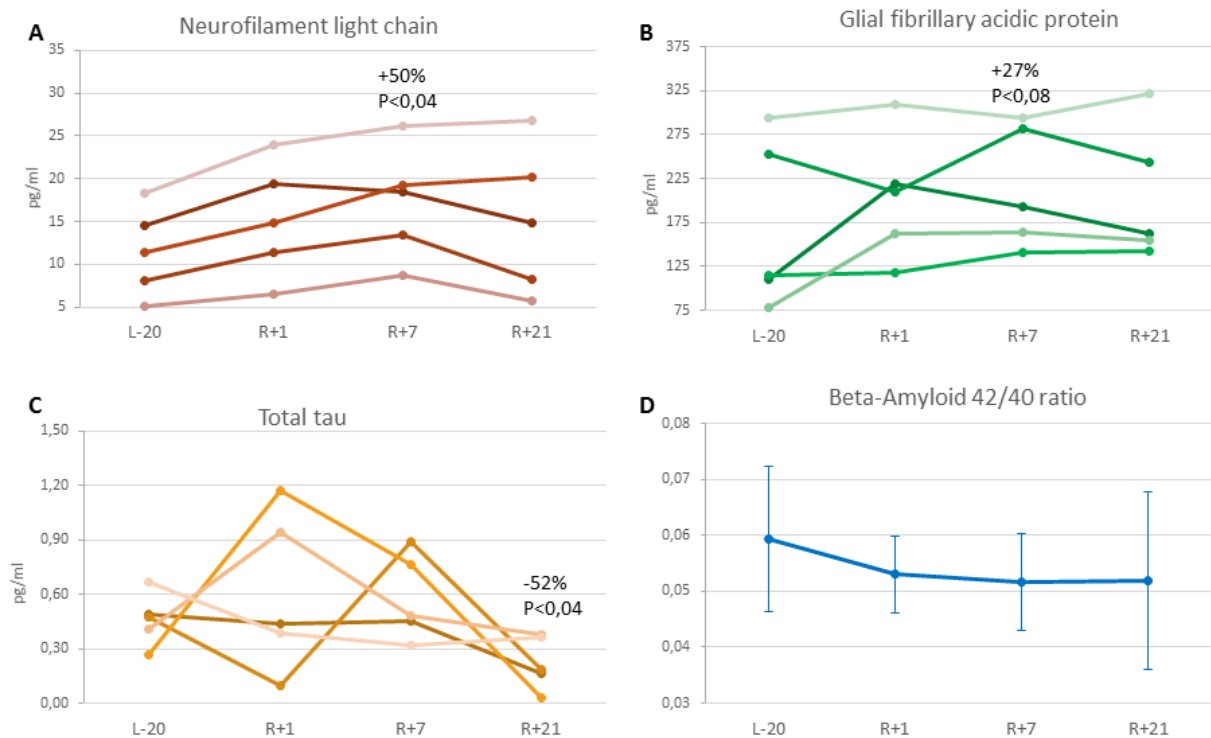


Abbildung 14: Nachweis von Biomarkern für neurologische Schäden im Blut (eigene Darstellung).

A: Liniendiagramm mit den Blutkonzentrationen von NFL, individuelle Verläufe ($n = 5$), die maximale Zunahme betrug 50% ($P < 0,04$) an Tag 7 nach Rückkehr. **B:** Liniendiagramm mit den Blutkonzentrationen von GFAP, individuelle Verläufe ($n = 5$) die maximale Zunahme betrug 27% ($P < 0,08$) an Tag 7. **C:** Liniendiagramm mit den Blutkonzentrationen von t-tau, individuelle Verläufe ($n = 5$), hier kam es zu einem Abfall um 52% in der 3. Woche nach Rückkehr. **D:** Liniendiagramm mit den Mittelwerten der A β 42/A β 40 Ratio ($n = 5$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

Das axonale Strukturprotein NFL war an Tag1 um 33% und an Tag 7 um 50% erhöht, was auf einen axonalen Schaden schließen lässt (MW \pm SEM, L-20: 11,4 \pm 2,3 pg/ml, R+1: 15,2 \pm 3 pg/ml, $p < 0,008$ und R+7: 17,2 \pm 2,9 pg/ml, $p < 0,003$). GFAP, das typischerweise in Astrozyten vorkommt und ein Marker für einen traumatischen Hirnschaden ist, zeigte einen Anstieg um 20%(Tag1) bzw. 27%(Tag7), (L-20: 169 \pm 43 pg/ml, R+1: 203 \pm 32 pg/ml, $p < 0,292$; R+7: 215 \pm 31 pg/ml, $p < 0,057$; R+21: 205 \pm 34 pg/ml,

$p < 0,070$). A β 40 (L-20: 100 ± 17 pg/ml) war während der gesamten Nachbeobachtungszeit nach dem Flug deutlich erhöht (R+1: 156 ± 16 pg/ml, $p < 0,075$; R+7: 183 ± 18 pg/ml, $p < 0,021$; R+21: 167 ± 20 pg/ml, $p < 0,017$), während die A β 42-Werte (L-20: $5,63 \pm 0,7$ pg/ml) nach der Rückkehr zur Erde einen ähnlichen, aber geringeren Anstieg zeigten (R+1: $8,43 \pm 1,21$ pg/ml, $p < 0,125$; R+7: $9,63 \pm 1,4$ pg/ml, $p < 0,061$; R+21: $8,60 \pm 1,4$, $p < 0,100$). Die A β 42/A β 40 Ratio war jedoch 3 Wochen nach Rückkehr signifikant reduziert. T-tau (L-20: $0,46 \pm 0,06$ pg/ml) als neuronaler Biomarker zeigte einen nicht signifikanten Anstieg im Verlauf der ersten Woche (R+1: $0,60 \pm 0,19$ pg/ml, $p < 0,594$; R+7: $0,58 \pm 0,10$ pg/ml, $p < 0,488$), aber einen signifikanten Abfall unter die Werte vor dem Flug drei Wochen nach der Rückkehr (R+7: $0,22 \pm 0,06$ pg/ml, $p < 0,012$).

Eine Korrelationsanalyse zwischen den fünf verschiedenen Biomarkern und der Missionszeit (Tage ab dem Ausgangswert) zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen den NfL-, GFAP- und A β 40-Werten über alle Probanden und Zeitpunkte hinweg. GFAP korrelierte mit NfL ($r = 0,528$, $p = 0,018$). GFAP korrelierte mit A β 40 ($r = 0,502$, $p = 0,024$) und NfL korrelierte (wenn auch nicht signifikant) mit A β 40 ($r = 0,428$, $p = 0,060$). Diese mutmaßliche dreifache Assoziation spricht für eine verteilte und generelle Reaktion des Hirngewebes, die nicht auf einen Zell- oder Gewebetyp beschränkt ist. A β 40 und A β 42 korrelierten signifikant mit der Anzahl der Tage seit Beginn der Mission (A β 40 $r = 0,618$, $p = 0,004$; A β 42 $r = 0,484$, $p = 0,030$).

Einerseits könnte es sich um Reparationsprozesse nach der lang anhaltenden Druckbelastung durch die nach kranial gerichtete Flüssigkeitsverschiebung bis zu drei Wochen nach dem Flug handeln, um schließlich die beeinträchtigte Integrität der Blut-Hirn-Schranke in 1g wiederherzustellen.¹⁵⁶ Die gleichzeitigen Anstiege von NfL und GFAP im Vergleich zum Ausgangswert vor dem Start sprechen für einen vorwiegend astrozytären und axonalen Auflösungsprozess nach einer Langzeitmission.¹⁵⁷

Andererseits könnte der anhaltende Nachweis erhöhter Amyloid- β -Proteine während der gesamten Zeit nach der Mission durchaus repräsentativ für eine anhaltende „Auswaschphase“ nach Monaten behinderter Drainage im lymphatischen Gewebe des Gehirns aufgrund der Blockade der Liquor-Resorption sein, die auch die vorgelagerten perivaskulären Räume betraf.¹⁵⁸ Dies könnte zu einer Akkumulation von A β 40 und A β 42 geführt haben. Diese Ergebnisse stehen im Zusammenhang mit verschlechterten neuropsychologischen Testergebnissen bei einem Astronauten nach einer Jahresmission.¹⁵⁹

Neben der kopfwärts-gerichteten Flüssigkeitsverschiebung in der Schwerelosigkeit könnten auch eine schlechte Schlafqualität in Verbindung mit dem gestörten zirkadianen Rhythmus an Bord der Internationalen Raumstation als Stressfaktoren zu den nachteiligen Auswirkungen auf das Hirngewebe beigetragen haben. Dieser erste Nachweis blutbasierter Biomarkerveränderungen offenbart ein bisher unterschätztes strukturelles Risiko für das menschliche Gehirn während einer Langzeitmission.

In der Zusammenschau fanden wir deutliche Hinweise auf intrakranielle, reparative Prozesse nach der lang andauernden Druckeinwirkung durch Flüssigkeitsverschiebungen sowie nach Wiederherstellung der Blut-Hirnschrankenintegrität auf der Erde. Die beobachtete Assoziation zwischen den unterschiedlichen Parametern NfL, GFAP und A β 40 in Verbindung mit dem signifikanten Anstieg nach Rückkehr spricht für eine breite Hirngewebeantwort, die nicht auf eine Zell- oder Gewebetyp beschränkt war. Gleichzeitig unterstreichen die Ergebnisse, wie wichtig es ist, vor der Einführung längerer Missionszeiten und der zeitnah geplanten Exploration zum Mond Präventiv- und Gegenmaßnahmen gegen Flüssigkeitsverschiebungen zu untersuchen. Zudem sollte eine lange Nachbeobachtungsdauer dieser möglichen Hirnschädigung nach Langzeitmissionen als Standardmonitoring etabliert werden.

4 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte allostatiche Anpassungsmechanismen des humanen Immunsystems anhand von verschiedenen Modellen. Die *in vitro* Daten zeigten die unterschiedliche Einflussnahme des sympathikoadrenergen Systems (SAS) und des Endocannabinoid Systems (ECS) auf Schlüsselfunktionen des Immunsystems. Während Noradrenalin (NA) den stimulierten oxidativen Burst dosisabhängig über β -adrenerge Stimulation unterdrückt, ist das ECS in der Lage, nur die basale Radikalproduktion der PML zu modulieren. Das ECS übt seine immunsuppressive Funktion unter stimulierten Bedingungen über eine Hemmung der Leukozytenaktivierung, Phagozytose und einer unterdrückten Zytokinantwort aus.

Chronischer Stress wie er bei Langzeitisolation in der Antarktis auftritt führt zu einem dysfunktionalen Zustand des Immunsystems. Die globale Hemmung zahlreicher, wichtiger Immunfunktionen auf RNA-Ebene war kombiniert mit einer starken Aktivierung des Stresssignalwegs eIF2. Die meisten Veränderungen waren bereits zu Beginn vorhanden und erholten sich auch nach Rückkehr nach Europa nicht. Somit deuten die Ergebnisse auf eine besondere Anfälligkeit für Virusinfektionen aufgrund der Inaktivierung mehrerer Interferon-stimulierter Gene hin. Weltraummissionen sind eine bekannte Ursache von stressassoziierten Immundysregulationen.

Untersucht man Kosmonauten auf Langzeitmissionen hinsichtlich der allostaticen Last wird deutlich, dass eine hohe Resilienz besteht und die persönliche Wahrnehmung von Stress gering ist. Dennoch ist eine Aktivierung von Stressantwortsystemen, im Besonderen des ECS nachweisbar. Astronauten entwickeln einen proinflammatorischen Phänotyp mit aberranten Leukozytenzahlen und hohen Spiegeln von TGF- β und IL-1 α während des Fluges, die nach Landung rasch abfallen. Stimulationsassays nach Rückkehr zeigen eine überhöhte Zytokinantwort (TNF, IL-1 β) gegen Pilzantigene bei zeitgleicher Reduktion von Mediatoren der Immuntoleranz wie IL-10 und T_{reg}. Zusätzlich kommt es zu einer Verschiebung des CD8⁺-T-Zellrepertoires hin zu CD8⁺-Gedächtniszellen.

Das IgM-Repertoire von Kosmonauten ist allerdings bereits vor einer Langzeitmission signifikant anders aufgebaut als das von Kontrollpersonen. Zusätzlich lassen sich für einen Teil der untersuchten Kosmonauten während der Mission signifikante Veränderungen in ihrem IgM-Repertoire aufweisen, die sich unter anderem auf die Spezifität der IgM-Bindungsstellen auswirkten, mit Veränderungen im V(D)J-Rekombinationsprozess und mit einer erhöhten Stressreaktion korrelierten. Interessanterweise reagieren trotz einer am wahrscheinlichsten durch Training verursachten präexistenten Konstitution, dennoch einzelne Kosmonauten empfindlich auf die Bedingungen im Weltraum.

Zudem kommt es zu einem signifikanten Anstieg von Biomarkern für Neurodegeneration NFL, GFAP sowie A β 40 und A β 42 nach Rückkehr, die sich durch intrakranielle Reparaturprozesse nach der bekannten lang andauernden Druckeinwirkung durch Flüssigkeitsverschiebungen sowie nach der Wiederherstellung der Blut-Hirnschrankenintegrität auf der Erde erklären lassen. Die beobachtete Assoziation zwischen den unterschiedlichen Parametern in Verbindung mit dem signifikanten Anstieg nach Rückkehr spricht für globale Reparaturprozesse. Somit unterstreichen diese Daten, die bereits aus MRT-Untersuchungen bekannten Hinweise auf eine Gehirnschädigung nach Langzeitmissionen. Zusammengefasst führt die Modifikation von Schlüsselmechanismen der angeborenen Immunität durch Stressantwortsysteme zu einer Anfälligkeit der Immunabwehr u.a. gegen Opportunisten wie Pilze. Zudem prädisponiert eine chronische Stressexposition besonders für virale Infektionen und

Reaktivierungen und es entsteht ein Immunphänotyp der das Risiko für Allergien oder Autoimmunerkrankungen erhöhen kann.

Trotz geeigneter, allgemeiner Präventivmaßnahmen reagiert das Immunsystem des Menschen zusätzlich individuell auf eine chronische Stressexposition, sodass vor einem erwarteten Stressor wie vor einer Weltraummission aber auch ganz besonders vor elektiv planbaren Krankenhausaufenthalten personalisierte präventivmedizinische Ansätze zur Gesunderhaltung verfolgt werden sollten.

Astronauten erreichen oft ein hohes Lebensalter, wenn sie den Ruhestand erreichen. Dies ist sicher zum einen durch die konsequente Einhaltung der klassischen Präventivmaßnahmen wie z.B. eine lebenslange körperliche Aktivität, balancierte Ernährung und dem Verzicht auf Rauchen bedingt. Zum anderen, wie auch anhand der hier zusammengefassten Untersuchungen zu Astronauten zu sehen ist, durch eine besonders positive Bewertung (*re-appraisal*) von Stress, was entscheidend zum Erhalt einer effektiven neurobiologischen Allostasereaktion und Resilienz beiträgt und damit zur Vermeidung von *allostatic overload*.³⁹ Nicht-invasive und nicht-medikamentöse gesundheitsfördernde Präventivmaßnahmen, die den Umgang mit Stress im Alltag verbessern können, sind Gegenstand aktueller Forschung.^{160,161} In einer aktuellen Empfehlung für interplanetare Weltraummissionen wurden Atemübungen als Gegenmaßnahme bei hoher Stressbelastung mitaufgenommen und diese werden durch Astronauten angewendet.¹⁶² Ähnliche Interventionen sind auch für Mitarbeiter im Gesundheitssystem in der Umsetzung.^{163,164} Es bleibt abzuwarten, welche Langzeiteffekte auf die Mitarbeitergesundheit und eine eventuelle Kostenreduktion durch eine geringere Anzahl an Krankheitstagen möglich sind.¹⁶⁵ Unabhängig davon zeigen die Arbeiten jedoch deutlich, dass die spezielle Forschungsplattform ISS ein Innovationstreiber ist. Das Konzept der 4P Medizin wird der Schlüssel zur erfolgreichen Durchführung interplanetarer Missionen sein, es sollte auch in der modernen klinischen Medizin insbesondere bei der Betreuung von Patienten, die erhöhtem Stress ausgesetzt sind, stärker zum Tragen kommen und konsequent zur Anwendung gebracht werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Bernard CM. Introduction a L'Étude de la Médecine Expérimentale. Paris: J. B. Baillière et Fils; 1865.
2. Cannon WB. The wisdom of the body. New York, NY, US: W W Norton & Co; 1932.
3. Golubitsky M, Stewart I. Homeostasis, singularities, and networks. *J Math Biol* 2017;74:387-407.
4. Goldstein DS. How does homeostasis happen? Integrative physiological, systems biological, and evolutionary perspectives. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2019;316:R301-R17.
5. Cannon WB. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement. : D Appleton & Company; 1915
6. Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10:230-1.
7. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Allergy* 1946;17:231; 89; 358.
8. Selye H. On the Hormonal Activity of a Steroid Compound. *Science* 1941;94:94.
9. Selye H. Pharmacological Classification of Steroid Hormones. *Nature* 1941;148:84-5.
10. Szabo S, Yoshida M, Filakovszky J, Juhasz G. "Stress" is 80 Years Old: From Hans Selye Original Paper in 1936 to Recent Advances in GI Ulceration. *Curr Pharm Des* 2017;23:4029-41.
11. Szabo S, Tache Y, Somogyi A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. *Stress* 2012;15:472-8.
12. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic research* 2014;58:193-210.
13. Dhabhar FS. The short-term stress response - Mother nature's mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Frontiers in neuroendocrinology* 2018;49:175-92.
14. Dhabhar FS. The power of positive stress - a complementary commentary. *Stress* 2019;22:526-9.
15. Sterling P, Eyer, J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason, J. T., ed. *Handbook of life stress, cognition, and health*. Chicester, NY: Wiley; 1988.
16. Steffen PR, Hedges D, Matheson R. The Brain Is Adaptive Not Triune: How the Brain Responds to Threat, Challenge, and Change. *Front Psychiatry* 2022;13:802606.
17. Schulkin J, Sterling P. Allostasis: A Brain-Centered, Predictive Mode of Physiological Regulation. *Trends in neurosciences* 2019;42:740-52.
18. Sapolsky RM. Glucocorticoids, the evolution of the stress-response, and the primate predicament. *Neurobiol Stress* 2021;14:100320.
19. Lazarus RS, Folkman S. *Stress, appraisal, and coping*. New York: Springer Pub. Co.; 1984.
20. Osorio C, Probert T, Jones E, Young AH, Robbins I. Adapting to Stress: Understanding the Neurobiology of Resilience. *Behav Med* 2017;43:307-22.
21. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 1993;153:2093-101.
22. Guidi J, Lucente M, Sonino N, Fava GA. Allostatic Load and Its Impact on Health: A Systematic Review. *Psychother Psychosom* 2021;90:11-27.
23. Danese A, McEwen BS. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. *Physiology & behavior* 2012;106:29-39.
24. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *The New England journal of medicine* 1998;338:171-9.
25. Khan H, Gamble DT, Rudd A, et al. Structural and Functional Brain Changes in Acute Takotsubo Syndrome. *JACC Heart Fail* 2022.
26. Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:1059-64.
27. Dhabhar FS. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;992:205-17.
28. Dragos D, Tanasescu MD. The effect of stress on the defense systems. *J Med Life* 2010;3:10-8.
29. Gouin JP, Kiecolt-Glaser JK. The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011;31:81-93.
30. Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R. Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet* 1995;346:1194-6.

31. Cohen S, Tyrrell DA, Smith AP. Psychological stress and susceptibility to the common cold. *The New England journal of medicine* 1991;325:606-12.
32. Mueller B, Figueroa A, Robinson-Papp J. Structural and functional connections between the autonomic nervous system, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and the immune system: a context and time dependent stress response network. *Neurol Sci* 2022;43:951-60.
33. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain, behavior, and immunity* 2007;21:736-45.
34. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews* 2000;52:595-638.
35. Escoter-Torres L, Caratti G, Mechtidou A, Tuckermann J, Uhlenhaut NH, Vettorazzi S. Fighting the Fire: Mechanisms of Inflammatory Gene Regulation by the Glucocorticoid Receptor. *Frontiers in immunology* 2019;10:1859.
36. Franco LM, Gadkari M, Howe KN, et al. Immune regulation by glucocorticoids can be linked to cell type-dependent transcriptional responses. *The Journal of experimental medicine* 2019;216:384-406.
37. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002;16:61-71.
38. Shimba A, Ikuta K. Glucocorticoids Regulate Circadian Rhythm of Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in immunology* 2020;11:2143.
39. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci* 2006;8:367-81.
40. Muire PJ, Mangum LH, Wenke JC. Time Course of Immune Response and Immunomodulation During Normal and Delayed Healing of Musculoskeletal Wounds. *Frontiers in immunology* 2020;11:1056.
41. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Alkan SS, Heusser CH, Blaser K. Glucocorticoids inhibit human antigen-specific and enhance total IgE and IgG4 production due to differential effects on T and B cells in vitro. *European journal of immunology* 1997;27:2351-7.
42. Stolk RF, van der Pasch E, Naumann F, et al. Norepinephrine Dysregulates the Immune Response and Compromises Host Defense during Sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2020;202:830-42.
43. Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain, behavior, and immunity* 1996;10:77-91.
44. Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 2021;6:607-15.
45. Nyiri G, Cserep C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 2005;136:811-22.
46. Galiegue S, Mary S, Marchand J, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry* 1995;232:54-61.
47. Pertwee RG. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addiction biology* 2008;13:147-59.
48. Morena M, Patel S, Bains JS, Hill MN. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2016;41:80-102.
49. American Psychological Association AWGoSaHD. Stress and health disparities: Contexts, mechanisms, and interventions among racial/ethnic minority and low-socioeconomic status populations. Abgerufen am 18.08.2022 <http://www.apa.org/pi/health-disparities/resources/stress-report.aspx2017>.
50. BAuA. Stressreport Deutschland 2019: Psychische Anforderungen, Ressourcen und Befinden.2020.
51. Krankenkasse T. Entspann dich, Deutschland! - TK-Stressstudie 2021. <https://www.tk.de/resource/blob/2116464/9ff316aaf08870ed54aa8a664502ac67/2021-stressstudie-data.pdf2021>.
52. Kiecolt-Glaser JK, Page GG, Marucha PT, MacCallum RC, Glaser R. Psychological influences on surgical recovery. Perspectives from psychoneuroimmunology. *The American psychologist* 1998;53:1209-18.
53. Rosenberger PH, Ickovics JR, Epel E, et al. Surgical stress-induced immune cell redistribution profiles predict short-term and long-term postsurgical recovery. A prospective study. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2009;91:2783-94.
54. Kishawi SB, A.; Thai, AP.; Benuska, SE.; Breslin, MA.; Hendrickson, SB.; Ho, VP. Are trauma surgical societies adequately addressing mental health after injury? *Surgery* 2022;15:S0039-6060(22)00488-3.

55. Wang YZ, H.; Liu, C.; Wang, Z.; Wu, W.; Zhang, N.; Zhang, L.; Hu, J.; Luo, P.; Zhang, J.; Liu, Z.; Peng, Y.; Liu, Z.; Tang, L.; Cheng, Q. . Immune checkpoint modulators in cancer immunotherapy: recent advances and emerging concepts. *J Hematol Oncol* 2022.
56. Starl A, Hiort B, Kehmann J, Kim SH, Hofmann M, Hopf HB. [Personalized intensive care medicine : Implementation of therapeutic drug monitoring to assess antibiotic levels in intensive care patients]. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2022.
57. Steinberg BA, Klatt M, Duchemin AM. Feasibility of a Mindfulness-Based Intervention for Surgical Intensive Care Unit Personnel. *American journal of critical care : an official publication, American Association of Critical-Care Nurses* 2016;26:10-8.
58. Pagnucci N, Tolotti A, Cadorin L, Valcarengi D, Forfori F. Promoting nighttime sleep in the intensive care unit: Alternative strategies in nursing. *Intensive Crit Care Nurs* 2019;51:73-81.
59. Crucian BE, Chouker A, Simpson RJ, et al. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Frontiers in immunology* 2018;9:1437.
60. Crucian B, Simpson RJ, Mehta S, et al. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation. *Brain, behavior, and immunity* 2014;39:23-32.
61. Pagel JJ, Chouker A. Effects of isolation and confinement on humans-implications for manned space explorations. *Journal of applied physiology* 2016;120:1449-57.
62. Buchheim JJ, Hoskyns S, Moser D, et al. Oxidative burst and Dectin-1-triggered phagocytosis affected by norepinephrine and endocannabinoids: implications for fungal clearance under stress. *International immunology* 2018;30:79-89.
63. Frick MH, Porsti P. Combined alpha- and beta-adrenoceptor blockade with labetalol in hypertension. *Br Med J* 1976;1:1046-8.
64. Nielson CP. Beta-adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. *Journal of immunology* 1987;139:2392-7.
65. Scanzano A, Schembri L, Rasini E, et al. Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 2015;64:127-35.
66. Seki Y, Sahara Y, Itoh E, Kawamura T. Suppressed neutrophil respiratory burst in patients with haemorrhagic stroke. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 2010;17:187-90.
67. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology* 2017;11:613-9.
68. Holzer K, Thiel M, Moritz S, Kreimeier U, Messmer K. Expression of adhesion molecules on circulating PMN during hyperdynamic endotoxemia. *Journal of applied physiology* 1996;81:341-8.
69. Feurecker M, Mayer W, Kaufmann I, et al. A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation. *Clinical and experimental immunology* 2013;172:290-9.
70. Vilanova M, Tavares D, Ferreira P, et al. Role of monocytes in the up-regulation of the early activation marker CD69 on B and T murine lymphocytes induced by microbial mitogens. *Scand J Immunol* 1996;43:155-63.
71. Kochl R, Thelen F, Vanes L, et al. WNK1 kinase balances T cell adhesion versus migration in vivo. *Nature immunology* 2016;17:1075-83.
72. Hopke A, Nicke N, Hidu EE, Degani G, Popolo L, Wheeler RT. Neutrophil Attack Triggers Extracellular Trap-Dependent Candida Cell Wall Remodeling and Altered Immune Recognition. *PLoS pathogens* 2016;12:e1005644.
73. Moyes DL, Shen C, Murciano C, et al. Protection against epithelial damage during *Candida albicans* infection is mediated by PI3K/Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *The Journal of infectious diseases* 2014;209:1816-26.
74. Karnam A, Holla S, Balaji KN. Sonic hedgehog-responsive lipoxygenases and cyclooxygenase-2 modulate Dectin-1-induced inflammatory cytokines. *Molecular immunology* 2015;68:280-9.
75. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
76. Hu J, Ge H, Newman M, Liu K. OSA: a fast and accurate alignment tool for RNA-Seq. *Bioinformatics* 2012;28:1933-4.
77. Kramer A, Green J, Pollard J, Jr., Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 2014;30:523-30.
78. Palinkas LA, Suedfeld P. Psychological effects of polar expeditions. *Lancet* 2008;371:153-63.
79. Feurecker M, Crucian BE, Quintens R, et al. Immune sensitization during 1 year in the Antarctic high-altitude Concordia Environment. *Allergy* 2019;74:64-77.

80. Strewe C, Thieme D, Dangoisse C, et al. Modulations of Neuroendocrine Stress Responses During Confinement in Antarctica and the Role of Hypobaric Hypoxia. *Front Physiol* 2018;9:1647.
81. Feurecker M, Crucian B, Salam AP, et al. Early adaption to the antarctic environment at dome C: consequences on stress-sensitive innate immune functions. *High altitude medicine & biology* 2014;15:341-8.
82. Porcelli S, Marzorati M, Healey B, et al. Lack of acclimatization to chronic hypoxia in humans in the Antarctica. *Scientific reports* 2017;7:18090.
83. Buchheim JI, Billaud JN, Feurecker M, et al. Exploratory RNA-seq analysis in healthy subjects reveals vulnerability to viral infections during a 12- month period of isolation and confinement. *Brain Behav Immun Health* 2020;9:100145.
84. Mehta SK, Pierson DL, Cooley H, Dubow R, Lugg D. Epstein-Barr virus reactivation associated with diminished cell-mediated immunity in antarctic expeditioners. *Journal of medical virology* 2000;61:235-40.
85. Coskun O, Sener K, Kilic S, et al. Stress-related Epstein-Barr virus reactivation. *Clin Exp Med* 2010;10:15-20.
86. Rooney BV, Crucian BE, Pierson DL, Laudenslager ML, Mehta SK. Herpes Virus Reactivation in Astronauts During Spaceflight and Its Application on Earth. *Frontiers in microbiology* 2019;10:16.
87. Glaser R, Padgett DA, Litsky ML, et al. Stress-associated changes in the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus: implications for chronic fatigue syndrome and cancer. *Brain Behav Immun* 2005;19:91-103.
88. Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nature reviews Immunology* 2013;13:46-57.
89. Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, et al. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS pathogens* 2011;7:e1001258.
90. Ashley CL, Abendroth A, McSharry BP, Slobedman B. Interferon-Independent Innate Responses to Cytomegalovirus. *Frontiers in immunology* 2019;10:2751.
91. Yanez DC, Ross S, Crompton T. The IFITM protein family in adaptive immunity. *Immunology* 2020;159:365-72.
92. Zhou D, Palam LR, Jiang L, Narasimhan J, Staschke KA, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:7064-73.
93. Teske BF, Wek SA, Bunpo P, et al. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* 2011;22:4390-405.
94. Fleith RC, Mears HV, Leong XY, et al. IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. *Nucleic acids research* 2018;46:5269-85.
95. Strewe C, Moser D, Buchheim JI, et al. Sex differences in stress and immune responses during confinement in Antarctica. *Biology of sex differences* 2019;10:20.
96. Kimzey SL, Fischer, C.L., Johnson, P.C., Ritzmann, S.E. , Mengel, C.E. *Hematology and immunology studies.* <https://history.nasa.gov/SP-368/contents.htm>: NASA 1975:197-226.
97. Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson DL, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med* 2016;9:383-91.
98. Crucian B, Stowe R, Mehta S, et al. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle. *Journal of clinical immunology* 2013;33:456-65.
99. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviation, space, and environmental medicine* 2008;79:835-43.
100. Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quiriarte H, Pierson D, Sams C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *NPJ microgravity* 2015;1:15013.
101. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Mark Ott C, Pierson DL. Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain, behavior, and immunity* 2004;18:443-50.
102. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Ott CM, Pierson DL. Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain, behavior, and immunity* 2005;19:547-54.
103. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, et al. Plasma cytokine concentrations indicate that in vivo hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2014;34:778-86.

104. Crucian BE, Cubbage ML, Sams CF. Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2000;20:547-56.
105. Gueguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *Journal of leukocyte biology* 2009;86:1027-38.
106. Crucian B, Stowe R, Quiriarte H, Pierson D, Sams C. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. *Aviation, space, and environmental medicine* 2011;82:857-62.
107. Chouker A, Thiel M, Baranov V, et al. Simulated microgravity, psychic stress, and immune cells in men: observations during 120-day 6 degrees HDT. *Journal of applied physiology* 2001;90:1736-43.
108. Buchheim JJ, Matzel S, Rykova M, et al. Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight. *Front Physiol* 2019;10:85.
109. Chouker A, Kaufmann I, Kreth S, et al. Motion sickness, stress and the endocannabinoid system. *PLoS one* 2010;5:e10752.
110. Lipina C, Hundal HS. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biol* 2016;6:150276.
111. Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, et al. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *Journal of leukocyte biology* 1999;65:179-86.
112. Novikova N, De Boever P, Poddubko S, et al. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Research in microbiology* 2006;157:5-12.
113. Satoh K, Yamazaki T, Furukawa S, Mukai C, Makimura K. Identification of fungi isolated from astronaut nasal and pharyngeal smears and saliva. *Microbiology and immunology* 2021;65:89-94.
114. Mehta SK, Kaur I, Grimm EA, Smid C, Feedback DL, Pierson DL. Decreased non-MHC-restricted (CD56+) killer cell cytotoxicity after spaceflight. *Journal of applied physiology* 2001;91:1814-8.
115. DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006;117:289-300.
116. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 2010;32:642-53.
117. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, et al. Pillars Article: production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 1986. 163: 1037-1050. *Journal of immunology* 2014;192:2939-52.
118. Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Experimental gerontology* 2007;42:400-6.
119. Ventura MT, Casciaro M, Gangemi S, Buquicchio R. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clinical and molecular allergy : CMA* 2017;15:21.
120. Franceschi C, Capri M, Monti D, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of ageing and development* 2007;128:92-105.
121. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, behavior, and immunity* 1997;11:286-306.
122. Sonnenfeld G. Editorial: Space flight modifies T cell activation-role of microgravity. *Journal of leukocyte biology* 2012;92:1125-6.
123. Chang TT, Walther I, Li CF, et al. The Rel/NF-kappaB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *Journal of leukocyte biology* 2012;92:1133-45.
124. Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosomatic medicine* 1998;60:362-5.
125. Marshall GD, Jr., Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain, behavior, and immunity* 1998;12:297-307.
126. Kang DH, Fox C. Th1 and Th2 cytokine responses to academic stress. *Research in nursing & health* 2001;24:245-57.
127. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;908:244-54.
128. Fagiolo U, Cossarizza A, Santacaterina S, et al. Increased cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly people. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992;663:490-3.

129. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS letters* 2005;579:2035-9.
130. Pawelec G, Gouttefangeas C. T-cell dysregulation caused by chronic antigenic stress: the role of CMV in immunosenescence? *Aging clinical and experimental research* 2006;18:171-3.
131. Bauer ME, Fuente Mde L. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mechanisms of ageing and development* 2016;158:27-37.
132. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, et al. Increased prevalence of coeliac disease in autoimmune thyroiditis is restricted to aged patients. *Experimental gerontology* 2003;38:589-95.
133. Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, et al. Source of Chronic Inflammation in Aging. *Frontiers in cardiovascular medicine* 2018;5:12.
134. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Sams CF, Pierson DL. Multiple latent viruses reactivate in astronauts during Space Shuttle missions. *Brain, behavior, and immunity* 2014;41:210-7.
135. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, et al. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ microgravity* 2017;3:11.
136. Spielmann G, Agha N, Kunz H, et al. B cell homeostasis is maintained during long-duration spaceflight. *Journal of applied physiology* 2019;126:469-76.
137. Bascove M, Huin-Schohn C, Gueguinou N, Tschirhart E, Fripiat JP. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009;23:1607-15.
138. Huin-Schohn C, Gueguinou N, Schenten V, et al. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013;27:333-41.
139. Chi X, Li Y, Qiu X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* 2020;160:233-47.
140. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. *Advances in experimental medicine and biology* 2020;1254:1-22.
141. Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods in molecular biology* 2012;882:569-604.
142. Fonte C, Kaminski S, Vanet A, et al. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-beta repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019;33:896-908.
143. Buchheim JI, Ghislin S, Ouzren N, et al. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2020;34:16144-62.
144. Lange MD, Huang L, Yu Y, et al. Accumulation of VH Replacement Products in IgH Genes Derived from Autoimmune Diseases and Anti-Viral Responses in Human. *Frontiers in immunology* 2014;5:345.
145. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Frontiers in immunology* 2012;3:302.
146. Hong B, Wu Y, Li W, et al. In-Depth Analysis of Human Neonatal and Adult IgM Antibody Repertoires. *Frontiers in immunology* 2018;9:128.
147. Van Dijk-Hard I, Lundkvist I. Long-term kinetics of adult human antibody repertoires. *Immunology* 2002;107:136-44.
148. Zhang Z, Burrows PD, Cooper MD. The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunological reviews* 2004;197:231-42.
149. Campbell JP, Turner JE. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. *Frontiers in immunology* 2018;9:648.
150. Shearer WT, Ochs HD, Lee BN, et al. Immune responses in adult female volunteers during the bed-rest model of spaceflight: antibodies and cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:900-5.
151. Baisch JF, Wolfram G, Beck L, et al. Orthostatic stress is necessary to maintain the dynamic range of cardiovascular control in space. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2000;441:R52-61.
152. Martin Paez Y, Mudie LI, Subramanian PS. Spaceflight Associated Neuro-Ocular Syndrome (SANS): A Systematic Review and Future Directions. *Eye Brain* 2020;12:105-17.
153. Van Ombergen A, Jillings S, Jeurissen B, et al. Brain Tissue-Volume Changes in Cosmonauts. *The New England journal of medicine* 2018;379:1678-80.
154. Van Ombergen A, Jillings S, Jeurissen B, et al. Brain ventricular volume changes induced by long-duration spaceflight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019;116:10531-6.

155. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990;1:43-6.
156. Thornton WE, Hoffler GW, Rummel JA. Anthropometric changes and fluid shifts. *Skylab Life Science Symposium*; 1974 November 1, 1974; NASA Johnson Space Center; Houston, TX, United States: United States; 1974. p. 637-58.
157. Ashton NJ, Hye A, Rajkumar AP, et al. An update on blood-based biomarkers for non-Alzheimer neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 2020;16:265-84.
158. Wardlaw JM, Benveniste H, Nedergaard M, et al. Perivascular spaces in the brain: anatomy, physiology and pathology. *Nat Rev Neurol* 2020;16:137-53.
159. Garrett-Bakelman FE, Darshi M, Green SJ, et al. The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science* 2019;364.
160. Cherkin DC, Sherman KJ, Balderson BH, et al. Effect of Mindfulness-Based Stress Reduction vs Cognitive Behavioral Therapy or Usual Care on Back Pain and Functional Limitations in Adults With Chronic Low Back Pain: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;315:1240-9.
161. Janssen M, Heerkens Y, Kuijter W, van der Heijden B, Engels J. Effects of Mindfulness-Based Stress Reduction on employees' mental health: A systematic review. *PloS one* 2018;13:e0191332.
162. Makedonas G, Mehta S, Chouker A, et al. Specific Immunologic Countermeasure Protocol for Deep-Space Exploration Missions. *Frontiers in immunology* 2019;10:2407.
163. Ameli R, Sinaii N, West CP, et al. Effect of a Brief Mindfulness-Based Program on Stress in Health Care Professionals at a US Biomedical Research Hospital: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2020;3:e2013424.
164. Lebares CC, Hershberger AO, Guvva EV, et al. Feasibility of Formal Mindfulness-Based Stress-Resilience Training Among Surgery Interns: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg* 2018;153:e182734.
165. Le LK, Esturas AC, Mihalopoulos C, et al. Cost-effectiveness evidence of mental health prevention and promotion interventions: A systematic review of economic evaluations. *PLoS Med* 2021;18:e1003606.

6 Themenrelevante Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift

Changes in Blood Biomarkers of Brain Injury and Degeneration Following Long-Duration Spaceflight.

Zu Eulenburg P*, **Buchheim JI***, Ashton NJ, Vassilieva G, Blennow K, Zetterberg H*, Choukér A*.
(*geteilte Autorenschaft)

JAMA Neurol. 2021 Oct 11.

Exploratory RNA-seq analysis in healthy subjects reveals vulnerability to viral infections during a 12-month period of isolation and confinement.

Buchheim JI, Billaud JN, Feuerecker M, Strewe C, Dangoisse C, Osterman A, Mehta S, Crucian B, Schelling G, Choukér A.

Brain, Behavior, & Immunity – Health, Volume 9, 2020 Sep 24;9:100145.

Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight.

Buchheim JI*, Ghislin S*, Ouzren N, Albuissou E, Vanet A, Matzel S, Ponomarev S, Rykova M, Choukér A*, Fripiat JP*. (*geteilte Autorenschaft)

FASEB J. 2020 Dec;34(12):16144-16162.

Stress Related Shift toward Inflammaging in Cosmonauts after Long-Duration Space Flight.

Buchheim JI, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G, Ponomarev S, Nichiporuk I, Hörl M, Moser D, Biere K, Feuerecker M, Schelling G, Thieme D, Kaufmann I, Thiel M, Choukér A.

Front Physiol. 2019 Feb 19;10:85.

Oxidative burst and Dectin-1-triggered phagocytosis affected by norepinephrine and endocannabinoids: implications for fungal clearance under stress.

Buchheim JI, Hoskyns S, Moser D, Han B, Deindl E, Hörl M, Biere K, Feuerecker M, Schelling G, Choukér A.

Int Immunol. 2018 Mar 8;30(2):79-89.

7 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie, für die Förderung meiner beruflichen Entwicklung und die Unterstützung meines wissenschaftlichen Werdegangs.

Zudem möchte ich ganz herzlich Frau Prof. Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl danken, die als meine Doktormutter die wesentlichen Fundamente meiner wissenschaftlichen Ausbildung gelegt und nicht nur als Fachmentorsmitglied meine Habilitation begleitet und unterstützt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Mentor und Freund Herrn Prof. Dr. med. Alexander Choukér, Leiter des Labors für Translationale Forschung „Stress & Immunität“ an der Klinik für Anaesthesiologie, für den Zugang zu dem besonderen Forschungsbereich der Raumfahrt und seine Begleitung auf dem Weg zur Habilitation. Seine Förderung, Expertise, sowie sein stetiger Einsatz für meine Belange waren und sind für mich von unschätzbarem Wert.

Ich möchte Frau PD. Dr. med Claudia Strewe und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Feuerecker danken, mit denen ich als *core team* des Labors über viele Jahre im Rahmen von gemeinsamen Projekten die Höhen und Tiefen dieser besonderen Forschungsmodelle geteilt habe und noch teile und Dank deren Freundschaft und Erfahrung jedes noch so unlösbare Problem eine Lösung findet.

Großer Dank gilt allen Mitgliedern des Labors, ganz besonders Frau Marion Hoerl und Frau Katharina Biere. Ohne Ihre technische Expertise, Rigorosität und Kreativität wären unsere Studien mit all ihren Besonderheiten nicht so erfolgreich umsetzbar.

Die Reisen zur Probennahme in Star City, Moskau mit Frau Katharina Biere und Frau Sandra Matzel gehören zu den aufregendsten und interessantesten Erfahrungen meiner wissenschaftlichen Laufbahn. Vielen Dank für die Begleitung sowie die technische Unterstützung, aber auch die Freude, die bei diesen Unternehmungen nie fehlte. Zudem sei meinen Kolleginnen und Kollegen gedankt, die mich im klinischen Alltag unterstützten und durch den ein oder anderen, oft kurzfristigen, Dienstausch diese zahlreichen Reisen möglich machten.

Ohne die finanzielle Förderung des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt (DLR) die Unterstützung der Europäischen Weltraumagentur (ESA) sind unsere Forschungsprojekte besonders in der Antarktis und auf der ISS nicht umsetzbar. Den vielen helfenden Händen in diesen Institutionen, aber auch den vielen nationalen und internationalen Kooperationspartnern möchte ich für die spannende und erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Auch wenn eine namentliche Nennung aller hier unmöglich ist, möchte ich besonders Frau Inês Antunes, Frau Galina Vassilieva und Herrn Jean-Noël Billaud erwähnen.

Mein privater Dank gebührt von ganzem Herzen meiner Familie: Meiner Tochter, meinem Mann Dr. Nikolaus Buchheim sowie meinen Eltern, die meine Faszination mit der Raumfahrt und all ihren verrückten Facetten ertragen, oft auch teilen, und deren bedingungsloser Unterstützung ich immer gewiss sein kann.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all jenen Freunden bedanken, die hier namentlich nicht genannt sind, die mich aber auf meinem beruflichen und privaten Weg stets begleitet, gefördert und unterstützt haben.