

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Institut für Medizinische Psychologie

**Zentrale Mechanismen bei der  
Klassisch konditionierten Immunsuppression**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizinwissenschaften

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

**Maj-Britt Niemi**

aus Düsseldorf

2004

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Grosse-Wilde

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Schedlowski

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Fandrey

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2004

# GLIEDERUNG

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem .....	6
1.2. Konditionierte Immunmodulation .....	8
1.3. Frühe Studien der Klassischen Konditionierung .....	8
1.4. Reetablierung der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen...11	
1.5. Weitere Entwicklungen und biologisch-klinische Relevanz der Klassischen Konditionierung von Immunfunktionen.....	12
1.6. Konditionierte Immunsuppression mit Cyclosporin A.....	13
1.7. Zentrale Mechanismen .....	17
1.8. Forschungsbedarf und Fragestellung .....	22
<b>2. Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1. Versuchstiere.....	24
2.2. Stimuli der Konditionierung .....	24
2.3. Design der Basis-Konditionierung.....	26
2.4. Durchführung der Basis-Konditionierung .....	27
2.5. Abhängige Variablen .....	28
2.6. Läsionen des Inselkortex und des ventromedialen Kern des Hypothalamus.....	31
2.7. Experimentelle Designs .....	34
2.8. Statistische Auswertung.....	38
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
3.1. Effekte von Läsionen des Inselkortex auf die Klassisch konditionierte Immunsuppression (Experiment 1).....	39
3.1.1. Konditionierte Geschmacksaversion.....	40
3.1.2. Immunologische Parameter .....	41
3.2. Effekte von Läsionen des Inselkortex auf basale Immunfunktionen (Experiment 2).....	44
3.3. Effekte von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus auf die Klassisch konditionierte Immunsuppression (Experiment 3).....	45

3.3.1.	Konditionierte Geschmacksaversion .....	46
3.3.2.	Lymphozytenproliferation .....	47
3.4.	Effekte von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus auf basale Immunfunktionen (Experiment 4) .....	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>60</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
BSA	Bovine serum albumin
ConA	Concanavalin A
CD	Cluster of differentiation
CR	Conditioned response
CS	Conditioned stimulus
CsA	Cyclosporin A
CTA	Conditioned taste aversion
CY	Cyclophosphamid
DA	Dark Agouti
DNCB	2,4-dinitrochlorobenzene
DTH	Delayed type of hypersensitivity
FCS	Fetal calf serum
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
NF-AT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartat
NTS	Nucleus tractus solitarius
PBS	Phosphate buffered saline
Poly I:C	Polyinosin:Polycytidyl-Säure
RNA	Ribonuclein acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sac	Saccharin
TCR	T-Zell Rezeptor
TMB	Tetramethyl benzidine
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UCS	Unconditioned stimulus
VMH	ventromedialer Kern des Hypothalamus
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1. Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem

Lange Zeit wurde das Immunsystem traditionell als ein autonom agierendes Abwehrsystem für schädigende Viren, Bakterien oder Tumorzellen betrachtet. Seit etwa 25 Jahren ist bekannt, dass das Immunsystem im ständigen wechselseitigen Austausch mit dem Nervensystem und Hormonsystem steht. Heute spricht man von der Neurobiologie des Immunsystems und von der Immunobiologie des Nervensystems (Hucklebridge et al. 2002). Gegenwärtig liefern etliche Studien Belege dafür, wie diese bidirektionale Kommunikation zwischen Nervensystem, endokrinem System und Immunsystem vonstatten geht (Besedowsky et al. 1992; Blalock 1994; Elmquist et al. 1997; Maier et al. 2003; Dantzer et al. 2000; Tracey 2002).

### Efferenter Arm

Das endokrine System fungiert dabei als funktioneller Vermittler, der vom Nervensystem vielfältig eingesetzt, z. B. über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, und vom Immunsystem beeinflusst wird.

Morphologisch verbunden sind Immunsystem und Nervensystem durch die Innervation lymphatischer Organe durch das vegetative Nervensystem. In der Milz und in Lymphknoten dominiert die sympathische Innervation mittels Adrenalin und Noradrenalin. So enthält der Milznerv annähernd 98% sympathische Nervenfasern (Klein et al. 1982). Insbesondere in T-Zell-Arealen konnten direkte Neuro-Lymphozyten-Kontakte nachgewiesen werden (Felten et al. 1994).

Zusätzlich sind zahlreiche Neurotransmitter, Neuropeptide und Neurotrophine dokumentiert, die vom Nervensystem exprimiert werden und die rezeptorvermittelt Immunfunktionen beeinflussen (Elenkov et al. 2000; Sanders et al. 2001).

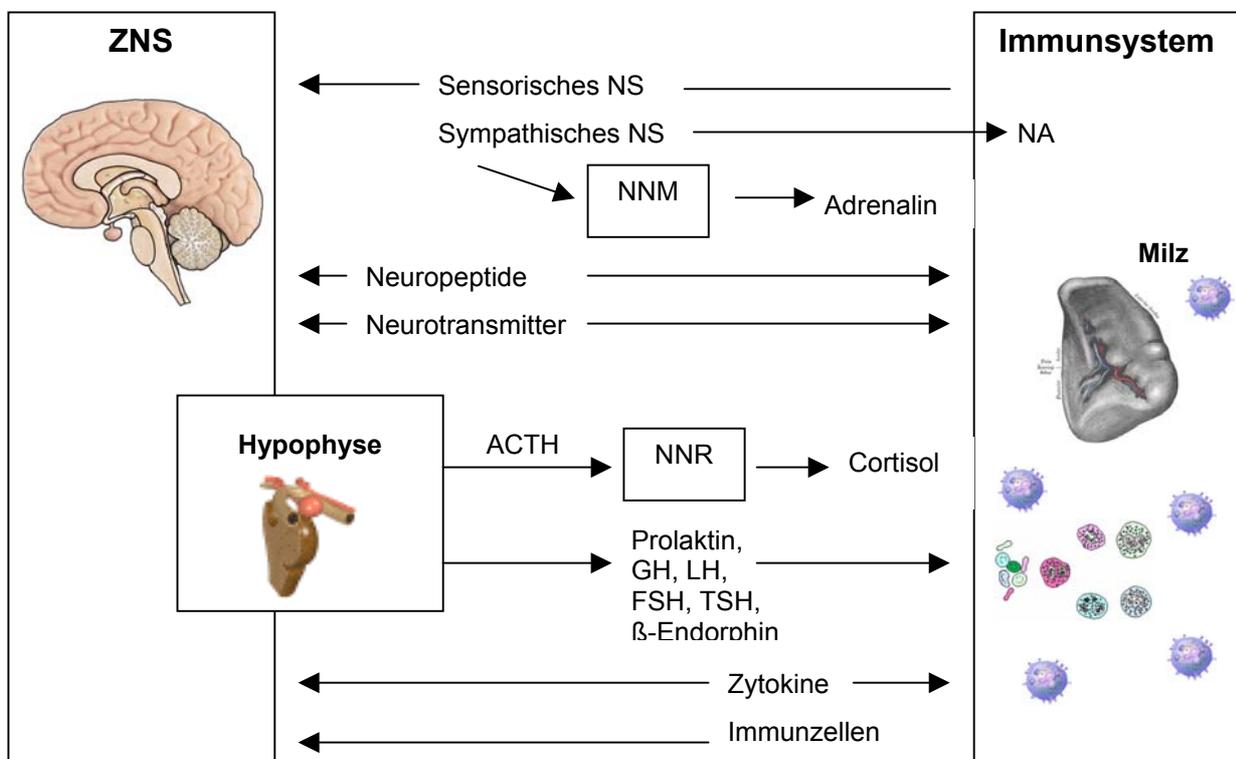
### Afferenter Arm

Umgekehrt erreichen Zytokine und Lymphozyten das Gehirn und können dort neuro-endokrine Prozesse im Hypothalamus beeinflussen. Interleukin (IL)-1 und IL-6 konnten in *in-vitro*-Assays Hypophysenzellen zur Produktion des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) aktivieren. Aber auch Tumor-Nekrose-Faktor

(TNF) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) führen zu einer Aktivierung der Hypophysen-Nebennierenachse (Besedovsky et al. 2002). Die im Blut zirkulierenden Zytokine erreichen durch offene Regionen in der Blut-Hirn-Schranke wie beispielsweise circumventrikuläre Organe das zentrale Nervensystem (ZNS) und damit die neuroendokrinen Steuerzentren (Kelley et al. 2003).

Auch wurde nachgewiesen, dass immunkompetente Zellen diverse Neuropeptide und Hormone produzieren, die autokrin und parakrin wirken (Elenkov et al. 2000).

Immunsignale werden wahrscheinlich auch über sensorische Bahnen (Vagus-Nerv, Neurone der Spinalganglien) zum ZNS übertragen. Die Vagus-Fasern selbst tragen Rezeptoren für Prostaglandine, Histamin, Substanz P und Neurokinin (Goehler et al. 2000). Dies mag eine Möglichkeit für das Nervensystem darstellen, beispielsweise gastrointestinale Entzündungen/Antigene zu identifizieren, da Vagus-Fasern in enger räumlicher Beziehung zu den Peyer'schen Plaques im Magen-Darm-Trakt verlaufen. Abbildung 1 gibt einen groben Überblick über die funktionellen Zusammenhänge zwischen Nerven- und Immunsystem.



**Abb.1: Bidirektionale Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem**

Stark vereinfachte schematisierte Darstellung der neuro-endokrin-immunologischen Interaktion, (NS=Nervensystem, NA= Noradrenalin, NNM=Nebennierenmark, NNR=Nebennierenrinde)

Es konnten viele funktionelle Interaktionen zwischen beiden Systemen nachgewiesen werden, jedoch ist bis heute die genaue, molekularanatomische Kommunikation bzw. morphologische Verknüpfung nicht bis in alle Einzelheiten geklärt.

## **1.2. Konditionierte Immunmodulation**

Eines der wohl beeindruckendsten Beispiele dafür, wie das Nervensystem Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen vermag, ist die Klassische Konditionierung von Immunfunktionen (Ader & Cohen 2001; Exton et al. 2000a). Dabei wird die Arbeit von Ader und Cohen (1975), in der sie eine Klassisch konditionierte Immunsuppression evoziert haben, als der Beginn der Psychoneuroimmunologie betrachtet. Seither wurde die Konditionierbarkeit von zellulären (Ader & Cohen, 1982; Hiramoto et al. 1987; Exton et al. 1998b) und humoralen (Ader & Cohen 1975; Ader 1993; Alvarez-Borda et al. 1995) Immunantworten sowohl tier- als auch humanexperimentell (Kirschbaum et al. 1992; Goebel et al. 2002) gut dokumentiert. Prinzipiell handelt es sich bei der Klassischen Konditionierung um ein simples Reiz-Reaktionslernen. Wird ein physiologisch relevanter Reiz, der eine reflektorische physiologische Reaktion im Organismus reliabel hervorruft, mit einem distinkten, aber physiologisch neutralen Reiz zeitlich gekoppelt dargeboten, so kann die Reaktion zukünftig auch von dem vormals neutralen Reiz ausgelöst werden (Pavlov 1928). Die Entdeckung, dass immunologische Reaktionen konditionierbar bzw. ‚lernbar‘ und vor allem diese gelernten Reaktionen etablierten immunologischen Methoden zugänglich sind, ließen eine potentielle klinische Anwendbarkeit dieses Modells vermuten (Ader & Cohen 1982). Die biologische Relevanz konnte in einer Reihe von tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden (Bovbjerg et al. 1982; Gorczynski 1990; Blom et al. 1995). Auch die zitierten humanexperimentellen Studien (Kirschbaum et al. 1992; Goebel et al. 2002) geben Anlass, auf diese Entwicklung zu hoffen. Dabei liegt das therapeutische Potential in der Reduzierung der Medikamentengabe, die durch die Konditionierung zumindest partiell substituiert werden könnte.

## **1.3. Frühe Studien der Klassischen Konditionierung**

Der Begriff ‚Klassische Konditionierung‘ wurde von dem russischen Physiologen und späteren Nobelpreisträger Ivan Pavlov im frühen zwanzigsten Jahrhundert eingeführt. Pavlov's Ansatz ist allgemein bekannt. Wird ein physiologisch bedeutsamer Reiz, einer, der reliabel eine physiologische Reaktion auslöst, mit

einem physiologisch neutralen, bisher bedeutungslosen Reiz zeitlich gepaart, so kann die Reaktion anschließend auch von dem vormals neutralen Reiz ausgelöst werden. Pavlov verwendete in seinen klassischen Studien als physiologisch relevanten Reiz, dem so genannten unconditionierten Stimulus (UCS, unconditioned stimulus), pulverisiertes Fleisch, was er auf die Zunge von Hunden applizierte. Dieser Stimulus erzeugte erhöhten Speichelfluss bei den Tieren. Ein auditiver Reiz, das Läuten einer Glocke, war der neutrale, konditionierte Stimulus (CS, conditioned stimulus). Auf den Glockenton zeigten die Hunde keinerlei Reaktion außer einer gewissen Neugier. Nach einer Reihe von Durchgängen, in denen der CS mit dem UCS gekoppelt wurde, konnte der Speichelfluss bei den Hunden durch das Läuten der Glocke allein induziert werden. Die Reaktion wird zur konditionierten Reaktion (CR, conditioned response). Diese Form assoziativen Lernens wird üblicherweise als ‚Pavlov’sche‘ oder ‚Klassische Konditionierung‘ bezeichnet.

Bemerkenswerterweise folgten diesen Pionierarbeiten Pavlovs schon kurz darauf Studien, die belegten, dass sich Immunfunktionen in ganz ähnlicher Weise konditionieren lassen. In einer Serie von Experimenten, die Metal’nikoff, ein Schüler Pavlovs, in den 1920er Jahren am Pasteur Institut in Paris durchführte, forschte er an der Aktivität des Immunsystems als konditionierter Reaktion (Metal’nikoff & Chorine 1926). Seine Arbeitsgruppe applizierte Meerschweinchen als UCS eine intraperitoneale (ip) Injektion Tapioka. Es handelt sich hierbei um einen Pflanzenextrakt, welcher eine leicht zu messende Immunantwort, den Anstieg zirkulierender Leukozyten in der Peritonealflüssigkeit (Leukozytose), induziert. Dies wurde mit dem Erhitzen oder Ankratzen der Haut der Tiere (CS) gekoppelt. Nach mehrmaligen CS-UCS Paarungen erhöhte sich die Leukozytenzahl auch bei alleinigem Erhitzen oder Ankratzen der Haut (CR).

In Folgeversuchen setzten sie als UCS abgetötete *Bacillus anthracoides* (Anthrax) ein und maßen die Leukozytenzahl, als CS diente wieder die beschriebene Hautstimulation. Nach mehrfacher CS-UCS Paarung erzeugte der CS allein Leukozytose. Die potentielle klinische Bedeutsamkeit dieser Ergebnisse wurde in einem weiteren Versuch gezeigt, in dem diese konditionierte schützende Immunstimulation gegenüber dem Milzbranderreger auch auf eine andere Krankheit, die Cholera, ausgeweitet werden konnte. Hierbei wurde die konditionierte

Leukozytose-Reaktion auf den Milzbranderreger induziert, anschließend wurden die Tiere mit Cholera infiziert und weiterhin dem CS ausgesetzt. Die Mortalität war bei den konditionierten Tieren deutlich reduziert verglichen mit den nichtkonditionierten Kontrolltieren. Diese Reaktion konnte so weit gesteigert werden, dass die konditionierten Tiere ursprünglich tödliche Dosen von Cholerabakterien überlebten.

Diese Ergebnisse wiesen damals schon darauf hin, dass sich auch das Immunsystem durch klassische Konditionierung modulieren lässt, jedoch wurden diese Arbeiten in westlichen Ländern nicht weiter beachtet, obwohl eine Reihe von russischen Wissenschaftlern weitere Studien auf diesem Gebiet in den 1950er Jahren durchführte (siehe Exton et al. 1999; Spector 1987). Erst 50 Jahre später, in den 1970er Jahren, begann mit einem scheinbar missglückten Versuch im Labor des Psychiaters Robert Ader an der Universität von Rochester die systematische Untersuchung dieses Phänomens. Ader und Cohen (1975) untersuchten die konditionierte Geschmacksaversion (conditioned taste aversion, CTA) bei der Ratte. Die CTA ist eines der wichtigsten Konditionierungsparadigma und wurde erstmals von John Garcia so benannt (Garcia, 1955). Üblicherweise wird die Präsentation eines neuartigen Geschmacks (CS) mit der Injektion einer toxischen Substanz (UCS) gepaart, die gastrointestinale Beschwerden und Übelkeit verursacht, wie in diesem Fall Cyclophosphamid (CY). Als neuartigen gustatorischen Reiz verwendeten sie in Trinkwasser gelöstes Saccharin (Sac). Damit dieser Reiz für die Tiere deutlich wahrnehmbar wird, werden die Ratten zunächst wasserdepriviert und der Zugang zum nach Sac schmeckenden Wasser wird ihnen täglich für eine bestimmte Dauer gewährt. Schon nach einem Paarungsdurchgang der neuartigen Wasserlösung (CS) mit der Übelkeit erregenden Injektion (UCS) zeigen die Ratten eine Aversion gegenüber der Saclösung und vermeiden die Flüssigkeitsaufnahme. Der Grad der Vermeidung ist ein Maß für die konditionierte Geschmacksaversion (CTA). Präsentiert man den CS allein wird die CR nach einigen Reexpositionen gelöscht, dies kann man ebenfalls an der konsumierten Flüssigkeitsmenge ablesen. Ader und Cohen stellten zusätzlich zu einer entwickelten CTA eine erhöhte Mortalitätsrate unter den konditionierten Tieren fest. Die Ratten waren an für die Käfighaltung gewöhnlichen Pathogenen verstorben. Sie vermuteten, dass neben der CTA eine konditionierte Suppression des Immunsystems stattgefunden habe, die für die angestiegene Empfindlichkeit gegenüber den Pathogenen verantwortlich war. CY ist

eine Substanz, die neben Übelkeit verursachende auch antimitotische Eigenschaften aufweist und daher in der Krebstherapie eingesetzt wird, daneben hat es eine immunsuppressive Wirkung.

#### **1.4. Reetablierung der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen**

Ader und Cohen testeten ihre Vermutung, indem sie das Experiment zur konditionierten Geschmacksaversion (CTA) mit Sac als CS und CY als UCS replizierten. Zusätzlich gaben sie den Tieren drei Tage nach einer einmaligen CS-UCS Paarung eine Injektion (ip) mit einem Schaferythrozytenantigen. Die Applikation des Antigens führt generell zu einer Reaktion des Immunsystems, deren Stärke über die Konzentration von gebildeten Antikörpern (Antikörpertiter) messbar ist. Im Anschluss erhielten die Tiere an 6 folgenden Tagen Sac (CS Reexposition). Am sechsten Tag wurde die Antikörperbildung bestimmt. Die Analysen ergaben eine verminderte Immunantwort bei den konditionierten Tieren. Gleichzeitig hatten diese Ratten eine CTA dem Sac gegenüber entwickelt. Ader und Cohen schlossen daraus, dass die verminderte Antikörperproduktion Folge einer konditionierten Immunsuppression war. Diese Beobachtung konnte später von anderen Arbeitsgruppen repliziert werden (Rogers et al. 1976; Wayner et al. 1978). Die von Ader und Cohen aufgezeigten bidirektionalen Zusammenhänge zwischen Gehirn und Immunsystem am Beispiel der Klassischen Konditionierung von Immunfunktionen gaben vielen Immunologen und Neurowissenschaftlern den Anstoß, ihre Sichtweise zu revidieren und das Immunsystem als integrativen, und nicht als isolierten Bestandteil der Gesamtphysiologie des Körpers zu betrachten. Das Immunsystem ist eingebettet in die physiologische Organisation des Körpers als Ganzes. Gleichzeitig ist es verknüpft mit neuralen und neuroendokrinen Regulatoren der physiologischen Stasis. Daher sollte es nicht überraschen, dass Elemente der Aktivität des Immunsystems den gleichen Lernprozessen unterliegen wie beispielsweise kardiovaskuläre Aktivität oder etwas derart Banales wie Speichelfluß. Dass dies in der Tat so ist und dass Immunaktivität durch Klassische Konditionierung manipulierbar ist, manifestiert die integrative Rolle des Immunsystems in der Physiologie unseres Körpers und trägt zum Verständnis innovativer Wege in den immunotherapeutischen Interventionen bei.

### **1.5. Weitere Entwicklungen und biologisch-klinische Relevanz der Klassischen Konditionierung von Immunfunktionen**

Der Befund, dass die CY Immunsuppression klassisch konditionierbar ist, erwies sich als sehr robustes Phänomen und wurde in zahlreichen Laboren repliziert. Neben den initialen Arbeiten von Ader und Cohen (1975) dokumentieren zahlreiche Experimente, dass sich neben humoralen Immunfunktionen wie der Antikörperreaktion auch zelluläre Immunfunktionen wie beispielsweise Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen (Bovbjerg et al. 1982; 1984; Gorczynski et al. 1990, Grochowicz et al. 1991), mitogeninduzierte Lymphozytenproliferation (Exton et al. 1998a), Hypersensitivitätsreaktionen (Roudebush & Bryant 1991; Exton et al. 2000b), die Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Ghanta et al. 1985), Leukozytenzahlen (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1987), die Variation spezifischer Lymphozyten-Subpopulationen (Husband et al. 1987) oder auch Akute-Phase-Reaktionen klassisch konditionieren lassen (siehe auch Übersichtsartikel: Ader & Cohen 2001; Exton, King & Husband 1999a).

Zahlreiche tierexperimentelle Studien konnten mittlerweile bedeutende Effekte der Klassischen Konditionierung von Immunreaktionen auf Krankheitsverläufe darlegen. In dem klassischen Experiment von Ader & Cohen (1982) zur Autoimmunkrankheit des systemischen Lupus erythematoses an Mäusen, die eine genetische Prädisposition für diese Erkrankung besitzen, führt die Gabe von CY zu einer verlängerten Überlebenszeit, die sich klassisch konditionieren lässt. Dazu wurde CY (UCS) wiederholt mit einer Saclösung (CS) gepaart. Die konditionierten Tiere überlebten signifikant länger als die unkonditionierten Tiere, welche dieselbe Menge an CY appliziert bekamen. Ähnliche Experimente mit CY an Ratten, die an einer experimentell induzierten rheumatoiden Arthritis erkrankten, führten durch klassische Konditionierung mit einer Vanille-Sac-Lösung als CS zu einer Verminderung der typischen entzündlichen Prozesse (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1983; 1985). Entsprechende Ergebnisse erzielte diese Arbeitsgruppe auch mit der Gabe von Cyclosporin A (CsA) als UCS, unabhängig von dem Zeitpunkt der Konditionierung entweder vor oder nach der Infektion (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1990).

Auch in dem Bereich der Tumorbologie konnten erfolgreich Immunkonditionierungen durchgeführt werden. Beispielsweise führte an Mäusen, denen ein Myelom

implantiert wurde, die Konditionierung mit Polyinosin:Polycytidyl-Säure (Poly I:C) (UCS) und Kamphergeruch (CS) zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebenszeiten (Ghanta et al. 1987; 1988). Ebenso kann die Immunotherapie zur Bekämpfung eines T-Zell-Lymphoms konditioniert werden, wie Experimente an Mäusen zeigten, deren Tumorwachstum verzögert und deren Überlebenszeiten verlängert wurden (Ghanta et al. 1993).

Innerhalb der Transplantationsmedizin werden immunsuppressive Substanzen wie CY eingesetzt, um eine Abstoßungsreaktion nach Transplantation von Organen zu verhindern. Tierexperimentell konnte mit dem Modell der allogenetischen Hauttransplantation die Abstoßungsreaktion durch vorherige Konditionierung mit CY (UCS) und der Saclösung (CS) verglichen mit unkonditionierten Tieren signifikant verzögert werden (Gorczynski 1990).

Der denkbare Einsatz von konditionierten Immunreaktionen im klinischen Bereich ist mannigfaltig. Beispielsweise wäre es sinnvoll, die Dosis von immunsuppressiven Präparaten durch den Einsatz von Immunkonditionierung zu minimieren und damit die schädigenden Nebenwirkungen der Medikamente zu senken (Exton et al. 2001).

### **1.6. Konditionierte Immunsuppression mit Cyclosporin A**

CY ist ein antimitotischer Wirkstoff, der daher jegliche sich rasch teilende Zellpopulation inhibiert, also auch sämtliche aktivierte Lymphozytenpopulationen. Obwohl es in dem CTA-Paradigma durchaus effektiv wirkt, handelt es sich um ein breit gefächert agierendes und insofern ‚unsauberes‘ Mittel. Im Gegensatz dazu inhibiert Cyclosporin A (CsA) selektiv die IL-2 Produktion innerhalb des Immunsystems und darüber primär die zelluläre zytotoxische Aktivierung (Cluster of Differentiation (CD)8+, zytotoxische T-Zellen und NK-Zell-Aktivität) (Resch et al. 1997). Es findet bis heute Anwendung als das Standardpräparat in der Transplantationschirurgie, um die zytotoxische Abstoßung eines Fremdorgans zu verhindern. Darüber hinaus weiß man, dass ip Injektionen mit CsA effektiv als UCS in dem CTA Paradigma bei der Ratte eingesetzt werden können (Exton et al. 2000a, 2001). Dies wiederum erlaubt eine detaillierte Erforschung der klassischen konditionierten Immunsuppression mit möglicher klinischer Validität.

### **Verzögerte Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation**

Grochowicz et al. (1991) untersuchten als erste den Einsatz von CsA als immunsuppressiven UCS innerhalb des CTA Paradigmas zur Verzögerung einer Transplantatabstoßung. Dies war eine logische Konsequenz aus einer zuvor veröffentlichten Studie, die belegte, dass das CY-CTA Paradigma die Überlebenszeiten von Hauttransplantaten zweier verschiedener Mausstämme verlängern konnte bei Darbietung des CS (Sac) allein (Gorczyński 1990). In der ersten CsA-Studie wurde die Überlebenszeit bei heterotopen Herztransplantationen bei der Ratte analysiert. Das MHC-inkompatible Spenderherz wurde heterotop in die Peritonealhöhle der Empfängertiere transplantiert. 15 Tage vor der Transplantation wurden die Empfängerratten zur Habituation auf Wasserdeprivation gesetzt, dabei hatten sie täglich 10 Minuten Zugang zum Trinkwasser. Am 10. und 6. Tag vor der Transplantation erhielt die konditionierte Gruppe Sac-Lösung an Stelle des Trinkwassers, gefolgt von einer ip Injektion mit dem Immunsuppressivum CsA als UCS (20mg/kg). Einen Tag vor und an drei der Transplantation folgenden Tagen wurden die Ratten dem CS allein reexponiert. Die Überlebenszeiten der Herzen unter den transplantierten Tieren war bei den konditionierten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine Reexposition mit dem CS erhalten hatte. Parallel dazu zeigten die konditionierten Tiere auch in der Reexposition eine CTA. Dieses Phänomen wurde in einer späteren Studie repliziert, in der Herzen von LEWIS-Ratten heterotop in Dark Agouti (DA)-Ratten implantiert wurden. Das Konditionierungsprotokoll war hier leicht modifiziert. Wieder zeigte sich bei den konditionierten DA-Ratten eine signifikante Verzögerung der Abstoßungsreaktion verglichen mit nichtkonditionierten Kontrolltieren und einer vergleichbaren Verzögerung mit Tieren, die parallel zu der Reexposition CsA-Injektionen erhielten, die sogenannte pharmakologische Kontrollgruppe. Die verzögerte Abstoßungsreaktion konnte nicht durch residuale CsA-Spiegel erklärt werden (Exton et al. 1998c).

Exton et al. (1998a) replizierten diese Befunde und untersuchten dabei die zugrunde liegenden Wirkmechanismen der konditionierten Immunsuppression. Die Arbeitsgruppe dokumentierte, dass im Zuge der konditionierten Verzögerung der Abstoßungsreaktion bei den Herztransplantationen eine Immunsuppression auf zellulärer Ebene in Lymphozyten in der Milz stattfindet. Bei den konditionierten

Tieren war die *in vitro* Proliferationskapazität der Milzlymphozyten signifikant supprimiert. Zusätzlich war die IL-2 und IFN- $\gamma$  Produktion der Milzlymphozyten inhibiert. Neuronale Pfade scheinen diese immunologischen Veränderungen als Reaktion auf den CS zu vermitteln, denn sie werden bei vorangegangener sympathischer Denervation des Milznerven vollständig ausgeschaltet. Gleichzeitig fiel der Noradrenalin Spiegel in der Milz ab. Die Vermittlung vom Nervensystem zum lymphatischen Organ über (noradrenerge) Nervenfasern hat demnach einen entscheidenden Anteil an dieser konditionierten Immunantwort.

In einer weiteren Studie erhielten die konditionierten Tiere in diesem Transplantationsmodell eine zusätzliche, subtherapeutische CsA-Injektion (2mg/kg, 10x weniger als eine pharmakologisch wirksame Dosis). Die subtherapeutische CsA-Gabe allein führte zu keiner signifikanten Verzögerung der Abstoßungsreaktion verglichen mit einer nicht-CsA-behandelten Kontrollgruppe. Allerdings zeigte sich bei den Tieren, die zusätzlich konditioniert wurden, eine deutlich verzögerte Abstoßungsreaktion durch die subtherapeutische CsA-Gabe. 2 von 9 Tieren wiesen noch 100 Tage nach der Transplantation ein voll funktionsfähiges Spenderherz auf. Auch in dieses Experiment waren Gruppen implementiert, um die Mechanismen dieses Phänomens aufzudecken. Bei Tieren, deren sympathische Milzinnervation zuvor chirurgisch denerviert worden war, blieb der konditionierte Effekt aus. Diese beiden Studien zusammen genommen kann man davon ausgehen, dass Klassische Konditionierung die Überlebensdauer von Tieren mit Herztransplantaten erhöhen kann, indem die Produktion von Th1 Zytokinen supprimiert wird, die für die zytotoxische Aktivität essentiell sind. Die sympathische Innervation der lymphatischen Organe scheint hier den efferenten Kommunikationspfad (konditionierte immunsuppressive Effekte) zu stellen.

### **Weitere Mechanismen der konditionierten CsA-Immunsuppression**

Die Mechanismen der konditionierten Immunsuppression in dem CSA-CTA Paradigma wurden von der Arbeitsgruppe um Exton weiter analysiert, in der Folge getrennt von den Transplantationsstudien. In einer dieser Experimente wurden drei CS-UCS Paarungen (Sac, CsA) durchgeführt, diese drei Paarungen reichten aus, um die induzierte CTA in bis zu sieben Reexpositionen mit dem CS allein aufrechtzuerhalten (Exton et al. 1998b). Nach der dritten CS-Reexposition wurden

Immunfunktionen gemessen. Das Thymus- und Milzgewicht sowie die *in vitro* Proliferationskapazität der Milzlymphozyten nach Mitogenstimulation mit Concanavalin-A (Con-A) war signifikant reduziert.

Exton et al. (2000b) haben die Rolle der sympathischen Milzinnervation noch in einem anderen *in vivo* Modell, der Kontakthypersensitivität, untersucht. Wie in der Herztransplantationsstudie wurden die Ratten mit dem CsA-CTA Paradigma konditioniert. Anschließend wurde eine Sensitivierung durch die Applikation eines Kontaktallergens (2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB) auf die Haut des Abdomens der Tiere induziert. Vier Tage später wurde den Tieren DNCB auf das Ohr appliziert. Die Stärke der Kontakthypersensitivitätsantwort, die eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ darstellt, delayed type of hypersensitivity (DTH), ein Maß für die Makrophagenaktivierung und Th1 Zellimmunität, wurde anhand des Ausmaßes der am Ohr gemessenen Schwellungen bestimmt. Reexposition des CS (Sac) erwies sich als genauso effektiv in der Reduzierung der Schwellung, also der allergischen Reaktion, wie der UCS (das CsA). Interessanterweise konnte der konditionierte Effekt in diesem Modell durch Milzdenervation nicht blockiert werden. Es scheinen also verschiedene efferente Kommunikationswege in dem CsA-CTA Paradigma zu existieren, auf denen der CS die zellulären Immunfunktionen beeinflusst, in Abhängigkeit von der Art des immunologischen Reizes.

Interessanterweise scheint es in dem CTA Paradigma Unterschiede darin zu geben, wie das Immunsystem auf den CS (Sac) reagiert und wie es auf den UCS (CsA) reagiert. Von Hörsten et al. (1998) fanden Zirkulationsunterschiede von immunkompetenten Zellen auf dem Weg in die Peripherie. Nach der CsA-CTA Konditionierung wird in der Ratte bei der CS Reexposition eine Leukopenie (verminderte Leukozytenzahl) im peripheren Blut erzeugt. Hierbei handelt es sich vornehmlich um eine Reduktion der B-Lymphozyten, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (naive und Gedächtniszellen) und Granulozyten. Granulozytenfunktionstests demonstrierten deren Eingeschränktheit. Im Gegensatz dazu beeinflusste alleinige CsA-Behandlung nicht die Funktionstüchtigkeit der Granulozyten, und die Lymphozytenzahl in der peripheren Zirkulation war angestiegen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass sich die Kommunikationspfade zwischen Nerven- und Immunsystem zwischen medikamenteninduzierten (UCS) und



Zur zentralen Prozessierung der konditionierten Geschmacksaversion (CTA) gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Studien, die die zentrale Verarbeitung gustatorischer Signale im ZNS beschreiben. Im Folgenden wird zunächst die relevante Literatur zur CTA referiert. Anschließend wird ein Überblick über die Studien gegeben, die zentrale Substrate bei der ZNS-Immunsystem-Kommunikation aufzeigen.

### **Konditionierte Geschmacksaversion (CTA)**

Abbildung 2 zeigt die an der CTA bzw. klassisch konditionierten Immunsuppression beteiligten Hirnareale und ihre efferenten und afferenten Verschaltungen. Gustatorische Fasern tragen die Information über den Geschmack einer Nahrung (bspw. Sac) zum Nucleus tractus solitarius (NTS) im Hirnstamm. Viszerale Fasern, die die Feedbackinformation der Nahrungsaufnahme übermitteln, laufen in den gleichen Hirnstamm- und Mittelhirnarealen zusammen. Ist eine Nahrung toxisch, und ruft sie gastrointestinale Beschwerden hervor, wird diese Information entweder über den Vagusnerv zum NTS geleitet oder, wenn das Toxin in den Blutkreislauf absorbiert wurde, zur Area postrema in derselben Region des Hirnstammes. Die gleichen Mechanismen bzw. Routen kontrollieren den Brechreflex, der die toxische Nahrung aus dem Magen entfernt, und die CTA, die zukünftige Aufnahme der gleichen Nahrung verhindert (Bures et al. 1998).

Die weiterführende neurale Vermittlung der CTA, nachdem der Hirnstamm passiert wurde, ist intensiv untersucht worden (Kiefer 1985). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass der Inselkortex notwendig für den Erwerb und den Abruf dieses Lernprozesses ist (Garcia et al. 1985). Läsionen des Inselkortex, nicht aber der Amygdala blockieren die CTA (Bermudez-Rattoni et al. 1991a; Gallo et al. 1992). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch andere aversive Lern- und Gedächtnisprozesse sowohl durch irreversible als auch durch reversible Läsionen des Inselkortex blockiert werden, wie die inhibitorische Vermeidung oder das ‚Morris water maze‘ (Bermúdez-Rattoni et al. 1991a; Dunn et al. 1988). Die inhibitorische Vermeidung wurde ebenfalls durch Läsion der Amygdala blockiert. Trotz zahlreicher reziproker Verschaltungen scheinen diese beiden Regionen unterschiedliche Funktionen bei der Vermittlung verschiedener Formen aversiven Lernens einzunehmen, wobei der Inselkortex der Amygdala vorgeschaltet zu sein scheint. Des Weiteren hängt die Formierung eines Langzeitgedächtnisses für eine

konditionierte Geschmacksaversion (CTA) insbesondere von muskarinergen und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren im Inselkortex ab (Berman et al. 2001). Außerdem ist gezeigt worden, dass Inselkortexneurone nach einer CTA-Etablierung aktiviert werden als Antwort auf eine Reexposition mit dem Sac (Yasoshima et al. 1998). Der Inselkortex ist jedoch für die sensorische Unterscheidung gustatorischer Reize unbedeutend, d.h. Inselkortex-lädierte Tiere detektieren einen Geschmack normal, wie ein unbehandeltes Tier. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Inselkortex-Beteiligung in dem CTA-Phänomen auf die Geschmackswahrnehmung attribuiert werden kann (Braun et al. 1982). Der Inselkortex scheint also eine tragende Rolle bei der Entwicklung der CTA zu spielen.

Bezüglich des ventromedialen Kerns des Hypothalamus (VMH) existieren einige wenige Studien, die dieses Areal im Zusammenhang mit der konditionierten Geschmacksaversion (CTA) untersucht haben. Yamamoto et al. (1995) fanden, dass exzitotoxische Läsionen der hypothalamischen Kerne, die das Nahrungsaufnahmeverhalten regulieren, das laterale hypothalamische Areal (Esszentrum) und der VMH (Sättigungszentrum) keine Auswirkungen auf die Entwicklung einer CTA haben. Auch Weisman et al. (1972) berichten, dass Ratten mit elektrolytischer VMH-Läsion sogar eine stärkere Aversion gegen gesüßte Milch gepaart mit Methylatropin entwickelten und sich resistenter gegen eine Löschung zeigten als Kontrolltiere. Kramer et al. (1983) zeigten, dass Hyperphagie-induzierende Schnitte im ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) von normalgewichtigen Ratten keinen Einfluß auf die konditionierte Geschmacksaversion (CTA) hatten, bei Ratten mit hypothalamisch bedingter Fettleibigkeit verstärkte sich die CTA. Dagegen erwerben VMH-lädierte Ratten eine CTA gegenüber Sac gepaart mit Apomorphin, allerdings langsamer als Kontrolltiere, gleichzeitig erfolgt die Löschung schneller (Gold et al. 1972). Aus der existierenden Literatur geht hervor, dass der VMH in dem CTA-Phänomen allenfalls eine modulierende Rolle einnimmt.

### **Klassische Konditionierung von Immunfunktionen**

Der Inselkortex ist an viszeralen Reaktionen und Stress beteiligt (van der Kooy et al. 1984) und er wird auch als gustatorischer oder viszeraler Kortex bezeichnet, da er viszerale und gustatorische Informationen vom Thalamus empfängt (Kiefer 1985). Er ist reziprok mit dem Nucleus tractus solitarius verschaltet (Ito 1992; Kiefer 1985),

dem Eingang aller viszeralen und gustatorischen Informationen und einem wichtigen Relay für Informationen des sympathischen Nervensystems. Letzteres ist bei neuralimmunen Interaktionen von Bedeutung, da es primäres und sekundäres Lymphgewebe innerviert (Felten et al. 1987; Felten et al. 1991) (vgl. auch Abb. 2).

Es gibt erste Hinweise aus Läsionsstudien bei der klassischen Konditionierung humoraler Immunfunktionen, die den Inselkortex und die Amygdala als Ort der Prozessierung identifiziert haben. Inselkortex und Amygdala sind funktional und reziprok miteinander verschaltet und beide Strukturen sind mit Regionen des autonomen Nervensystem und des limbischen Systems verknüpft, die ihrerseits eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem spielen. Bilaterale Läsionen des Inselkortex und der basolateralen Kerngebiete der Amygdala vor der Konditionierung durchgeführt (afferenter Weg) blockieren die konditionierte verminderte Antikörperproduktion (Ramírez-Amaya et al. 1996). Ähnlich scheinen auch bei der konditionierten Immunstimulation (Immunglobulin G Antikörperproduktion) die Amygdala und der Inselkortex, nicht jedoch Teile des dorsalen Hippokampus für die zentralnervöse Verarbeitung von CS und UCS notwendig zu sein (Alvarez-Borda et al. 1995; Ramírez-Amaya et al. 1999). Werden bilaterale Läsionen nach der Konditionierungsphase, aber vor der Reexposition gesetzt (efferenter Weg), zeigen die Befunde, dass der Inselkortex für die Informationsvermittlung an das Immunsystem notwendig ist, die Amygdala dagegen nicht, hier fand die konditionierte Reaktion trotz Läsion statt (Ramírez-Amaya et al. 1998).

Die bisherigen Befunde zeigen, dass vermutlich die Amygdala bei dem Feedback-Mechanismus des Immunsystems, der beim Erwerb der konditionierten Immunreaktion erforderlich ist, wichtig ist. Die Amygdala ist eng verbunden mit dem autonomen Nervensystem, das wiederum über unterschiedliche Kommunikationswege Informationen mit dem Immunsystem austauschen kann. Des Weiteren ist dokumentiert, dass diese zentralnervöse Struktur auf immunologische Veränderungen reagiert (Masek et al. 1992) und Rezeptoren für verschiedene Interleukine exprimiert (Cunningham et al. 1993). Der Inselkortex ist sowohl am Erwerb als auch am Abruf der konditionierten humoralen Immunantwort maßgeblich beteiligt. Er ist wahrscheinlich für die Integration von Einzelinformationen (viszerale,

gustatorische, kognitive) verantwortlich und vermittelt die assoziativen Mechanismen der Konditionierung immunologischer Reaktionen.

Der ventromediale Kern des Hypothalamus (VMH) gilt als der Kern des Hypothalamus, der die stärksten Verbindungen zum sympathischen Nervensystem aufweist. Beispielsweise resultiert aus elektrischer Stimulation des VMH ein beschleunigter Noradrenalin-, Turnover' (ein biochemischer Index für die Aktivität des sympathischen Nerven) in den meisten peripheren Organen einschließlich der Milz (Saito et al. 1989). Darüber hinaus haben Okamoto et al. (1996) gezeigt, dass VMH-Stimulation eine signifikante Reduktion in der Proliferationsrate ConA-stimulierter Milzlymphozyten zur Folge hatte. Die verminderte Antwort wurde durch eine vorhergehende sympathische Denervation, nicht aber durch eine Adrenalectomie unterbunden. Diese supprimierte Milzlymphozytenaktivität scheint also durch Aktivierung der VMH-Sympathikus-Achse vermittelt zu werden. Die tragende Rolle des sympathischen Nervensystems in der Immunsuppression konnte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden, so auch bei der Konditionierung von Immunfunktionen (Exton et al. 1998a). Daher liegt es nahe, die zentrale Komponente dieser Achse in dem Konditionierungsphänomen zu untersuchen, den ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH). Interessanterweise konnte dokumentiert werden, dass VMH-Läsionen die NK-Zell Aktivität blockieren, nicht aber die B- und T-Zell-Aktivität bei Mäusen beeinflussen (Forni et al. 1983). Es gibt weitere Belege dafür, dass der VMH an der Neuroimmunomodulation beteiligt ist. Brooks et al. (1982) fanden heraus, dass beispielsweise Läsionen des VMH in einem Absinken der Milzlymphozyten resultiert. Schiavi et al. (1975) zeigten, dass Läsionen, die den VMH beinhalteten, das Auftreten tödlicher anaphylaktischer Schocks in sensitivierten Meerschweinchen verringerten. Die Induktion einer Immunantwort auf Schafserythrozyten oder trinitrophenyliertes Hämocyanin bei anästhetisierten Ratten führte zu Veränderungen in der elektrischen Aktivität der Neurone im VMH (Besedovsky et al. 1977). Devi et al. (1996) berichten dagegen, dass weder die Stimulation noch die Läsion des VMH eine Immunmodulation hervorruft in den untersuchten Parametern: Anzahl der ‚Plaque forming‘ Zellen, Antikörpertiter, Leukozytenmigration-Inhibitionsindex, Pfortendicke. Sie gehen daher davon aus, dass der VMH Informationen vom Immunsystem empfängt und nicht immunmodulierend fungiert.

## 1.8. Forschungsbedarf und Fragestellung

Die Klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte mit dem tierexperimentellen CsA-CTA-Paradigma stellt eine gute Möglichkeit dar, die grundlegenden Mechanismen und Kommunikationswege der bidirektionalen Verbindungen zwischen ZNS und Immunsystem zu untersuchen (siehe Kap. 1.6). Darüber hinaus hat die Klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte klinische Relevanz (siehe Kap. 1.5). Aus mittlerweile gut dokumentierten Daten ist bekannt, dass die Vermittlung dieser konditionierten Effekte peripher durch die sympathische Innervation der Milz gesteuert wird (Exton et al. 1998a), insbesondere über Noradrenalin durch  $\beta$ -Adrenozeptoren (Exton et al. 2002). Dagegen ist bisher weitgehend ungeklärt, wie die Klassisch konditionierte Immunsuppression zentral prozessiert wird. Es gibt einige wenige Studien, die dieses Phänomen auf humoraler Ebene des Immunsystems untersucht haben (siehe Kap. 1.7). Studien, die zentrale Mechanismen bei der Klassischen Konditionierung zellulärer Immunfunktionen erforschen, sind bislang nicht veröffentlicht. Daher liegt der Fokus in dieser Arbeit auf der Analyse der zentralen Mechanismen bei der Klassisch konditionierten Immunsuppression. Ziel ist es, zu analysieren, inwieweit die Hirnareale Inselkortex und ventromedialer Kern des Hypothalamus (VMH) an der Klassischen Konditionierung zellulärer Immunfunktionen beteiligt sind. Dazu werden zwei Experimente durchgeführt, welche die Auswirkungen chemischer Läsionen dieser Areale auf die ConA-stimulierte Proliferation von T-Lymphozyten der Milz sowie die Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  bei der Konditionierung untersuchen, die die Hauptangriffspunkte der CsA-vermittelten und konditionierten immunsuppressiven Effekte darstellen. Es wird erwartet, dass chemische Läsionen des Inselkortex und ventromedialen Kern des Hypothalamus zu einer Blockade der konditionierten immunsuppressiven Effekte führen. Die Milzlymphozytenproliferation sowie die Zytokin-Produktion der Tiere mit Läsion sollen verglichen mit den scheinladierten Kontrollgruppen keine verminderten Werte aufweisen, also nicht immunsupprimiert werden, weil angenommen wird, dass hier der konditionierte Effekt blockiert wird, wenn diese Areale tatsächlich für die Konditionierung von Immunfunktionen notwendig sind. Die Effekte der Läsionen auf die Konditionierung werden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten getestet, denn während der Konditionierung finden zwei verschiedene Prozesse statt. Einmal ein Lernprozess in der Konditionierungsphase, also bei der Paarung von CS und UCS: hier wird eine Assoziation dieser beiden

parallel dargebotenen Stimuli im Gehirn gebildet (Erwerb). Der zweite Prozess ist ein Gedächtnisprozess und findet während der Reexpositionphase statt. Hier wird die zuvor gelernte Assoziation vom Gedächtnis abgerufen (Abruf). Daher werden Läsionen einmal vor der Konditionierungsphase gesetzt, um den Effekt der Läsion auf den Erwerb (afferenter Weg) zu testen, und einmal nach der Konditionierungsphase, aber vor der Reexpositionphase, um den Effekt der Läsion auf den Abruf (efferenter Weg) zu testen. Zusätzlich werden Daten auf der Verhaltensebene erhoben und die Trinkmengen der Tiere werden dokumentiert, um festzustellen, ob sie eine konditionierte Geschmacksaversion entwickeln. Auch hier wird erwartet, dass die scheinlädierten Tiere die typische konditionierte Reaktion zeigen, also das Sac vermeiden, während die Geschmacksaversion bei den lädierten Tieren blockiert ist. Um zu testen, ob die Läsion per se Funktionen des Immunsystems beeinflusst, wurden zwei weitere Kontrollexperimente durchgeführt, in denen den Tieren Läsionen des Inselkortex oder des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) zugefügt und diese mit entsprechenden scheinlädierten Kontrolltieren verglichen wurden. Sollten sich hierbei keine Unterschiede in den Immunfunktionen zwischen Läsion und Scheinläsion zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass die dokumentierten Effekte aus den Konditionierungsexperimenten der Konditionierung selbst und nicht immunologischen Auswirkungen der Läsion zuzuschreiben sind.

## **2. Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Die Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zur Konditionierung von Immunfunktionen wurde von der Bezirksregierung Düsseldorf am 10.08.2000 unter der TSG-Nr. G 585/00 und am 13.11.2002 unter der TSG-Nr. G 706/02 erteilt.

Für die Experimente wurden männliche DA Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland), die über das Zentrale Tierlabor des Universitätsklinikums Essen bezogen worden sind, verwendet. Die Tiere wogen bei Versuchsbeginn durchschnittlich 250g, was einem Alter von 3-4 Monaten entspricht. Alle Experimente fanden in den Räumlichkeiten des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen statt. Die Tiere wurden in Makrolon®-Einzelkäfigen Typ III (800 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) untergebracht. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem vollklimatisierten Labor (Temperatur 20-22°C und Luftfeuchtigkeit 52,5 ± 2,5%) mit einem künstlichen, invertierten 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus (Licht von 19.00-07.00 Uhr MEZ). Die Tiere erhielten Rattenhaltungsfutter 10H10 (Nohrlin, Bad Salzuflen, Deutschland) und bis zum Beginn der Konditionierung Wasser ad libitum. Alle Tiere durchliefen vor Beginn der Experimente eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche.

### **2.2. Stimuli der Konditionierung**

#### **Saccharin**

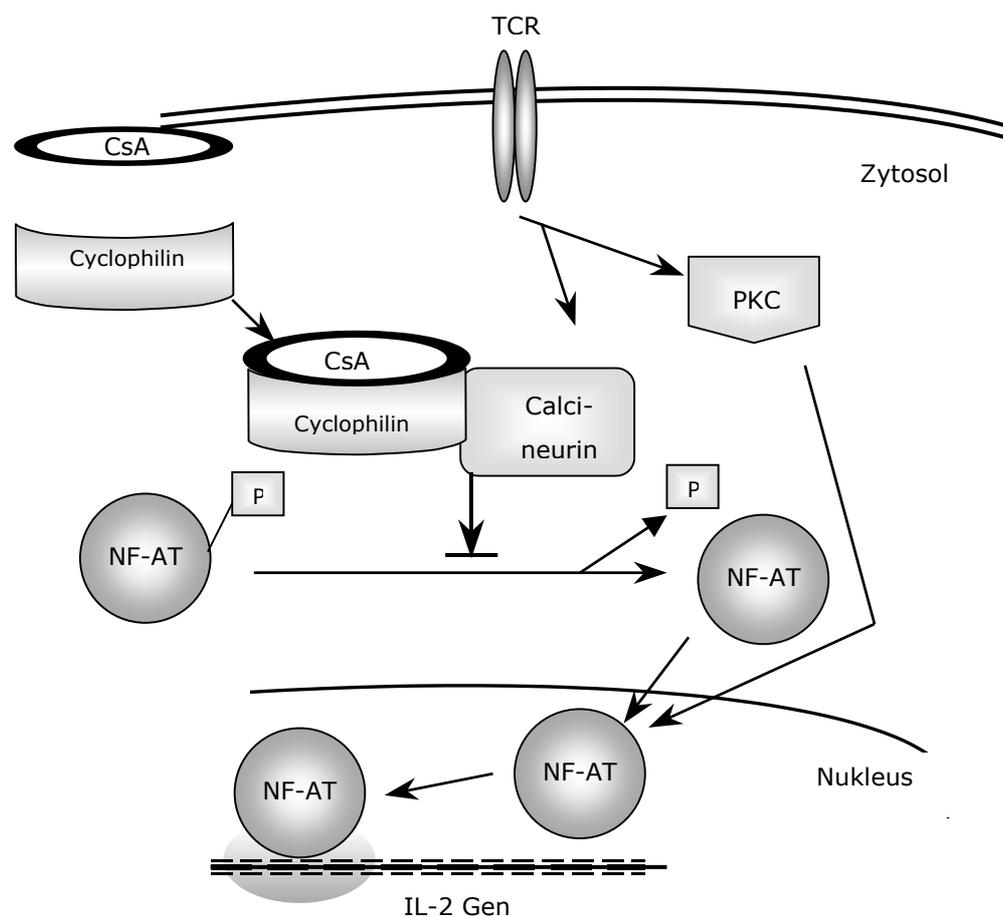
Als CS diente in allen Experimentalreihen eine 0,2%ige Sac-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), die in standardisierten Trinkflaschen dargeboten wurde.

#### **Cyclosporin A**

Das Immunsuppressivum (CsA) wurde als UCS eingesetzt. Bei diesem Medikament handelt es sich um ein aus 11 Aminosäuren bestehendes zyklisches Peptid, das aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen wird (Kahan, 1989). CsA hemmt die Zytokinproduktion von aktivierten T-Zellen, insbesondere die von IL-2, und wirkt damit immunsuppressiv und beeinflusst die zelluläre Immunität (Resch et al. 1997).

Über eine Komplexbildung mit Cyclophilin hemmt es Calcineurin, eine Proteinphosphata, die für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) zuständig ist. Damit wird der Übergang des NF-AT in den Zellkern und in die Transkription des IL-2 Gens blockiert. Ferner interferiert das CsA mit der Signaltransduktion des T-Zellrezeptors über Hemmung der Proteinkinase C $\beta$  und der nukleären Komponenten des NF-AT. Neben der IL-2 Transkription zeigt CsA auch hemmende Wirkung auf andere Zytokine (IL-3, IL-4, IL-8, IFN- $\gamma$ ) (Burmester & Pezzutto 1998) (Abbildung 3).

Den Tieren wurde das CsA ip in einer Dosierung von 20mg/kg appliziert. Dazu wurde 1g CsA (Novartis, Nürnberg, Deutschland) in 9,6 ml Miglyol (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) und 0,4 ml Ethanol (100%) bei ca. 50°C gelöst.



**Abbildung 3: Die Wirkweise von Cyclosporin A (nach Burmester & Pezzutto, 1998)**

Diese CsA-Stocklösung wurde kurz vor der Applikation um das 16fache der Zielkonzentration (20mg/kg) entsprechend mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) (ICN, Eschwege, Deutschland) verdünnt. Diese Dosierung hatte sich als effektiv zur Konditionierung immunsuppressiver Effekte in früheren Experimenten erwiesen (Exton et al., 1998a,b; Klosterhalfen & Klosterhalfen, 1990; Grochowicz et al., 1991). Für die Kontrollinjektionen wurde ebenso PBS verwendet.

### 2.3. Design der Basis-Konditionierung

Das folgende Design zeigt die Gruppen innerhalb eines Basis-Konditionierungsexperimentes ohne Berücksichtigung der gesetzten Läsionen. Es waren insgesamt vier Gruppen, eine Experimental- und drei Kontrollgruppen (Tab. 1).

Die Experimentalgruppe wurde konditioniert, d.h. sie erhielt gleichzeitig Sac und CsA als CS/UCS-Paarung. In der CS-Reexpositionphase wurde den Tieren nur das Sac dargeboten. Die nicht kontingent konditionierten Kontrolltiere erhielten ebenfalls Sac und CsA, allerdings nicht zeitlich kontingent. In der Reexposition erhielten sie ebenfalls die Sac-Lösung. Die CsA-Kontrollgruppe wurde in der Erwerbsphase behandelt wie die nicht kontingent konditionierte Gruppe, bekam aber zusätzlich in der Reexposition CsA injiziert, um die pharmakologische Wirkung des CsA zu kontrollieren, d.h. hier wurde der reine Medikamenteneffekt sichtbar, der in der Experimentalgruppe durch das Sac allein konditioniert werden sollte. Die unbehandelten Kontrolltiere fungierten als Baseline, sie erhielten keine Injektionen.

**Tabelle 1: Gruppen-Design**

Beschreibung der Versuchsgruppen anhand der dargebotenen Trinklösung (Sac, Wasser) und Injektion (CsA, PBS) zur Konditionierungs- und Reexpositionphase (n. kont. kond.=nicht kontingent konditioniert)

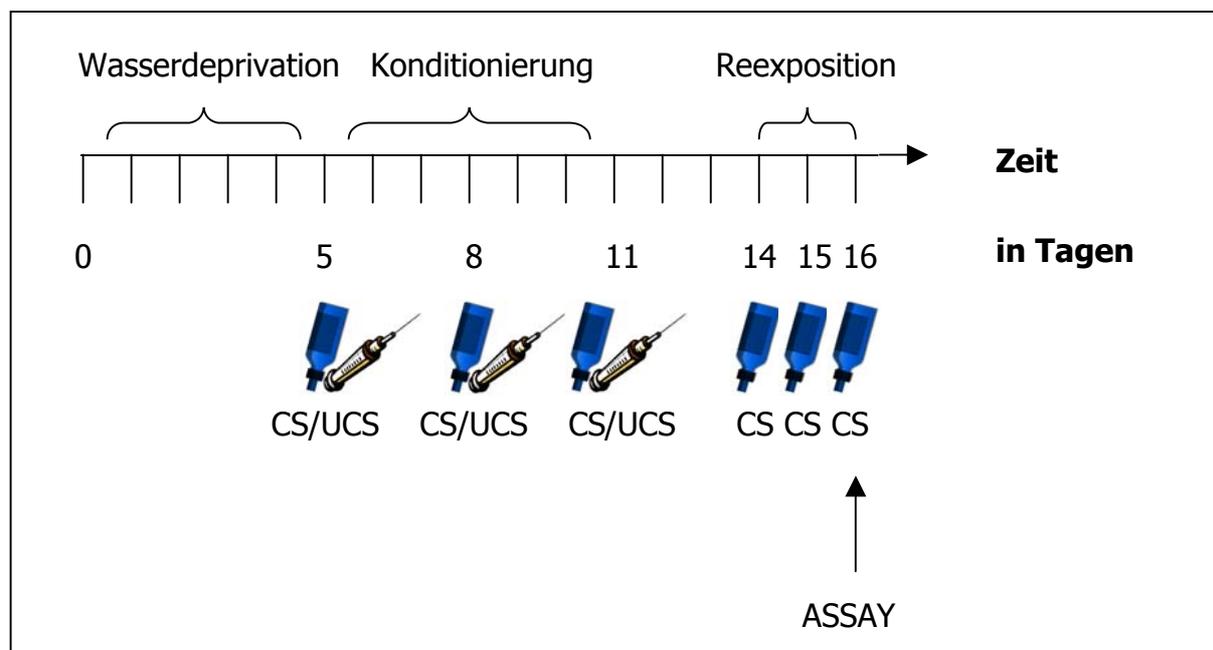
Gruppe	CS/UCS		CS	
	Konditionierungsphase		Reexposition	
	Morgens	Nachmittags	morgens	Nachmittags
Konditioniert	Sac/CsA	Wasser/PBS	Sac	Wasser
CsA-behandelt	Wasser/CsA	Sac/PBS	Wasser/CsA	Sac
n. kont. kond.	Wasser/CsA	Sac/PBS	Wasser	Sac
Unbehandelt	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser

## 2.4. Durchführung der Basis-Konditionierung

Ein Konditionierungsexperiment gliederte sich in zwei Phasen: die Erwerbsphase oder auch Konditionierungsphase, in der UCS und CS miteinander gepaart werden.

Fünf Tage vor Beginn der ersten CS/UCS-Paarung (Abb.4) wurden alle Tiere auf Wasserdeprivation gesetzt, d.h. der Zugang zum Trinkwasser ad libitum wurde ihnen entzogen und sie hatten von jetzt an zweimal am Tag für je 15 Minuten die Möglichkeit, Wasser zu trinken. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Tiere zu diesen Zeitpunkten tranken, wo im folgenden die Trinklösung mit der Injektion gepaart wurde, damit sie das Sac gleichzeitig mit der CsA-Injektion erhielten, um die Assoziation knüpfen zu können. Dies galt auch an den Tagen zwischen den CS/UCS-Paarungen und an den Tagen zwischen Erwerbs- und Reexpositionsphase.

Nach der anfänglichen fünftägigen Wasserdeprivation folgte die Paarung von CS und UCS drei Mal im Abstand von jeweils drei Tagen. Hier wurde der neuartige Stimulus Sac mit dem UCS CsA gekoppelt. In dieser Zeit wurde Sac bei erfolgreicher Konditionierung zum konditionierten Stimulus, der ähnliche Reaktionen auszulösen vermag wie zuvor der UCS.



**Abbildung 4: Ablauf eines Basiskonditionierungsexperimentes**

Darstellung des Konditionierungsprotokolls im zeitlichen Verlauf mit dem Start der Wasserdeprivation, den CS/UCS-Paarungen und der CS-Reexposition.

Üblicherweise drei Tage später fand die Reexposition mit dem CS allein an drei aufeinanderfolgenden Tagen statt. Am Morgen nach der dritten Reexposition wurden die Tiere eine Stunde nach dem Konditionierungsvorgang, um die Metabolisierung des CsA in der CsA-Kontrollgruppe zu gewährleisten, in Narkose getötet. Dann wurde die Milz zur späteren Aufbereitung und Analyse der Milzlymphozyten und der Zytokine aus den Überständen der gewonnenen Milzlymphozytenzellkulturen entnommen.

## **2.5. Abhängige Variablen**

### **Geschmacksaversion**

Die Wasserdeprivation fünf Tage vor dem ersten Konditionierungsdurchgang gewöhnte die Ratten an eine zweimalige Flüssigkeitsaufnahme pro Tag, um ihren Wasserbedarf zu decken. Durch die Messung der Trinkmenge nach jeder CS/UCS-Paarung konnte bestimmt werden, ob die Tiere der Experimentalgruppe mit der Zeit eine Geschmacksaversion gegen die Sac-Lösung entwickelten. Die Trinkmenge wurde ermittelt, indem die Flaschen vor und nach der Trinksession mit einer elektronischen Waage gewogen wurden. Die Flaschen waren mit einem einheitlichen Kugelventil (Uno, Didam, Niederlande) ausgestattet.

### **Proliferation der Milzlymphozyten**

Die Kapazität der Milzlymphozyten nach Mitogenstimulation zu proliferieren mit dem T-Zell-spezifischen Lectin ConA wurde mit einem Standard-Assay analysiert. Am letzten Versuchstag wurde den Tieren eine Stunde nach der dritten CS-Reexposition die Milz entnommen. Die Organentnahme erfolgte unter Narkose mit Diethylether (Fischer, Saarbrücken, Deutschland) bei Aufrechterhaltung der Kreislauffunktionen. Nach Öffnung des Abdomens mittels eines medialen Schnittes wurde die Milz aus dem umgebenden Bindegewebe freipräpariert und anschließend in RPMI-Medium (RPMI-Medium 1640, Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 5% inaktiviertem fötalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland) auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet. Die Aufbereitung der Milzlymphozyten erfolgte im Labor unter sterilen Arbeitsbedingungen. Zunächst wurden sie durch Ausspritzen vom Milzgewebe getrennt. Dazu verwendete man eine 10ml-Spritze (Amefa, Bad Arolson, Deutschland) mit einer 20G-Kanüle (Terumo, Leuven, Belgien), mit der man das

Milzgewebe mit Medium durchspülte. Nach einer 15minütigen Hämolyse mit 8 ml Puffer aus NH<sub>4</sub>CL (ICN, Eschwege, Deutschland) und TRIS (ICN, Eschwege, Deutschland) (pH 7.2) im Verhältnis 9:1 wurden die Milzlymphozyten in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop gezählt und auf eine Zellzahl von  $1,6 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium (RPMI 1640 + 5% inaktiviertem FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland) adjustiert. Davon wurden jeweils 100µl Zellsuspension pro Napf auf eine 96-Napf-Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Mitogen ConA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) stimuliert. Für jedes Assay wurden drei Konzentrationen des Mitogens verwendet (0, 1,25 und 2,5µg/ml). Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben erwiesen, dass diese Konzentrationen optimale Stimulation gewährleisten. Nach der Zugabe des Mitogens wurden die Zellen in der Mikrotiterplatte im Brutschrank für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen in der Mikrotiterplatte mit radioaktivem Thymidin ([methyl-<sup>3</sup>H]Thymidine) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) markiert (0,5µCi pro Napf) und für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Harvester (96®, TOMTEC, PerkinElmer, Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland) auf Spezialfilter (Wallac, Turku, Finnland) gebracht und in einem Beta-Counter (Liquid Scintillation & Luminescence Counter 1450 Microbeta® Trilux, Wallac, Turku, Finnland) gemessen. Für jede Mitogenkonzentration und jedes Tier wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Jeder Wert wurde auf Ausreißerwerte hin überprüft und bei einer Abweichung von mehr als 50% von den beiden anderen Werten herausgenommen. Danach wurden die Daten gemittelt.

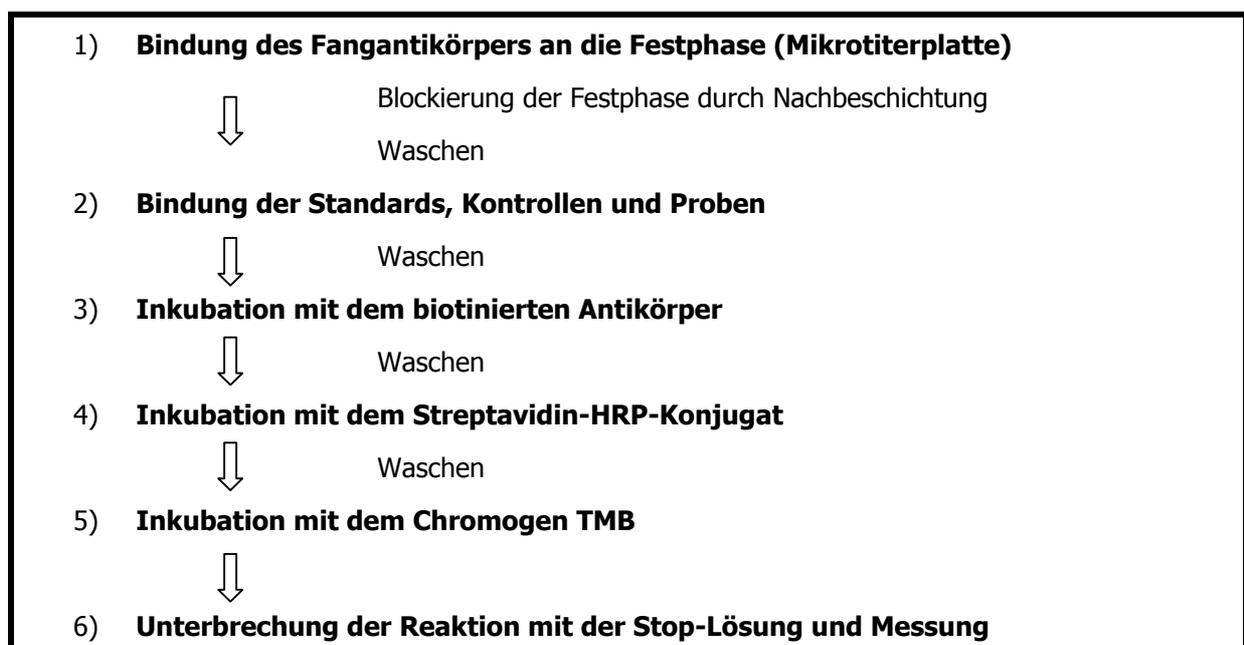
### **Zytokin-Konzentrationen**

Für die Zytokin-Analyse wurde mit den Milzlymphozyten die identische Zellkulturmethode durchgeführt wie in Kap. 2.5.2 beschrieben. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert und die Überstände bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

### **Interleukin-2 (IL-2)**

Zur Analyse der IL-2-Produktion wurde das kommerzielle Enzym-Immunoassay(ELISA) Kit CytoSets™ der Firma Biosource (Nivelles, Belgien)

verwendet, das folgende Reagenzien beinhaltet: 1.) Fangantikörper Maus Anti-Ratte IL-2 des Klons 7H11AB7, 2.) biotiniertes Antikörper Maus Anti-Ratte IL-2 des Klons 12B11AE7, 3.) Standards mit IL-2 von der Ratte und 4.) Streptavidin-HRP-Konjugat. Das Immunoassay wurde nach Anweisung der Hersteller durchgeführt. Ein schematischer Ablauf des Assays ist in Abbildung 5 dargestellt. Der in PBS (pH 7.4) gelöste Fangantikörper wurde über Nacht an die Festphase (Flachboden-Mikrotiterplatte mit 96 Nüpfen) (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gebunden. Diese Reaktion wurde mit einer Blocking Solution, PBS mit 5% Rinder-Serumalbumin, (bovine serum albumin, BSA), die für zwei Stunden auf der Platte verbleibt, beendet. Das zu detektierende Antigen IL-2 aus den Standards und Proben hat während einer eineinhalbstündigen Inkubation an den Fangantikörper gebunden. In einem Waschschrift wurden nicht gebundene Proteine entfernt. In einem weiteren Schritt wurde der in PBS mit 5% BSA und 1% Tween 20 gelöste biotinierte Antikörper addiert, der ebenfalls an IL-2 band. Nach einer Stunde wurde die Platte wieder mehrfach gewaschen. In einer 45minütigen Inkubationsphase setzte sich das Streptavidin-HRP-Konjugat, das als Marker fungiert, an den biotinierten Antikörper und komplettierte den Sandwich-Aufbau. Nach wiederholtem Waschen wurde durch Addition der Substrat-Lösung Tetramethyl Benzidine (TMB) (Biosource, Solingen, Deutschland) eine Farb-Reaktion ausgelöst.



**Abbildung 5: Schematisierter Ablauf des Enzym-Immunoassays**

Die Intensität der Farbveränderung war proportional zur Menge des Antigens in der Probe. Um die Farb-Reaktion zu beenden wurde nach einer definierten Zeitspanne, in diesem Fall nach exakt 30 Minuten, eine Stop-Lösung (1,8NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) addiert. Eine quantitative Auswertung erfolgte mit dem computergesteuerten Photometer EL800 (BIO-TEK Instruments, Deelux, Gödenstorf, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

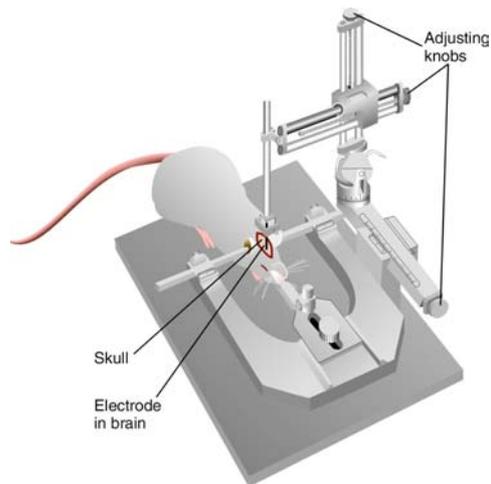
### **Interferon - $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )**

Zur Bestimmung der extrazellulären Konzentrationen des Zytokins IFN- $\gamma$  wurde ein kommerzielles ELISA Kit der Firma U-CyTech der Universität Utrecht (Utrecht, Niederlande) verwendet. Der Ablauf des Assays war dem der IL-2-Bestimmung sehr ähnlich (Abbildung 5). Als Fangantikörper wurde der monoklonale Maus Anti-Ratte IFN- $\gamma$  Antikörper DB-1 und als biotinierter Antikörper der monoklonale Maus Anti-Ratte IFN- $\gamma$  Antikörper DB-12 eingesetzt (Van der Meide, 1989). Die Durchführung des Assays erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Zunächst wurde der Fangantikörper über Nacht an die Mikrotiterplatte gebunden. Nachdem diese Reaktion am nächsten Tag geblockt und die Platte mehrfach gewaschen worden war, wurden die Zytokin-Standards und die Proben in die Näpfe pipettiert. Nach einer mindestens zweistündigen Inkubationsphase und dem wiederholten Waschen der Platte wurde der biotinierte Antikörper aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation und anschließendem Waschen wurde das Streptavidin-HRP-Konjugat addiert. Es folgten eine weitere einstündige Inkubationszeit und ein Waschschrift. Dann wurde die Substrat-Lösung TMB addiert, die dadurch initiierte Farbreaktion wurde nach 30 Minuten mit einer Stop-Lösung (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet. Anschließend wurde die Platte mit dem Photometer EL800 (BIO-TEK Instruments, Deelux, Gödenstorf, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

## **2.6. Läsionen des Inselkortex und des ventromedialen Kern des Hypothalamus**

### **Stereotaktische Operationen**

Um die hier untersuchten Hirnareale zu zerstören (Inselkortex und VMH), erhielten die Tiere bilaterale exzitotoxische Läsionen. Dazu wurde eine Mikrospritze an den Zielort im Gehirn geführt. Mithilfe eines stereotaktischen Atlas (Paxinos & Watson, 1998) konnten die cerebralen Zielstrukturen lokalisiert werden.



**Abbildung 6: stereotaktisches Gerät**

Ein solcher Atlas besteht aus einer Reihe einzelner Karten, deren jede die Struktur eines zweidimensionalen frontalen Hirnschnitts abbildet, welche zusammen genommen das Rattengehirn dreidimensional kartieren. In dem hier benutzten Atlas wird als Referenzpunkt, auf den sich alle Abstände beziehen, das Bregma verwendet, der Punkt auf dem Rattenschädel, an dem sich die beiden wichtigsten Nähte zwischen den Schädelknochen schneiden (Pinel, 2001). Um das Zielareal zu erreichen, wurde ein stereotaktisches Instrument (Kopf, Tujunga, Kalifornien, USA) (siehe Abb. 6) verwendet, welches aus zwei Teilen besteht: einem Kopfhalter, der das Gehirn des Versuchstiers in der gewünschten Position und Orientierung fixiert, und einem Mikrospritzenhalter, in den die Mikrospritze eingeführt wird.

Der Halter lässt sich in allen drei Raumrichtungen justieren: anterior-posterior, dorsal-ventral und lateral-medial. Nach Fixieren des Schädels und Auffinden des Bregmas wurden anhand der Koordinaten aus dem stereotaktischen Atlas die entsprechenden Stellen gesucht und Löcher in den Schädel gebohrt (Dremel, Model 285, Breda, Niederlande), anschließend wurde dort entsprechend tief die Mikrospritze eingeführt. Die Läsionen wurden mit Neurotoxinen erzielt, die eine spezifische Affinität für bestimmte Komponenten des Nervensystems aufweisen. Für die chemische Läsion des Inselkortex wurde N-Methyl-D-aspartic Säure (NMDA), für die des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) Kainatsäure verwendet. Beim NMDA handelt es sich um eine exzitotoxische Aminosäure, ein prototypischer Agonist an den Glutamatrezeptoren, die die Ionenkanäle regulieren (Hansen et al. 1990). Bindet das NMDA an die Glutamatrezeptoren, werden die Zellen überaktiviert und dadurch zerstört. Kainatsäure ist ebenfalls ein Agonist an den



Tiere des ersten Experimentes erhielten Mikroinjektionen in den Inselkortex (AP +1.2, L  $\pm$ 5.5, DV -5.5), 0.8 $\mu$ l NMDA mit einer Geschwindigkeit von 1 $\mu$ l/min., Tiere des zweiten Experimentes erhielten Mikroinjektionen in den ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) (AP -2.8, L  $\pm$ 0.6, DV -9.5), 1 $\mu$ l Kainatsäure innerhalb einer Minute. Bregma und Lambda hatten jeweils die gleiche dorsal-ventrale Koordinate mit einem Abweichungsspielraum von maximal 0.5mm. Die Zielareale sind in den Abbildungen 7a und b grau gekennzeichnet.

### **Histologie der Läsionen**

Am Tag der Organentnahme wurden die Tiere tief narkotisiert und intracardial mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (Delta Select, Pfullingen, Deutschland) und anschließend mit 4%igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0.1M PBS, pH 7.4 gelöst perfusiert. Dadurch wurden Zerstörungsprozesse durch autolytische Enzyme oder Erreger aufgehalten, zugleich wurde das Hirngewebe gehärtet, somit blieben die Strukturen erhalten (Köhler, 2001). Die Gehirne wurden entfernt, in demselben Fixativ für 24 Stunden und danach in einer 30%igen Sukrose-Lösung gelagert. Zur weiteren Analyse wurden die Gehirne auf ein gefrorenes Mikrotom gebracht, einem präzise arbeitenden Schneideinstrument, mit dem das Untersuchungsmaterial in 40 $\mu$ m dünne Scheiben zerlegt wurde. Dadurch lässt es unter dem Mikroskop genügend Licht durch. Jeder zweite Hirnschnitt wurde auf einen zuvor mit Gelatine präparierten Objektträger gebracht und danach mit Cresylviolett angefärbt. Hierbei wurde ein Nissl-Färbungs-Standardprotokoll verwendet (Paxinos & Watson, 1998). Der Farbstoff Cresylviolett weist eine hohe Affinität für RNA-reiche neuronale Strukturen im Zellkörper auf, er dringt in alle Zellen des Schnittes ein und bindet sich an Strukturen im Zellkörper. So kann man intaktes Gewebe von zerstörtem unterscheiden. Das Ausmaß und die Lokation der Läsionen wurde unter einem Olympus CK40 Mikroskop untersucht.

## **2.7. Experimentelle Designs**

### **Experiment 1: Effekte von Läsionen des Inselkortex auf die klassisch konditionierte Immunsuppression**

Das in Tab. 2 dargestellte Gruppendesign umfasst sieben Gruppen und hat die Auswirkungen der Inselkortexläsionen auf die Konditionierung von Immunfunktionen untersucht. Die Gruppengröße betrug acht Tiere pro Gruppe. Insgesamt wurden also

**Tabelle 2: Gruppendesign des Experimentes 1a: Effekte von Läsionen des Inselkortex**

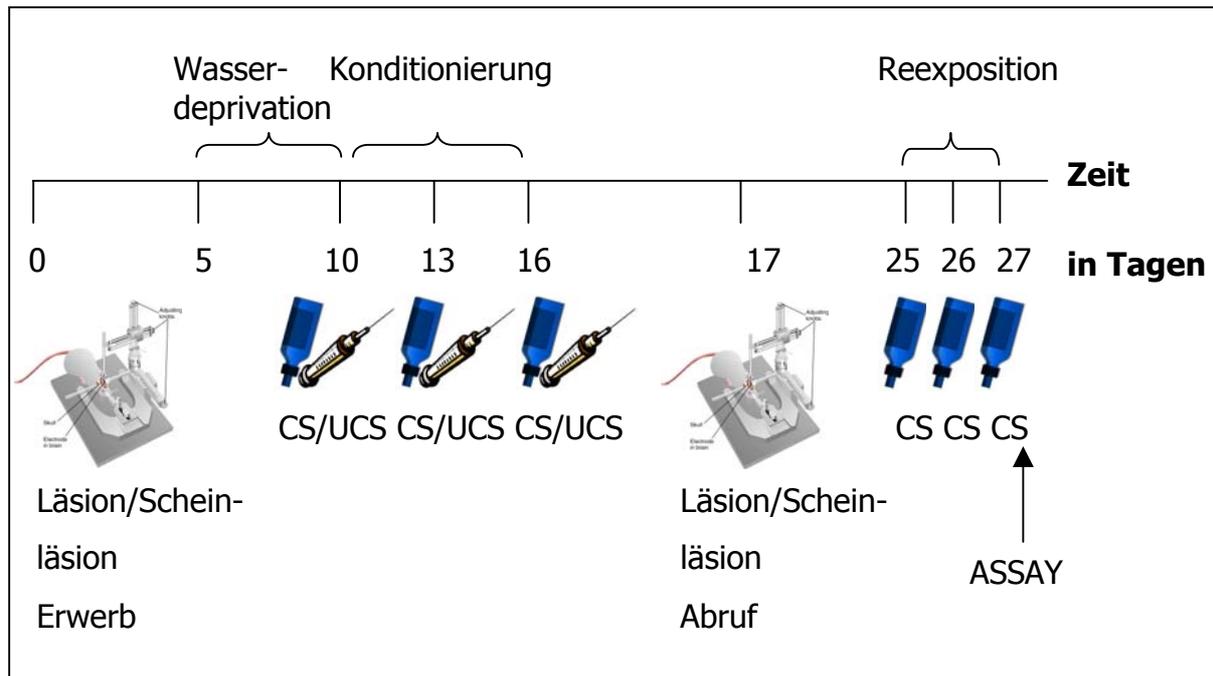
Gruppe	CS/UCS		CS	
	Konditionierungsphase		Reexposition	
	morgens	nachmittags	morgens	Nachmittags
(1)Kond. Läsion Erwerb	Sac/CsA	Wasser/PBS	Sac	Wasser
(2)Kond. Schein Erwerb	Sac/CsA	Wasser/PBS	Sac	Wasser
(3)Kond. Läsion Abruf	Sac/CsA	Wasser/PBS	Sac	Wasser
(4)Kond. Schein Abruf	Sac/CsA	Wasser/PBS	Sac	Wasser
(5)Schein-konditioniert	Wasser/CsA	Sac/PBS	Wasser	Sac
(6)CsA-behandelt	Wasser/CsA	Sac/PBS	Wasser/CsA	Sac
(7)Unbehandelt	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser

56 Tiere eingesetzt. Das in Tabelle 1 (siehe Kap. 2.3) dargestellte Konditionierungsdesign ist folgendermaßen modifiziert. Es gab hier statt einer vier Konditionierungsgruppen. Zwei davon erhielten Läsionen des Inselkortex vor der Konditionierungsphase (Erwerb), eine Gruppe erhielt eine Läsion (1), die andere korrespondierende Gruppe eine Scheinläsion (2), um den Effekt des operativen Eingriffs zu kontrollieren. Die anderen beiden konditionierten Gruppen erhielten eine Läsion (3) bzw. Scheinläsion (4) zwischen Konditionierungs- und Reexpositionsphase, um die Beteiligung des Inselkortex an dem Abruf der Assoziation zu überprüfen. Die Gruppen fünf bis sieben werden beibehalten, es handelt sich hier um die üblichen Kontrollgruppen nicht kontingent konditioniert (5), CsA-behandelt (6) und unbehandelt (7), alle ohne chirurgischen Eingriff.

### Konditionierungsprotokoll

Die Durchführung der Konditionierung erfolgte identisch mit dem Basis-Konditionierungsexperiment (siehe Kap. 2.4). Verändert hatte sich die Dauer des Experimentes, da nach den chirurgischen Eingriffen eine Woche lang gewartet wurde, bevor das Konditionierungsprotokoll fortgesetzt wurde, damit die Tiere sich von dem Eingriff erholen können und die immunologischen Parameter unbeeinflusst blieben. Abbildung 8 zeigt das Konditionierungsprotokoll dieses Experimentes.

Die Gruppen 1 und 2 erhielten eine Läsion bzw. Scheinläsion zu Beginn des Experimentes am Tag 0. Am 5. Tag wurden alle Tiere auf Wasserdeprivation gesetzt. Am zehnten Tag erhielten alle Tiere die erste CS/UCS-Paarung, gefolgt von der



**Abbildung 8: Konditionierungsprotokoll**  
**Darstellung des Inselkortex-Konditionierungsprotokolls im zeitlichen Verlauf mit dem Start der Wasserdeprivation, den CS/UCS-Paarungen, der CS-Reexposition und den chirurgischen Eingriffen.**

zweiten und dritten Paarung jeweils im Abstand von zwei Tagen, also Tag 13 und 16. Nach der Konditionierungsphase am Tag 17 erhielten die zwei anderen Konditionierungsgruppen eine Läsion bzw. Scheinläsion des Inselkortex. Weitere neun Tage später begann die Reexposition an den CS an drei aufeinanderfolgenden Tagen, Tag 25, 26 und 27. Am 27. Tag wurde eine Stunde nach dem Konditionierungsprozedere die Organentnahme vorgenommen und das Assay durchgeführt. Die drei Kontrollgruppen ohne chirurgischen Eingriff erhielten parallel dazu an denselben Tagen ihre entsprechende CS/UCS oder CS Behandlung.

### **Experiment 2: Effekte von Läsionen des Inselkortex auf basale Immunfunktionen bei unkonditionierten Tieren**

Um zu testen, ob die Läsionen allein, ohne die Konditionierung, einen Effekt auf die immunologischen Parameter haben, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Es gab insgesamt 4 Gruppen mit jeweils 4 oder 5 Tieren.

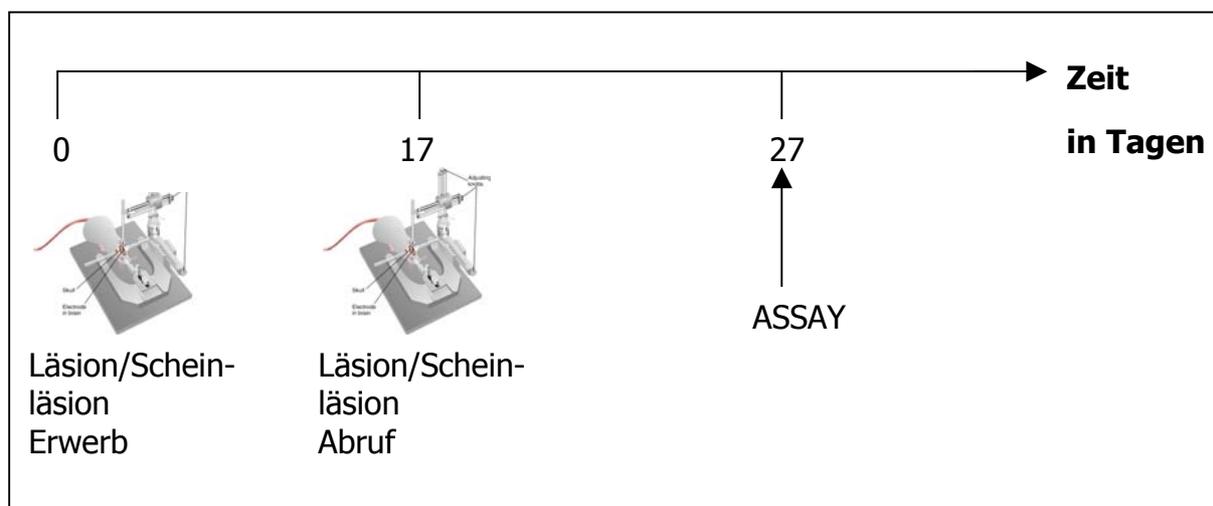
**Tabelle 3: Gruppendesign des Experimentes 2: Effekte von Läsionen des Inselkortex ohne Konditionierung**

Gruppe	
(1) Läsion Erwerb	n=5
(2) Schein Erwerb	n=4
(3) Läsion Abruf	n=5
(4) Schein Abruf	n=4

Darunter waren wieder 2 Läsionsgruppen (1 und 3), die korrespondierend zu den Zeitpunkten des Erwerbs und des Abrufs innerhalb der Konditionierung operiert wurden, und die entsprechenden Scheinläsionsgruppen (2 und 4) (siehe Tab.3).

Abbildung 9 zeigt den zeitlichen Ablauf dieses Experimentes.

Am Tag 1 erhielten die Gruppen 1 und 2 den chirurgischen Eingriff, am Tag 17 erhielten die Gruppen 3 und 4 den chirurgischen Eingriff. Am Tag 27 wurden die Organe entnommen, um die immunologischen Funktionen zu messen. Somit wurden die zeitlichen Abstände eingehalten zwischen Operation und Organentnahme, die bei dem Konditionierungsexperiment entstanden sind.



**Abbildung 9: zeitlicher Ablauf des Experimentes zur Kontrolle der Läsionen**

### **Experiment 3: Effekte von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus auf die klassisch konditionierte Immunsuppression**

Analog zu dem Inselkortexläsions-Experiment mit Konditionierung (Experiment 1) wurde ein zweites Experiment durchgeführt mit gleichem Design und gleichem Protokoll, bei diesem Experiment wurde der VMH lädiert.

### **Experiment 4: Effekte von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus auf basale Immunfunktionen bei unconditionierten Tieren**

Ebenfalls analog wurde ein Kontrollexperiment der Läsionen des VMH durchgeführt ohne Konditionierung, um den Effekt der Läsion auf die normalen Immunfunktionen zu testen. Das Design und Protokoll ist ebenfalls identisch mit dem Kontrollexperiment der Inselkortexläsionen (Experiment 2).

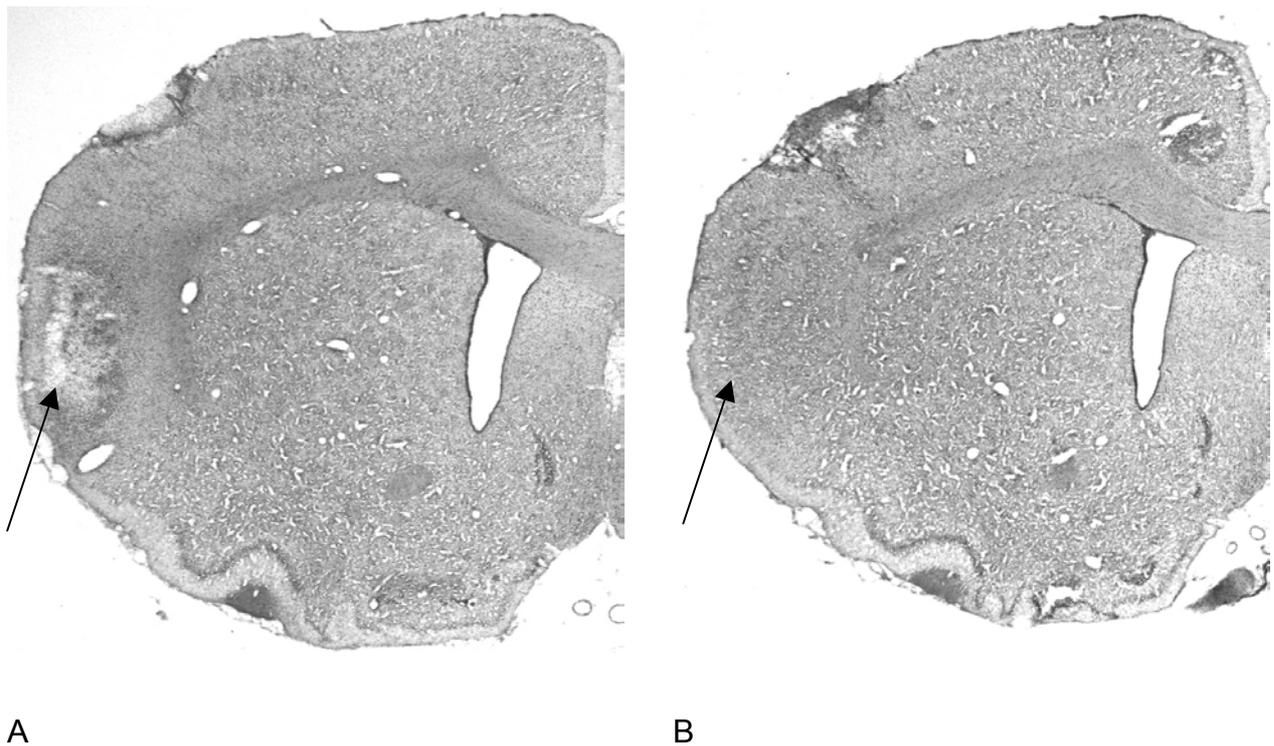
## **2.8. Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Version 11.0). Es wurden einfaktorielle Varianzanalysen (Faktor Gruppe) gerechnet. Die Voraussetzungen der Varianzanalyse wurden mit den nonparametrischen Verfahren Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Falls notwendig wurden bei nichtparametrischer Testung der Mann Whitney-U Test verwendet. Einzelne Mittelwertsunterschiede wurden zusätzlich mittels Tukey-Post-hoc-Test auf Signifikanz überprüft. Bei allen Berechnungen wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  festgesetzt.

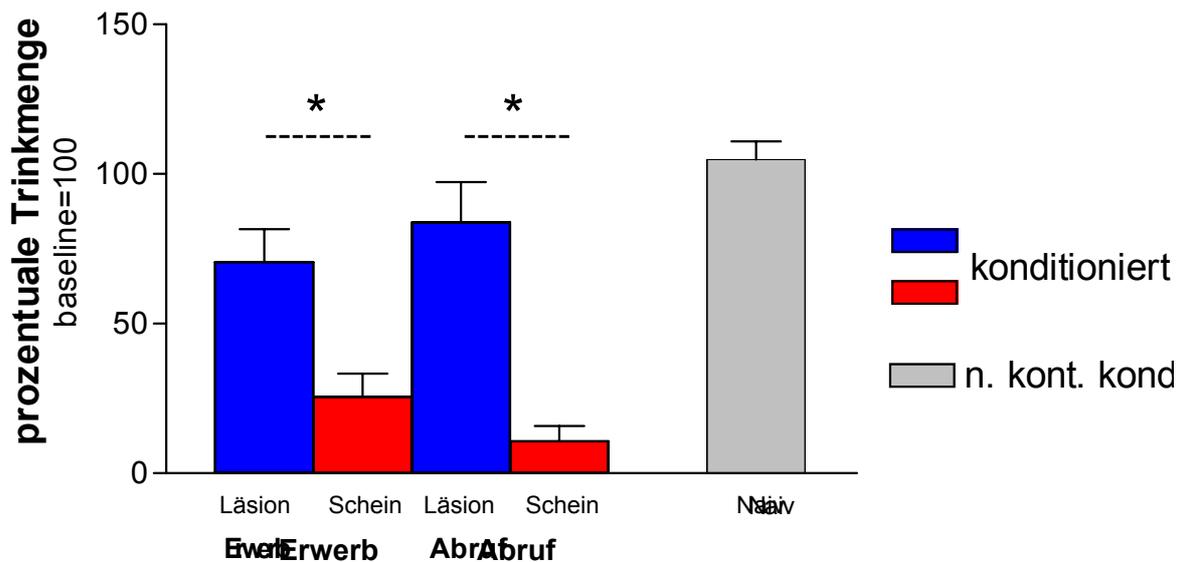
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Effekte von Läsionen des Inselkortex auf die Klassisch konditionierte Immunsuppression (Experiment 1)

Von den 56 eingesetzten Tieren in diesem Experiment gingen 52 in die Analysen ein. Alle Tiere haben bis zur Organentnahme überlebt. Die histologische Analyse ergab, dass pro Gruppe, also Läsion und Scheinläsion Erwerb und Läsion und Scheinläsion Abruf, ein Tier keine erfolgreiche Läsion bzw. Scheinläsion erhalten hat. Diese 4 Tiere wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Abbildung 10 zeigt ein Photo eines Querschnittes (dorsal-ventral) zweier Hirnhälften, von einer erfolgreichen Inselkortextläsion (A) und von einer Scheinläsion mit intaktem Gewebe (B). Der Pfeil markiert die Lokation des Inselkortex.



**Abb. 10** (A) Läsion, (B) Scheinläsion



**Abb.11 Konditionierte Geschmacksaversion (Inselkortex, Konditionierung)**  
Trinkmengen (in % von der Baseline) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Vergleich Läsion mit Scheinläsion).

### 3.1.1. Konditionierte Geschmacksaversion

Es wurde untersucht, ob sich unter den Gruppen Unterschiede in der durchschnittlichen Trinkmenge der Sac-Lösung zeigen. Dazu wurde für jede Gruppe die Wasserkonsum-Baseline ermittelt, die anfängliche durchschnittliche Trinkmenge zwischen Tag 5 und 9. Diese Baseline wurde als Referenz verwendet und als 100% Flüssigkeitskonsum definiert. Dann wurde der Sac-Konsum in der Reexposition gemittelt und prozentual in Relation zur Baseline gesetzt, dargestellt in Abb. 11.

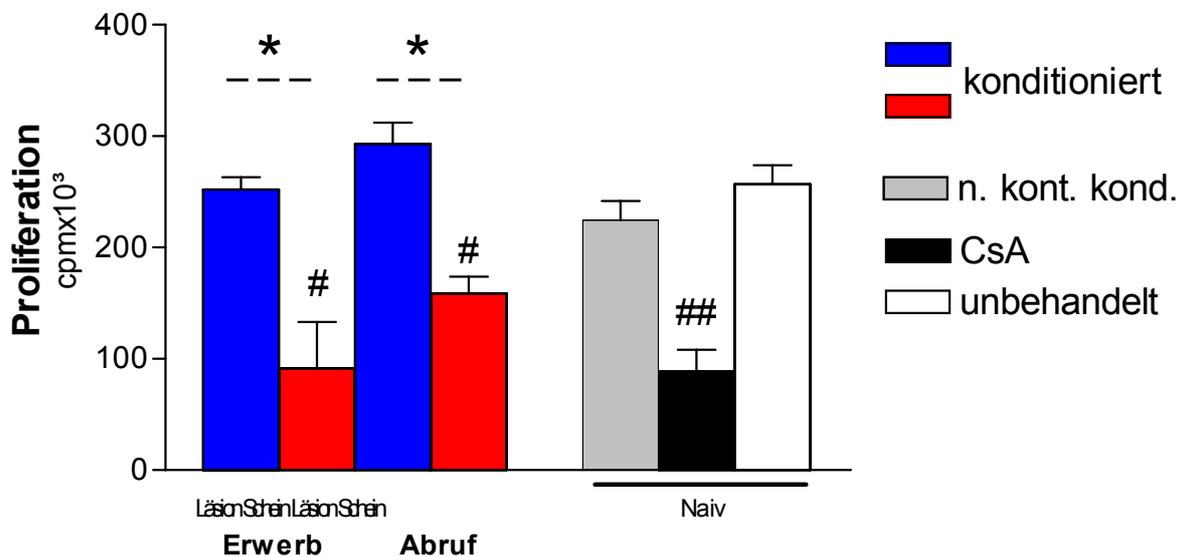
Zu sehen sind die prozentualen Trinkmengen der unbehandelten Tiere und der lädierten und scheinlädierten zu beiden Operationszeitpunkten. Ein guter Aversionsindex ist gewöhnlich unter 50% der Baseline angesiedelt. Angesichts dessen zeigten die scheinlädierten Tiere zu beiden Konditionierungsphasen eine reliable CTA. Der Konsum sank bei scheinlädierten Tieren auf 25,5% (Erwerb) bzw. 10,7% (Abruf). Die Tiere entwickelten folglich trotz der Scheinläsion eine ausgesprochen starke CR. Im Gegensatz dazu scheint dieser Konditionierungseffekt bei den Tieren mit Läsion blockiert zu sein. Tiere mit Läsion zeigten einen Sac-Konsum von 70,6% (Erwerb) und von 83,8% (Abruf), was sich nicht wesentlich von den unbehandelten Tieren unterschied (ca. 90% Flüssigkeitskonsum).

### 3.1.2. Immunologische Parameter

#### Lymphozytenproliferation

Mit einem *in vitro*-Proliferationsassay wurde der Einfluss der Läsionen auf die konditionierte Immunsuppression gemessen. Mit den Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Faktor Gruppe gerechnet.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse. Zu sehen ist, dass das applizierte CsA in der pharmakologischen Kontrollgruppe ‚CsA-behandelt‘ die Proliferationsrate signifikant reduziert im Vergleich zu unbehandelten Tieren ( $p < 0,001$ ). Die nicht kontingent konditionierten Tiere weisen eine ähnliche Proliferationsrate auf wie die unbehandelten Tiere. Die konditionierten Tiere mit Scheinläsion (Erwerb) weisen eine signifikant reduzierte Proliferationskapazität auf verglichen mit den lädierten Tieren, bei denen die CR durch den zerstörten Inselkortex aufgehoben scheint ( $p < 0,001$ ). Das gleiche Muster zeigt sich bei den scheinlädierten Tieren (Abruf) gegenüber lädierten Tieren ( $p < 0,001$ ).



**Abb.12**

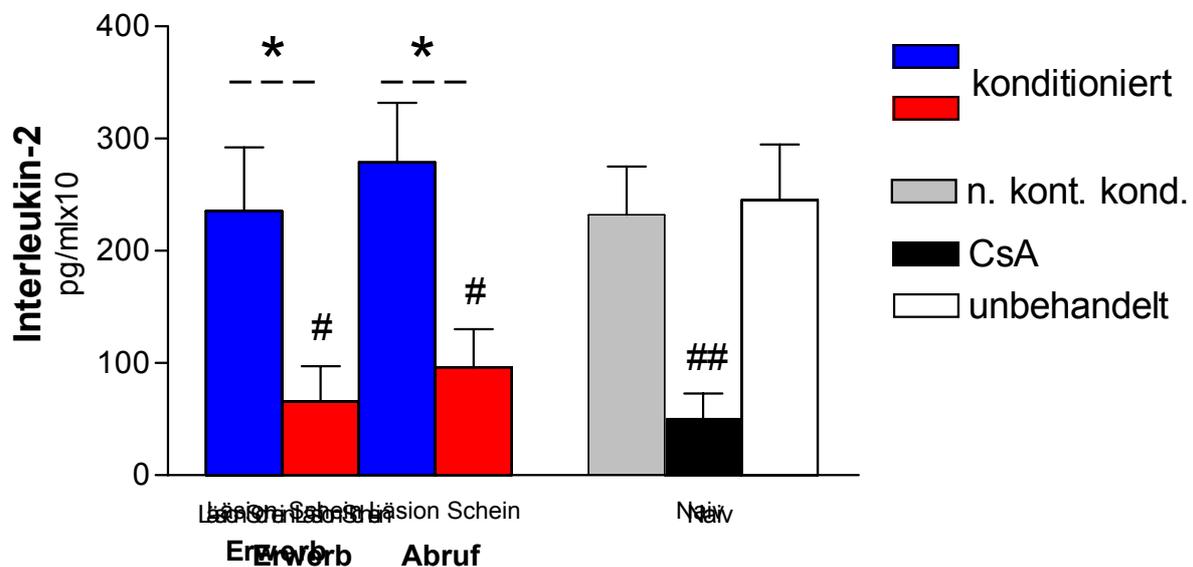
#### **Proliferation der Milzlymphozyten (Inselkortex, Konditionierung)**

Milzlymphozyten-Proliferation (cpm) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Läsion mit Scheinläsion verglichen, # für Scheinläsion mit nicht kontingent konditioniert verglichen, ## für CsA behandelt mit unbehandelt verglichen).

### Zytokinproduktion im Überstand

Neben der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde die Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  nach *in vitro*-Stimulation mit ConA im Zellüberstand gemessen.

Die Ergebnisse der IL-2-Produktion sind in Abb. 13 dargestellt. Es zeigte sich das gleiche Muster wie bei der Proliferationsrate der Lymphozyten. Zu sehen ist ein klarer CsA-Effekt in der pharmakologischen Kontrollgruppe ‚CsA-behandelt‘ im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ( $p \leq 0,001$ ), der sich in einer verminderten Produktion von IL-2 niederschlägt. Die nicht kontingent konditionierten Tiere zeigten keinen Unterschied zu den unbehandelten ( $p = 0,8282$ ). Bei den konditionierten Tieren zeigte sich eine konditionierte Immunsuppression bei den scheinläderten Tieren, sowohl bei Erwerb als auch bei Abruf operiert. Diese Tiere zeigten die typisch verminderte IL-2 Produktion im Vergleich zu den läderten Tieren, hier war der konditionierte Effekt durch die Läsion blockiert, sowohl bei Erwerb als auch bei Abruf ( $p \leq 0,01$  für beide Zeitpunkte Läsion mit Scheinläsion verglichen).



**Abb.13**

#### **Interleukin-2 Produktion (Inselkortex, Konditionierung)**

IL-2 Messung im Zellüberstand (pg/ml) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Läsion mit Scheinläsion verglichen, # für Scheinläsion mit nicht kontingent konditioniert verglichen, ## für CsA behandelt mit unbehandelt verglichen).

Die Ergebnisse der IFN- $\gamma$ -Produktion sind in Abbildung 14 dargestellt. Der CsA-Effekt zeigte sich wie bei den zuvor dargestellten IL-2-Konzentrationen in einer höchst signifikant verminderten IFN- $\gamma$ -Produktion im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ( $p \leq 0,001$ ). Die nicht kontingent konditionierten Tiere unterscheiden sich nicht von den unbehandelten ( $p = 0,7614$ ). Bei den konditionierten Tieren zeigte sich wie schon bei der Proliferation und IL-2 Produktion wieder das gleiche Muster. Die scheinläderten Tiere zeigten die konditionierte Reaktion, ausgedrückt in einer signifikant verminderten IFN- $\gamma$ -Produktion im Vergleich zu den lädierten Tieren, bei denen die Zerstörung des Inselkortex den konditionierten Effekt blockiert hat ( $p \leq 0,001$ ). Dies gilt sowohl für den Erwerb als auch für den Abruf bei der Konditionierung. Die scheinläderten Tiere zeigen auch eine signifikant reduzierte IFN- $\gamma$ -Produktion verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren sowohl bei Erwerb ( $p < 0,001$ ) als auch bei Abruf ( $p < 0,001$ ) operiert.

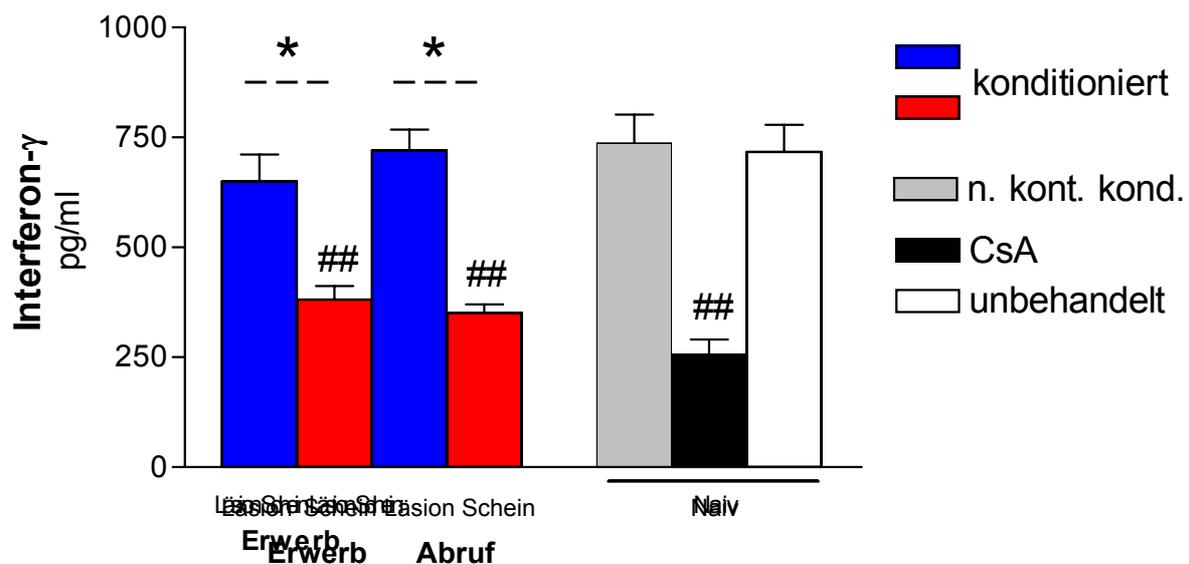


Abb.14

#### Interferon- $\gamma$ Produktion (Inselkortex, Konditionierung)

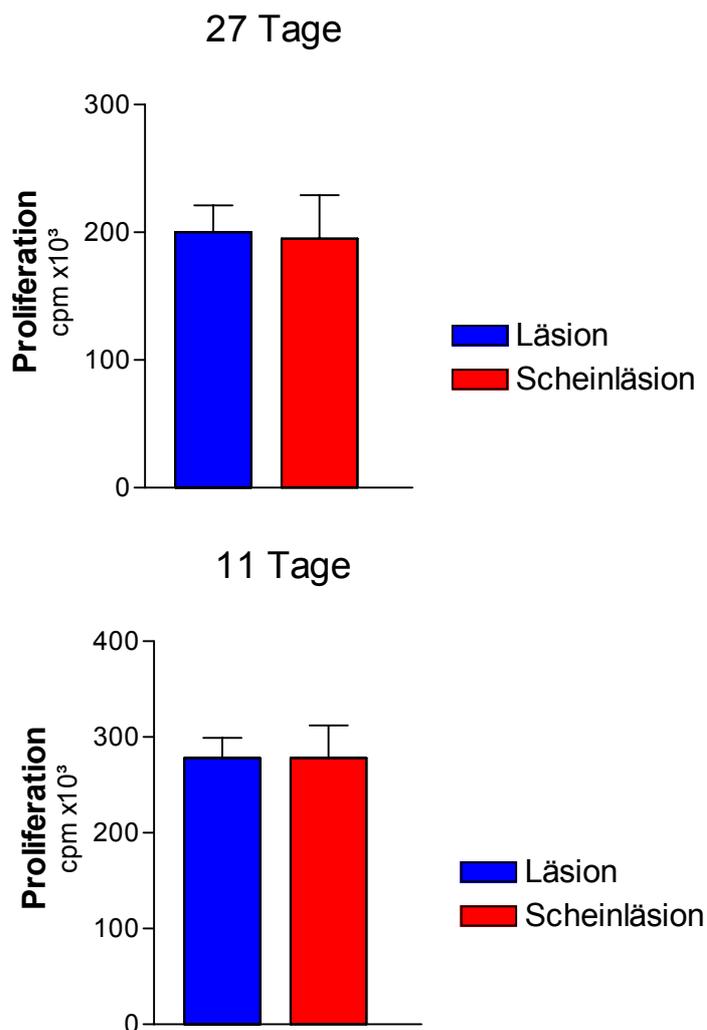
Interferon- $\gamma$  Messung im Zellüberstand (pg/ml) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\*\* für Läsion mit Scheinläsion verglichen, ## mit nicht kontingent konditioniert verglichen).

### 3.2. Effekte von Läsionen des Inselkortex auf basale Immunfunktionen (Experiment 2)

Bei diesem Läsionskontrollexperiment wurden insgesamt 18 Tiere eingesetzt, jeweils 5 Tiere in den beiden Läsionsgruppen und jeweils 4 Tiere in den beiden Scheinläsionsgruppen. Die histologische Analyse ergab korrekte Läsionen für alle operierten Tiere.

#### Lymphozytenproliferation

Es wurde die *in vitro*-Proliferationskapazität der Lymphozyten als Parameter gewählt, um die ‚normalen‘ immunologischen Funktionen zu testen. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der Proliferationskapazität nach Läsion und Scheinläsion des Inselkortex nach 27 ( $p=.9044$ ) und nach 11 Tagen ( $p=.9994$ ). Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Läsion und Scheinläsion in der normalen Immunantwort.

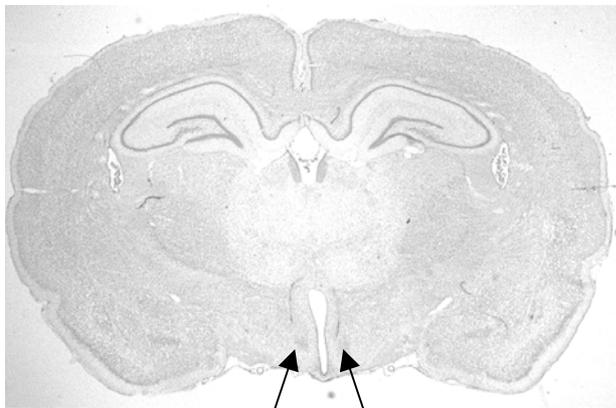


**Abb. 15** Proliferation der Milzlymphozyten (Inselkortex, Läsionskontrolle)

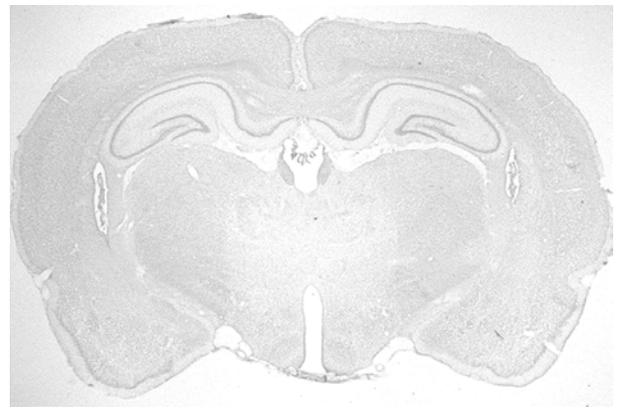
Milzlymphozyten-Proliferation (cpm) nach ConA-Stimulation (1,25 µg/ml) in Abhängigkeit der Läsionsbedingung und des Zeitpunktes. Gezeigt werden die Mittelwerte ±SE.

### 3.3. Effekte von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus auf die Klassisch konditionierte Immunsuppression (Experiment 3)

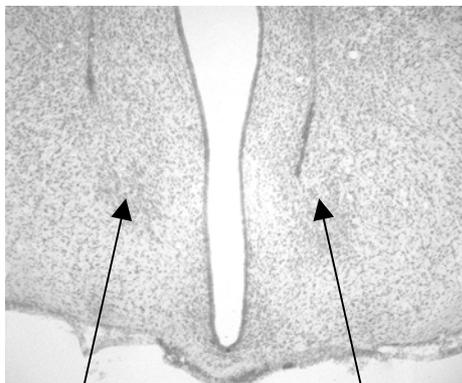
Von den 56 eingesetzten Tieren in diesem Experiment gingen 43 in die Analysen ein. 48 Tiere haben bis zur Organentnahme überlebt, 8 Tiere sind im Laufe der chirurgischen Eingriffe oder kurz darauf verstorben. Die histologische Analyse ergab, dass pro Erwerbsgruppe, also Läsion und Scheinläsion Erwerb, zwei Tiere keine erfolgreiche Läsion bzw. Scheinläsion erhalten haben. Bei der Scheinläsionsgruppe zum Zeitpunkt Abruf hat ein Tier keine zufrieden stellende Scheinläsion erhalten, das Gewebe war beschädigt. Diese 5 Tiere wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Abb. 16 zeigt ein Beispiel einer erfolgreichen Läsion und einer Scheinläsion mit intaktem Gewebe des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH). Zu erkennen sind die Nadeleinstiche und das zerstörte Gewebe (siehe schwarze Pfeile) im Bereich des VMH (vergleiche auch schematischer Hirnschnitt Abb. 7b, S. 33) auf den Photos A und B im Gegensatz zu der Scheinläsion (C und D).



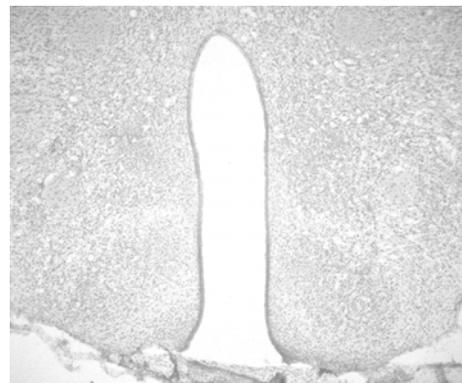
A



C



B



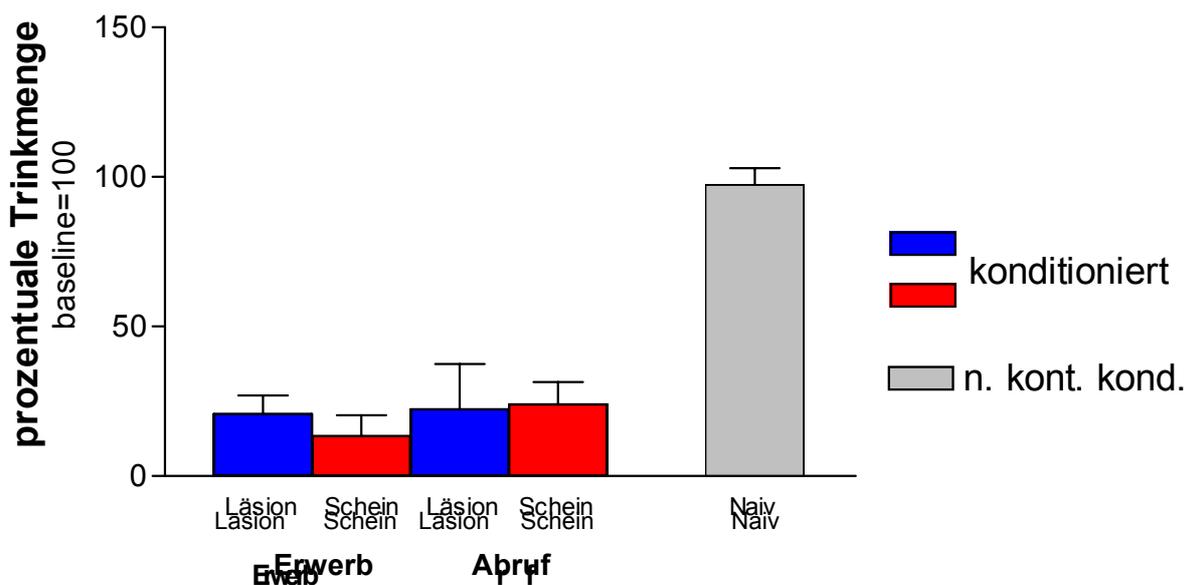
D

**Abb. 16 (A) Läsion, (B) Nahaufnahme Läsion, (C) Scheinläsion, (D) Nahaufnahme Scheinläsion, VMH**

### 3.3.1. Konditionierte Geschmacksaversion

Analog zum Inselkortex-Experiment wurde zunächst untersucht, ob sich unter den Gruppen Unterschiede in der durchschnittlichen Trinkmenge der Sac-Lösung zeigen. Dazu wurde für jede Gruppe wieder die Wasserkonsum-Baseline ermittelt, die durchschnittliche Trinkmenge zwischen Tag 5 und 9, also die anfängliche Trinkmenge. Diese Baseline wurde als Referenz verwendet und als 100% Flüssigkeitskonsum definiert. Dann wurde der Sac-Konsum an den Tagen der Reexposition gemittelt und prozentual in Relation zur Baseline gesetzt, was in Abbildung 17 dargestellt ist.

Zu sehen sind die prozentualen Trinkmengen der unbehandelten Tiere (rechter Balken) und der lädierten und scheinlädierten zu beiden Operationszeitpunkten. Ein guter Aversionsindex ist gewöhnlich unter 50% der Baseline angesiedelt. Angesichts dessen zeigen die scheinlädierten Tiere, also mit intaktem VMH, zu beiden Konditionierungsphasen eine reliable konditionierte Geschmacksaversion. Der Konsum sinkt bei Erwerb scheinlädierten Tieren auf 13,2% ab, bei Abruf scheinlädierten Tieren auf 23,9%.



**Abb.17 Konditionierte Geschmacksaversion (VMH, Konditionierung)**

Trinkmengen (in % von der Baseline) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Vergleich Läsion mit Scheinläsion).

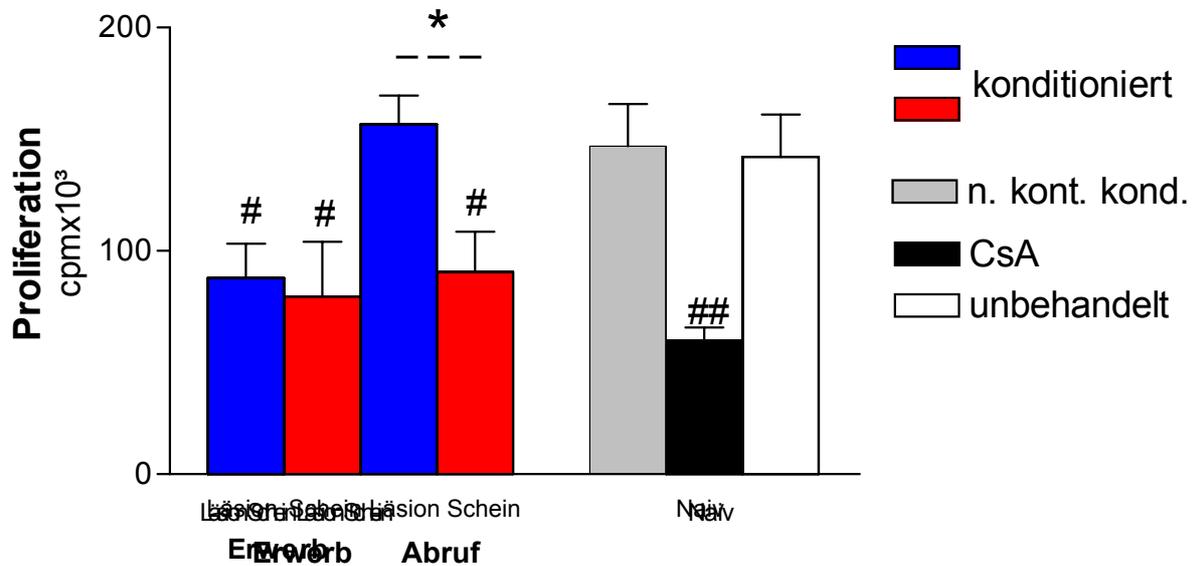
Die Tiere entwickeln folglich trotz der Scheinläsion eine ausgesprochen starke konditionierte Reaktion. Interessanterweise scheint dieser Konditionierungseffekt bei den Tieren mit Läsion nicht blockiert worden zu sein, im Gegensatz zu den Inselkortex-lädierten Tieren aus dem vorherigen Experiment. Tiere mit Läsion zeigen einen Sac-Konsum von 20,7% bei Läsion in der Erwerbsphase und von 22,2% bei Läsion in der Abrufphase, was sich nicht wesentlich unterscheidet von den scheinläderten Tieren. Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen den scheinläderten und lädierten Tieren für beide Operationszeitpunkte, wohl aber zwischen den nicht kontingent konditionierten Tieren ohne Operation, die als Kontrolle dienen, (Sac-Konsum 97,4%), für alle vier Konditionierungsgruppen ergibt sich ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ).

### 3.3.2. Lymphozytenproliferation

Um zu untersuchen, ob die Läsionen einen Einfluß auf die konditionierte Immunsuppression haben, wurde ein *in vitro*-Proliferationsassay durchgeführt, um das Wachstum der Milzzellen zu messen. Mit den Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Faktor Gruppe gerechnet.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse des Proliferationsassays. Zu sehen ist, dass das applizierte CsA in der pharmakologischen Kontrollgruppe ‚CsA-behandelt‘ die Proliferationsrate signifikant reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ( $p < 0,001$ ). Die nicht kontingent konditionierten Tiere weisen eine ähnliche Proliferationsrate auf wie die unbehandelten Tiere ( $p = 0,8375$ ). Die konditionierten Tiere mit Scheinläsion bei Erwerb erhalten weisen eine signifikant reduzierte Proliferationskapazität auf verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren ( $p < 0,01$ ), sie unterscheiden sich nicht von den lädierten Tieren bei Erwerb ( $p = 0,7398$ ), die Konditionierung funktioniert trotz lädierten ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH). Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse bei Abruf der gelernten Assoziation signifikante Unterschiede zwischen scheinläderten und lädierten Tieren, mit Scheinläsion ist die Proliferation supprimiert, mit Läsion ist dieser Effekt aufgehoben ( $p = 0,0109$ ). Die scheinläderten Tiere zeigen auch bei

Abruf operiert eine signifikant reduzierte Proliferationsrate verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren ( $p=0,0325$ ).



**Abb.18**

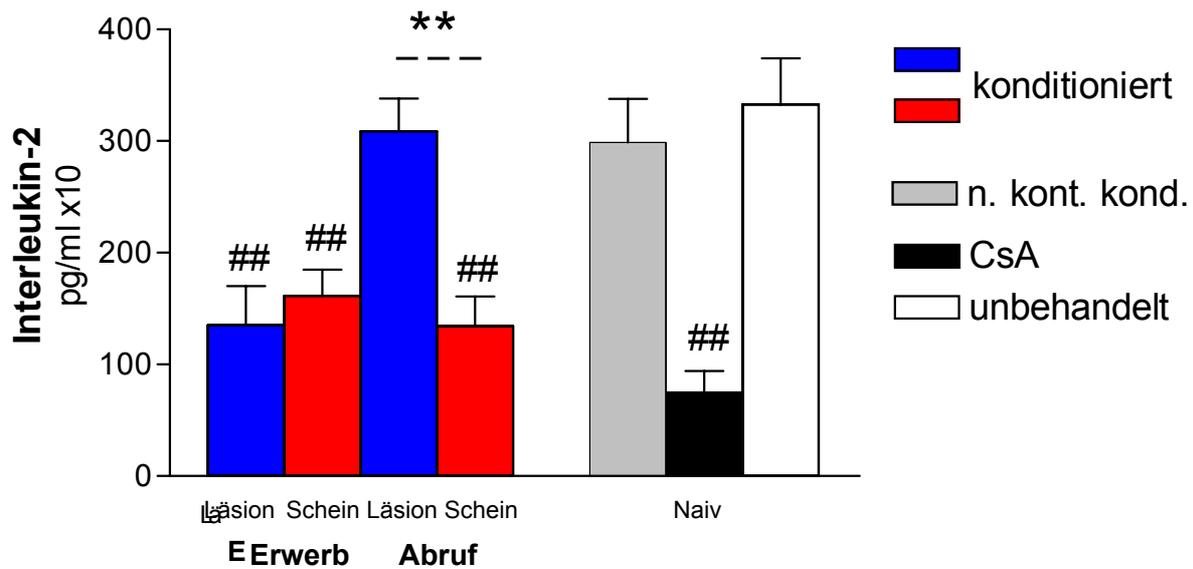
**Proliferation der Milzlymphozyten (VMH, Konditionierung)**

Milzlymphozyten-Proliferation (cpm) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Läsion mit Scheinläsion verglichen, # für Scheinläsion mit nicht kontingent konditioniert verglichen, ## für CsA behandelt mit unbehandelt verglichen).

**Zytokinproduktion im Überstand**

Neben der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde die Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  nach *in vitro*-Stimulation mit ConA im Zellüberstand gemessen.

Die Ergebnisse der IL-2-Produktion sind in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigte sich das gleiche Muster wie bei der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten. Zu sehen ist, dass das applizierte CsA in der pharmakologischen Kontrollgruppe ‚CsA-behandelt‘ die IL-2-Produktion signifikant reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ( $p<0,001$ ). Die nicht kontingent konditionierten Tiere weisen eine ähnliche Produktion auf wie die unbehandelten Tiere ( $p=0,4575$ ). Die konditionierten Tiere mit Scheinläsion (Erwerb) weisen eine signifikant reduzierte Produktion auf verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren ( $p=0,0041$ ), sie unterscheiden sich dagegen nicht von lädierten Tieren (Erwerb) ( $p=0,5467$ ), die Konditionierung funktioniert trotz lädiertem ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH).

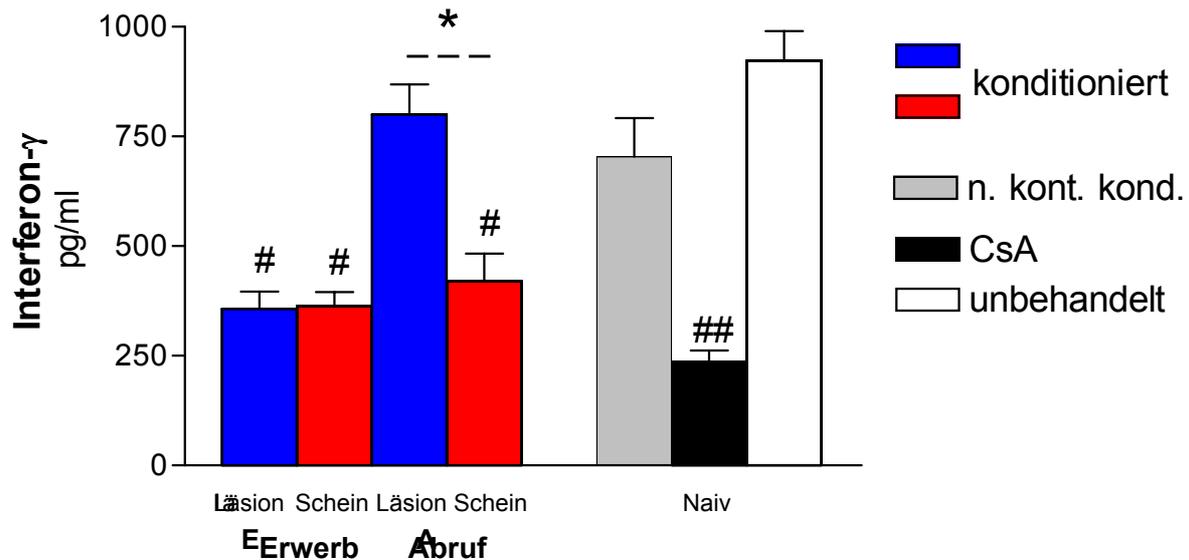


**Abb.19 Interleukin-2 Produktion (VMH, Konditionierung)**

Interleukin-2 Messung im Zellüberstand (pg/ml) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Läsion mit Scheinläsion verglichen, # für Scheinläsion mit nicht kontingent konditioniert verglichen, ## für CsA behandelt mit unbehandelt verglichen).

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse bei Abruf der gelernten Assoziation signifikante Unterschiede zwischen scheinläderten und läderten Tieren, mit Scheinläsion ist die IL-2 Produktion supprimiert, mit Läsion ist dieser Effekt aufgehoben ( $p=0,0007$ ). Die scheinläderten Tiere zeigen auch bei Abruf operiert eine signifikant reduzierte IL-2 Produktion verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren ( $p=0,0007$ ).

Die Ergebnisse der IFN- $\gamma$ -Produktion sind in Abbildung 20 dargestellt. Zu sehen ist, dass das applizierte CsA in der pharmakologischen Kontrollgruppe ‚CsA-behandelt‘ die IFN- $\gamma$ -Produktion signifikant reduziert verglichen mit unbehandelten Tieren ( $p<0,0001$ ). Die nicht kontingent konditionierten Tiere weichen ebenfalls signifikant ab von den unbehandelten Tieren (mean= 923pg/ml) ( $p=0,0103$ ). Die konditionierten Tiere mit Scheinläsion (Erwerb) weisen eine signifikant reduzierte Proliferationskapazität auf verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren ( $p=0,0001$ ), sie unterscheiden sich dagegen nicht von den läderten Tieren bei Erwerb ( $p=0,9262$ ), die Konditionierung funktioniert trotz lädertem VMH. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse bei Abruf der gelernten Assoziation signifikante Unterschiede zwischen scheinläderten und läderten Tieren.



**Abb.20 Interferon- $\gamma$  Produktion (VMH, Konditionierung)**  
 Interferon- $\gamma$  Messung im Zellüberstand (pg/ml) in Abhängigkeit der Konditionierungs- und Läsionsbedingung. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$ SE. Die mittels Tukey-HSD-Post-Hoc-Test ermittelten signifikanten Mittelwertsunterschiede sind gesondert gekennzeichnet (\* für Läsion mit Scheinläsion verglichen, # für Scheinläsion mit nicht kontingent konditioniert verglichen, ## für CsA behandelt mit unbehandelt verglichen).

Mit Scheinläsion ist die IFN- $\gamma$ -Produktion supprimiert, mit Läsion ist dieser Effekt aufgehoben ( $p < 0,0001$ ). Die scheinläderten Tiere zeigen auch bei Abruf operiert eine signifikant reduzierte IFN- $\gamma$ -Produktion verglichen mit den nicht kontingent konditionierten Tieren ( $p = 0,0011$ ).

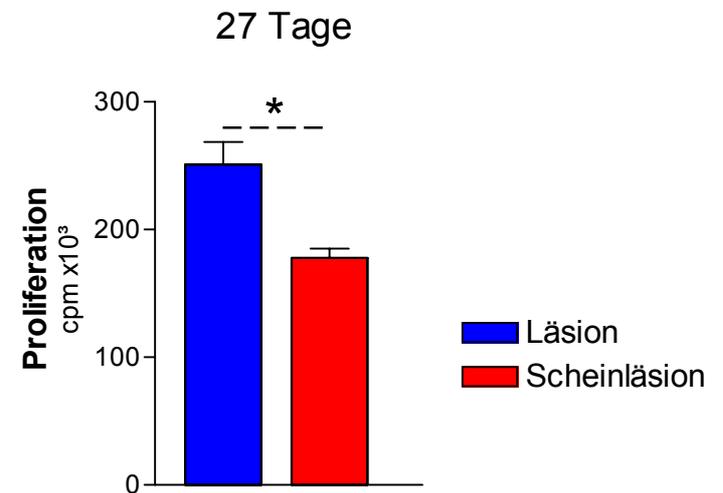
### 3.4. Effekte von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus auf basale Immunfunktionen (Experiment 4)

Bei diesem Läsionskontrollexperiment wurden 18 Tiere insgesamt eingesetzt, jeweils 5 Tiere in den beiden Läsionsgruppen und jeweils 4 Tiere in den beiden Scheinläsionsgruppen. Nach der histologischen Analyse wurde ein Tier wegen unkorrekter Läsion aus der Läsionsgruppe bei Abruf, also mit der Organentnahme 11 Tage nach Operation, aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

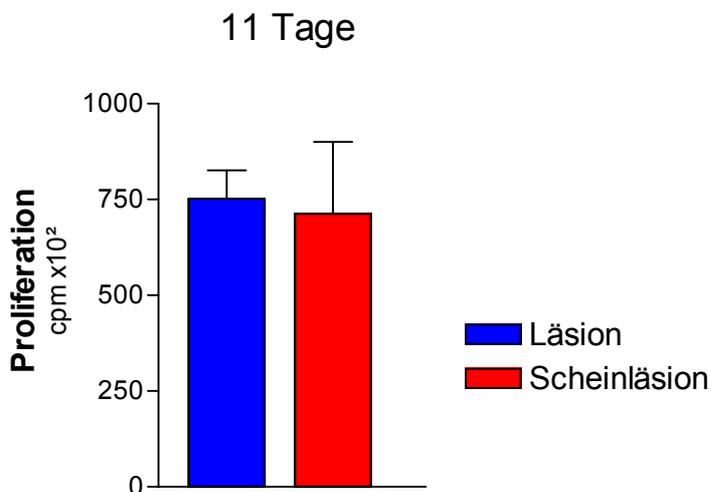
#### Lymphozytenproliferation

Zur Messung der normalen immunologischen Funktion wurde die Proliferationsrate der Lymphozyten als Parameter gewählt. Abb. 21 vergleicht die Ergebnisse der Proliferationsrate nach Läsion und Scheinläsion des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) nach 27 bzw. 11 Tagen.

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Läsion und Scheinläsion in der normalen Immunantwort nach 11 Tagen ( $p=0,8552$ ). Nach 27 Tagen proliferieren die Zellen der lädierten Tiere signifikant stärker als die der scheinläderten ( $p=0,0087$ ).



A



B

**Abb.21****Proliferation der Milzlymphozyten (VMH, Läsionskontrolle)**

Milzlymphozyten-Proliferation (cpm) nach ConA-Stimulation (1,25 µg/ml) in Abhängigkeit der Läsionsbedingung und des Zeitpunktes. Gezeigt werden die Mittelwerte ±SE.

A 27 Tage, B 11 Tage nach Läsion

## 4. Diskussion

Der wohl eindrucksvollste Beleg für die bidirektionale Kommunikation des Nervensystems und des Immunsystems ist die Klassische Konditionierung von Immunfunktionen. Seit den initialen Arbeiten von Ader und Cohen (1975) konnten eine Vielzahl von Tierstudien die Resultate replizieren und erweitern. Heute ist gut dokumentiert, dass sich die Immunantwort durch Klassische Konditionierung sowohl erhöhen als auch erniedrigen lässt. Darüber hinaus ist die Beeinflussung der Immunantwort mittels unterschiedlichster UCS und CS möglich (Exton et al. 2001). Zwar fallen die Klassisch konditionierten Veränderungen im Immunsystem meist moderater aus als die unkonditionierten, doch sie können deutliche Veränderungen im Immunsystem bewirken. Die Effekte äußern sich derart, dass sich in Tiermodellen von Immunerkrankungen (rheumatoide Arthritis, Lupus erythematodes) oder in Transplantationsexperimenten die Überlebensrate der Tiere bzw. der Transplantate signifikant verlängert (Exton et al. 2000a). Es gibt auch erste Hinweise aus humanexperimentellen Studien, die belegen, dass sich der Mensch ebenfalls Klassisch konditionieren lässt (Kirschbaum et al. 1992; Goebel et al. 2002).

Ziel der psychoneuroimmunologischen Forschung ist neben der Prüfung solcher klinischer Anwendungsmöglichkeiten auch die Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen dieser Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem. Diese Kenntnisse könnten zum Transfer der Klassischen Konditionierung in den klinischen Alltag beitragen. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits wichtige Zusammenhänge in der Peripherie aufzeigen können, indem belegt werden konnte, dass die CR über den Milznerv gesteuert wird (Exton et al. 1998a). Dies geschieht, zumindest partiell, über Noradrenalin durch  $\beta$ -Adrenozeptoren (Exton et al. 2002). Dagegen ist bisher weitgehend ungeklärt, wie diese Konditionierung zentral prozessiert wird. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Hirnareale Inselkortex und ventromedialer Kern des Hypothalamus (VMH) in diese Prozessierung involviert sind.

Dazu wurden männlichen DA Ratten Läsionen entweder in den Inselkortex oder in den VMH gesetzt. Diese Tiere wurden zusätzlich unserem Standard-Konditionierungsprotokoll unterzogen. Hierbei stellen wir üblicherweise durch die Paarung des Immunsuppressivums CsA und einer für die Tiere neuartigen Sac-Lösung eine Assoziation zwischen Medikament und Getränk her. Bei der

Reexposition, wo die Sac-Lösung allein dargeboten wird, erzielen wir eine Immunsuppression ähnlich stark wie die der rein pharmakologisch behandelten Kontrollgruppe. Dies schlägt sich in einer verminderten Proliferationskapazität der Milzlymphozyten und in einer reduzierten Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  nieder. Nach der Reexposition wurde überprüft, ob die konditionierte Immunsuppression trotz lädiertem Inselkortex bzw. VMH stattgefunden hat. Die Läsionen wurden jeweils vor und nach der Konditionierung gesetzt, sodass geklärt werden konnte, ob das jeweilige Areal entweder für den Erwerb der Assoziation zwischen CS und UCS, also der Lernleistung in diesem Paradigma, oder für den Abruf, also der Gedächtnisleistung, der CR notwendig ist. Um den Einfluss der Läsion auf die basalen Immunfunktionen zu messen, wurden zusätzlich Tiere lädiert bzw. scheinlädiert, ohne konditioniert zu werden.

### **Effekte der Läsionen des Inselkortex (Experiment 1 und 2)**

#### **Konditionierte Geschmacksaversion (CTA)**

Inselkortexläsionen blockieren auch in unserem Konditionierungsprotokoll (Sac, CsA) sowohl den Erwerb (um 29,4% reduziert) als auch den Abruf (16,2% reduziert) der CTA (unbehandelte Tiere 10% reduziert). Diese Beobachtungen stimmen mit Befunden aus unterschiedlichen Laboratorien gut überein (Braun et al. 1982, Nachman et al. 1974, Yamamoto et al. 1980, Aggleton et al. 1981, Escobar et al. 1993, Gallo et al. 1992). Lasiter (1982) vermutet, dass Inselkortexläsionen die Gedächtnisrepräsentation des Geschmacks und dessen post-gastrointestinaler Beschwerden blockiert, weil Inselkortexläsionen keine Defizite in der gustatorischen oder gastrointestinalen Sensitivität hervorrufen.

Die verbleibenden Unterschiede zu den unbehandelten Kontrolltieren (bei Erwerb ca. 20% Differenz und bei Abruf ca. 7%) können auch als minimale Geschmacksaversion interpretiert werden, die durch einen kompensatorischen Effekt zu erklären sein könnte. Der Befund, dass kombinierte Läsionen des Inselkortex und der Amygdala die konditionierte Geschmacksaversion (CTA) komplett verhindern, weist darauf hin, dass der Inselkortex nach Amygdalaläsion eine CTA-Bildung unterstützen könnte und umgekehrt die Auswirkungen einer Inselkortexläsion durch die intakte Amygdala teilweise aufgehoben werden könnte (Yamamoto et al. 1995).

In derselben Studie von Yamamoto wurde berichtet, dass Inselkortexläsionen lediglich moderate Effekte auf die Ausbildung einer konditionierten Geschmacksaversion (CTA) hatten. Schafe et al. (1998) liefern eine mögliche Erklärung für diesen widersprüchlichen Befund. Sie fanden Unterschiede in der CTA-Entwicklung bei Amygdalaläsionen abhängig von der Läsionsart und von der CS bzw. UCS Applikationsart. Gleichzeitig gehen sie davon aus, dass diese Unterschiede sich auf andere Hirnareale übertragen lassen. In der Studie von Yamamoto et al. (1995) wurde Sac (CS) mit Lithiumchlorid (UCS) gepaart, die Applikationsart war identisch zu der vorliegenden Studie (Trinkflasche und ip Injektion). Die Läsionen wurden mit dem exzitotoxischen Toxin Ibotensäure erzielt, während in der vorliegenden Studie bei den Inselkortexläsionen NMDA verwendet wurde. Möglicherweise sind diese Unterschiede für die konträren Befunde verantwortlich.

Bei der Konditionierung mit Sac und CsA bei der Ratte ist die CTA dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere weniger Sac-Lösung zu sich nehmen als die Kontrolltiere (Exton et al. 1999). Damit ist die CTA gleichzeitig ein Indikator dafür, ob die Immunkonditionierung erfolgreich war.

### **Immunologische Parameter**

Die immunpharmakologischen Eigenschaften des CsA bewirken eine selektive Inhibition der Zytokinsynthese von IL-2 und IFN- $\gamma$  sowie von weiteren Zytokinen (Burmester & Pezzutto 1998). Bei fehlendem IL-2 wird die Proliferation von antigenaktivierten T-Lymphozyten unterdrückt und die Immunfunktion reversibel gehemmt (Resch & Szamel 1997). Die durch das CsA hervorgerufenen funktionellen Veränderungen im Immunsystem wurden in der vorliegenden Studie durch die Milzlymphozytenproliferation und die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  quantifiziert. Die Messung der immunologischen Parameter sollte prüfen, ob und wie stark die konditionierte Immunsuppression ausgeprägt war bei den lädierten Ratten im Vergleich zu den scheinlädierten.

In allen drei untersuchten Parametern zeigte sich das gleiche Muster. Die Inselkortex-scheinlädierten Tiere bildeten zu beiden Operationszeitpunkten eine starke konditionierte Reaktion, während die CR bei den Inselkortex-lädierten Tieren blockiert war. Die Proliferationskapazität der Milzlymphozyten der bei Erwerb

scheinoperierten Tiere wies eine um ca. 60% reduzierte Rate auf im Vergleich zu den lädierten Tieren, bei Abruf um ca. 45% reduziert. Üblicherweise wurde in den Studien mit dem gleichen Konditionierungsprotokoll (Exton et al. 1998a, 1998b, 2000a) eine durchschnittliche konditionierte Reduktion in der Proliferationsrate um ca. 20-40% beobachtet. Die Inselkortextläsion hat folglich die konditionierte Suppression der Proliferationsrate erfolgreich blockiert. Auch beim Vergleich der Zytokinproduktion (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) mit Ergebnissen aus den Konditionierungsstudien um Exton ergab sich, dass die Tiere in der vorliegenden Studie mit Scheinläsion deutlich immunsupprimiert waren, während diese CR bei den lädierten Tieren blockiert war. Der Inselkortex scheint folglich sowohl für den Erwerb als auch für den Abruf der konditionierten Immunsuppression notwendig zu sein.

Dies deckt sich mit Studien, die gezeigt haben, dass der Inselkortex bei der konditionierten Suppression humoraler Immunfunktionen notwendig ist, sowohl für den Erwerb als auch für den Abruf (Ramírez-Amaya et al. 1996, 1998).

Die vorliegenden Daten könnten als Beleg dafür dienen, dass der Inselkortex in funktionaler Beziehung zu neuronalen Strukturen steht, die für die Immunomodulation verantwortlich sind, die bei der konditionierten Immunsuppression erfolgt, wie beispielsweise das sympathische Nervensystem oder der Hypothalamus. Der Inselkortex ist bidirektional mit dem Nucleus tractus solitarius verschaltet (Ito 1992; Kiefer 1985). Dieser Nukleus ist der ‚Eingang‘ aller viszeralen Signale und ist ein bedeutender Modulator des autonomen Nervensystems. Das autonome Nervensystem wiederum ist ein wichtiger Kommunikationsweg über den das ZNS Immunantworten moduliert, beispielsweise werden zahlreiche Lymphgewebe sympathisch innerviert (Felten et al. 1987; Felten et al. 1991).

Neben den anatomischen Relationen des Inselkortex ist seine Beteiligung an anderen Lern- und Gedächtnisprozessen verschiedener aversiver Aufgaben (Bermúdez-Rattoni et al. 1991b; Dunn et al. 1988) ein guter Hinweis darauf, dass dieses Areal die neuronalen Mechanismen bei der Assoziation eines Geschmacksreizes und des immunsuppressiven Effektes des CsA kontrolliert.

Die Möglichkeit, dass Inselkortexläsionen die Geschmackswahrnehmung beeinflussen und daher neben der CTA auch die konditionierte Immunsuppression verhindern, konnte bereits von Kiefer et al. (1985) und ebenso von Gutiérrez et al. (1997) ausgeschlossen werden. Die sensorische Diskrimination von Geschmacksreizen bleibt von Inselkortexläsionen unbeeinflusst. Dies legt den Schluss nahe, dass der Inselkortex die assoziativen Mechanismen der immunsupprimierenden Konditionierung mediiert.

Die Effekte der Inselkortexläsionen können nicht auf unspezifische Läsionseffekte zurückgeführt werden, da Läsionen des Inselkortex allein, ohne gekoppelte Konditionierung, keine signifikanten Effekte auf die basalen Immunfunktionen zeigten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Proliferationskapazität der Milzlymphozyten gemessen (Experiment 2). Auch Ramírez-Amaya et al. (1998) konnten keine Inselkortexläsionseffekte auf die basalen Immunfunktionen feststellen.

### **Effekte der Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH)**

#### **(Experiment 3 und 4)**

#### **Konditionierte Geschmacksaversion (CTA)**

Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) haben in der vorliegenden Untersuchung die CTA nicht aufgehoben, alle konditionierten Tiere zeigten eine reliable Geschmacksaversion. Dies galt sowohl für den Erwerb (Scheinläsion 13,2% Sac-Konsum von der Baseline, Läsion 20,7%) als auch für den Abruf (Scheinläsion 23,9% Sac-Konsum von der Baseline, Läsion 22,2%). Der VMH scheint in dem Sac-CsA-CTA-Paradigma keine Rolle zu spielen.

Dies deckt sich mit anderen Befunden aus der Literatur. So berichten Yamamoto et al. (1995), dass exzitotoxische Läsionen des VMH keinen Effekt auf die Entwicklung einer CTA hatten (CS: Sac, UCS: Lithiumchlorid). Die Ergebnisse sind ebenfalls konsistent mit denen von Gold et al. (1972), nach denen Ratten trotz VMH-Läsion eine CTA gegenüber Sac gepaart mit Apomorphin entwickelten, allerdings langsamer als Kontrolltiere, Weisman et al. (1972), nach denen VMH-lädierte Ratten sogar eine stärkere CTA gegenüber gesüßter Milch gepaart mit Methyldotropin entwickelten als Kontrolltiere und Kramer et al. (1983), nach denen durch Messerschnitte VMH-

lädierte Tiere keine veränderte CTA ausprägten als Kontrolltiere. Darüber hinaus existiert unseres Wissens keine andere Veröffentlichung, in der exzitotoxische Läsionen des Hypothalamus im Zusammenhang mit der CTA untersucht wurden.

### **Immunologische Parameter**

Ein anderes Muster ergab sich bei der konditionierten Immunsuppression. Die CR zeigte sich in einer signifikanten Reduktion sowohl für die vor Erwerb scheinlädierten als auch für die vor Erwerb lädierten Tiere verglichen mit den unbehandelten. D.h. zunächst, hier wurde sowohl die Assoziation zwischen CS und UCS erlernt (afferenter Weg) als auch erinnert (efferenter Weg). Erhielten die Tiere die Läsion nach Erwerb aber vor Abruf zeigte sich, dass die CR hier blockiert war. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Läsion und Scheinläsion. Daraus lässt sich folgern, dass der afferente Weg bei der konditionierten Immunsuppression durch Läsion des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) nicht blockiert wurde. Die Assoziation wurde erfolgreich gebildet. Der efferente Weg dagegen wurde durch die VMH-Läsion blockiert, die zuvor gebildete Assoziation zwischen CS und UCS konnte nicht abgerufen werden, wenn der VMH in der Zwischenzeit lädiert wurde. Bekräftigt wurde diese Schlussfolgerung durch die Ergebnisse der Zytokinmessungen: für IL-2 und IFN- $\gamma$  konnte dasselbe Muster beobachtet werden.

Die Befunde sind mit bisherigen Beobachtungen kompatibel. Es ist bekannt, dass der ventromediale Kern des Hypothalamus (VMH) im Hypothalamus die stärksten Verbindungen zum sympathischen Nervensystem aufweist. Elektrische Stimulation des VMH senkte die Proliferation ConA-stimulierter Milzlymphozyten (Okamoto et al. 1996), was durch vorhergehende sympathische Denervation verhindert wurde. Diese Unterdrückung der Milzlymphozytenaktivität könnte daher über die VMH-Sympathikus-Achse übertragen werden. Exton et al. (1998a) gelang der Nachweis, dass die konditionierte CsA-Immunsuppression durch die (zu 98% sympathische) Innervation des Milznerven mediiert wird, denn durch eine Denervation des Milznerven wurde die CR blockiert (efferenter Weg). In dieser Studie wurde erstmals der Beleg geliefert, dass der VMH als zentrale Komponente dieser VMH-Sympathikus-Achse für den efferenten Weg in der Konditionierung wesentlich ist. Studien zur Rolle des VMH bei der Immunkonditionierung sind bisher nicht publiziert.

Die Effekte der VMH-Läsionen auf die basalen Immunfunktionen, gemessen anhand der Proliferationskapazität der Milzlymphozyten (Experiment 4) ergab, dass Läsionen 27 Tage vor der Organentnahme durchgeführt zu einer signifikant erhöhten Proliferation verglichen mit Scheinläsionen führte. Diese Zeitspanne entsprach derjenigen aus dem Konditionierungsexperiment, bei der die Tiere vor Erwerb lädiert wurden. Bei der Konditionierung zeigte sich für vor Erwerb lädierte und scheinlädierte Tiere eine verminderte Proliferationsrate. Insofern können diese Befunde nicht auf die dokumentierten unspezifischen Läsionseffekte zurückgeführt werden, da in diesem Fall eine Blockierung der CR bei den lädierten Tieren zu erwarten gewesen wäre. Für Läsionen 11 Tage vor der Organentnahme durchgeführt (korrespondierend zu der Zeitspanne ‚vor Abruf lädiert‘ und Assay bei dem Konditionierungsexperiment) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Läsion und Scheinläsion: hier hatte die Läsion per se ebenfalls keinen Einfluss auf die normalen Immunfunktionen.

Die Literatur zum Einfluss von Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus (VMH) auf basale Immunfunktionen weist in die gleiche Richtung. Obwohl der VMH generell Immunfunktionen zu modulieren scheint (VMH-Läsionen verringern Anzahl der Milzlymphozyten, (Brooks et al. 1982), VMH-Läsionen verringern anaphylaktische Schocks bei sensitivierten Meerschweinchen, (Schiavi et al. 1975)) und umgekehrt das Immunsystem den VMH zu modulieren vermag (Induktion verschiedener Immunantworten veränderte Aktivität der VMH-Neurone, (Besedovsky et al. 1977)) scheinen VMH-Läsionen nicht die hier untersuchten Parameter zu beeinflussen.

### **Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass die Areale Inselkortex und ventromedialer Kern des Hypothalamus an der zentralen Prozessierung der Klassischen Konditionierung der zellulären Immunsuppression beteiligt sind. Dies liefert wichtige Erkenntnisse zu den Mechanismen, die in diesem Konditionierungsphänomen wirken. Zukünftige Forschungsarbeiten sind notwendig, um diese Prozesse vollständig zu verstehen. Daneben sollten diese Experimente mit Humanstudien zur Konditionierung von Immunfunktionen verzahnt werden, um eine klinische Anwendung wahrscheinlicher werden zu lassen.

## 5. Zusammenfassung

Die Klassische Konditionierung von Funktionen des Immunsystems konnte mittlerweile überzeugend in tier- als auch humanexperimentellen Studien belegt werden. Dabei konnten bisher adrenerge Mechanismen identifiziert werden, die diese konditionierten Effekte vom ZNS in die Peripherie auf dem efferenten Weg vermitteln. Im Gegensatz dazu liegen bisher keine Daten zu den zentralnervösen Mechanismen der konditionierten Immunsuppression vor. Daher wurde in einer Reihe von Experimenten männlichen Dark Agouti Ratten bilaterale exzitotoxische Läsionen in den Inselkortex bzw. in den ventromedialen Kern des Hypothalamus sowohl vor dem Konditionierungsprozess (Erwerb/afferenter Weg) als auch nach der stattgefundenen Konditionierung (Abruf/efferenter Weg) appliziert. Mit Hilfe des Modells der Klassisch konditionierten Immunsuppression mit Cyclosporin A als unkonditioniertem Stimulus und Saccharin als konditioniertem Stimulus wurden die operierten Tiere konditioniert. Die Effekte der Läsionen auf den Konditionierungsprozess wurden im Vergleich zu Ratten gesetzt, die einerseits konditioniert wurden aber Scheinläsionen erhielten, sowie drei weiteren Kontrollgruppen, die keinen chirurgischen Eingriff erhielten. Die Hauptergebnisse zeigen, dass die Läsionen des Inselkortex sowohl den Erwerb als auch den Abruf der konditionierten Geschmacksaversion vollständig blockierten. Die Läsionen des ventromedialen Kern des Hypothalamus dagegen ließen die konditionierte Geschmacksaversion unbeeinflusst stattfinden. Der Erwerb und der Abruf der Klassisch konditionierten Immunsuppression gemessen in der Milzlymphozytenproliferation und in der Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  wurde vollständig durch die Läsionen des Inselkortex blockiert. Im Gegensatz dazu blieb der Erwerb der konditionierten Effekte auf das Immunsystem durch die VMH-Läsionen unbeeinflusst. Der Abruf der konditionierten Immunsuppression wurde jedoch durch diese Läsionen blockiert. Zusammengefasst zeigen diese experimentellen Befunde erstmalig, dass die Klassische Konditionierung zellulärer Immunfunktionen sowohl über den Inselkortex (afferent und efferent) als auch über den ventromedialen Kern des Hypothalamus (efferent) gesteuert werden.

## 6. Literatur

1. Ader, R., Cohen, N. (1975): Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.*, 37, 333-340.
2. Ader, R., Cohen, N. (1982): Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science*, 215, 1534-1536.
3. Ader, R., Kelly, K., Moynihan, J.A., Grotta, L.J., Cohen, N. (1993): Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behav. Immun.*, 7, 334-343.
4. Ader, R., Cohen, N. (2001): Conditioning and immunity. *In*: R. Ader, D.L. Felten, N. Cohen (Eds.): *Psychoneuroimmunology*. S. 3-34. San Diego: Academic Press.
5. Aggleton, J.P., Petrides, M., Iversen, S.D. (1981): Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversion learning by rats. *Physiol. Behav.*, 27, 397-400.
6. Alvarez-Borda, B., Ramirez-Amaya, V., Perez-Montfort, R., Bermudez-Rattoni, F. (1995): Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 64, 103-105.
7. Berman, D.E., Dudai, Y. (2001): Memory Extinction, Learning Anew, and Learning the New: Dissociations in the Molecular Machinery of Learning in Cortex. *Science* 291, 2417-2419.
8. Bermudez-Rattoni, F., McGaugh, J.L. (1991a): Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.*, 549, 165-170.
9. Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B., McGaugh, J.L. (1991b): Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5379-5382.
10. Besedovsky, H.O., Sorkin, E., Felix, D., Haas, H. (1977): Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunol.*, 7 (5), 323-5.
11. Besedovsky, H. O., del Rey, A.E. (1992): Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13, 61-94.
12. Besedovsky, H.O., del Rey, A. (2002): Introduction: immune-neuroendocrine network. *Front Horm Res.*, 29, 1-14.

13. Blalock, J.E. (1994): The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunology Today* 15, 504-511.
14. Blom, J.M., Tamarkin, L., Shiber, J.R., Nelson, R.J. (1995): Learned immunosuppression is associated with an increased risk of chemically-induced tumors. *Neuroimmunomodulation*, 2(2), 92-99.
15. Bovbjerg, D., Ader, R., Cohen, N. (1982): Behaviorally conditioned suppression of a graft-vs-host response. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 79, 583-585.
16. Bovbjerg, D., Ader, R., Cohen, N. (1984): Acquisition and extinction of conditioned suppression of a graft-vs-host response in the rat. *J. Immunol.*, 132, 111-113.
17. Braun, J.J., Lasiter, P.S., Kiefer, S.W. (1982): The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.*, 10, 13-45.
18. Brooks, W.H., Cross, R.J., Roszman, T.L., Markesbery, W.R. (1982): Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Ann. Neurol.*, 12(1), 56-61.
19. Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., Yamamoto, T. (1998) : Conditioned Taste Aversion – Memory of a Special Kind. Oxford: Oxford Psychology Series.
20. Burmester, G. R., Pezzutto, A. (1998): Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik. Stuttgart: Thieme. S. bes. S. 244.
21. Cunningham, E.T.J., Souza, E.B.D. (1993): Interleukin-1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immun. Today*, 14, 171-176.
22. Dantzer, R., Konsman, J.P., Bluthe, R.M., Kelley, K.W. (2000): Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Autonomic Neuroscience* 85, 60-65.
23. Devi, R.S., Namasivayam, A. (1996): Regional specificity seen within hypothalamus in neuroimmunomodulation. *Ind.J.Physiol. Pharmacol.*, 40(1), 70-74.
24. Dunn, L.T., Everitt, B.J. (1988): Double dissociation of the effects of amygdala and IC lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance and neophobia in rat using the excitotoxic ibotenic acid. *Behav. Neurosci.*, 102, 3-23.
25. Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S. (2000): The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews* 52 (4), 595-638.
26. Elmquist, J.K., Scammell, T.E., Saper, C.B. (1997): Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neuroscience* 20, 565-570.

27. Escobar, M.L., Jimenez, N., Lopez-Garcia, J.C., Tapia, R., Bermudez-Rattoni, F. (1993): Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and re-establishes graft choline acetyltransferase activity. *J. Neural Transplant. Plast.*, 4, 167-172.
28. Exton, M.S., von Hörsten, S., Schult, M., Vöge, J., Strubel, T., Donath, S., Steinmüller, C., Seeliger, H., Nagel, E., Westermann, J., Schedlowski, M. (1998a): Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporin A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *J. Neuroimmunol.* 88, 182-191.
29. Exton, M.S., von Hörsten, S., Vöge, J., Westermann, J., Schult, M., Nagel, E., Schedlowski, M. (1998b): Conditioned taste aversion produced by cyclosporine A: concomitant reduction in lymphoid organ weight and splenocyte proliferation. *Physiol. Behav.* 63(2), 241-247.
30. Exton, M.S., Schult, M., Donath, S., Strubel, T., Nagel, E., Westermann, J., Schedlowski, M. (1998c): Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Transpl. Proc.*, 30, 2033.
31. Exton, M.S., King, M.G., Husband, A.J. (1999): Behavioral conditioning of immunity. *In: M. Schedlowski, U. Tewes (Eds.): Psychoneuroimmunology. S. 453-471. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Plenum Publishers.*
32. Exton, M.S., von Auer, A.K., Buske-Kirschbaum, A., Stockhorst, U., Göbel, U., Schedlowski, M. (2000a): Pavlovian conditioning of immune function: animal investigation and the challenge of human application. *Behav. Brain Res.*, 110, 129-141.
33. Exton, M.S., Elfers, A., Jeong, W.Y., Bull, D. F., Westermann, J., Schedlowski, M. (2000b): Conditioned suppression of contact sensitivity is independent of sympathetic splenic innervation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279, R1310-R1315.
34. Exton, M.S., von Hörsten, S., Strubel, T., Donath, S., Schedlowski, M., Westermann, J. (2000c): Conditioned alterations of specific blood leukocyte subsets are reconditionable. *Neuroimmunomodulation*, 7, 106-114.
35. Exton, M.S., Herklotz, J., Westermann, J., Schedlowski, M (2001): Conditioning in the rat: an in-vivo model to investigate the molecular mechanisms and clinical implications of brain-immune communication. *Immunol. Rev.*, 184, 226-235.
36. Exton, M.S., Gierse, C., Meier, B., Mosen, M., Xie, Y., Frede, S., Goebel, M.U., Limmroth, V., Schedlowski, M. (2002): Behaviorally conditioned immunosuppression

- in the rat is regulated via noradrenaline and  $\beta$ -adrenoceptors. *J. Neuroimmunol.*, 131(1-2), 21-30.
37. Felten, D.L., Ackerman, K.D., Wiegand, S.J., Felten, S.Y. (1987): Noradrenergic and sympathetic innervation of the spleen. *J. Neurosci. Res.*, 18, 28-36.
38. Felten, S.Y., Felten, D.L. (1991): The innervation of lymphoid tissue. *In*: R. Ader, N. Cohen, D.L. Felten (Eds.): *Psychoneuroimmunology*. S. 27-70. Academic Press, New York.
39. Felten, S.Y., Felten, D.L. (1994): Neural-immune interactions. *Progress in Brain Research.*, 100, 157-162.
40. Forni, G., Bindoni, M., Santoni, A., Belluardo, N., Marchese, A.E., Giovarelli, M.(1983): Radiofrequency destruction of the tuberoinfundibular region of hypothalamus permanently abrogates NK cell activity in mice. *Nature*, 306, 181-184.
41. Gallo, M., Roldan, G., Bures, J. (1992): Differential involvement of gustatory IC and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.*, 52, 91-97.
42. Ghanta, V.K., Hiramoto, R.N., Solvason, H.B., Spector, N.H. (1985): Neural and environmental influences on neoplasia and conditioning of NK activity. *J. Immunol.*, 135(2), 848-852.
43. Ghanta, V., Hiramoto, R.N., Solvason, B., Spector, N.H. (1987): Influence of conditioned natural immunity on tumor growth. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 496, 637-646.
44. Ghanta, V., Miura, T., Hiramoto, N.S., Hiramoto, R.N. (1988): Augmentation of natural immunity and regulation of tumor growth by conditioning. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 521, 29-42.
45. Ghanta, V.K., Hiramoto, N.S., Soong, S.J., Miller, D.M., Hiramoto, R.N. (1993): A multiple modality approach to immunotherapy. *International Journal of Neuroscience*, 71, 251-265.
46. Garcia, J., Kimmeldorf, D.J., Koelling, R.A. (1955): Conditioned aversion to Saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122, 157-158.
47. Garcia, J., Lasiter, P.S., Bermudez-Rattoni, F., Deems, D.A. (1985): A general theory of aversion learning. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443, 8-21.
48. Goebel, M.U., Trebst, A.E., Steiner, J., Xie, X.F., Exton, M.S., Frede, S., Canbay, A., Michel, M.C., Heeman, U., Schedlowski, M. (2002): Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in man. *FASEB J.*, 16, 1869-1873.

49. Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Hansen, M.K., Anderson, K., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2000): Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neuroscience*. 85, 49-59.
50. Gold, R., Proulx D. (1972): Bait-shyness acquisition is impaired by VMH lesions that produce obesity. *J. Comp. Physiol. Psy.*, 79, 201-209.
51. Gorczyński, R.M. (1990): Conditioned enhancement of skin allografts in mice. *Brain Behav. Immun.*, 4, 85-92.
52. Grochowicz, P.M., Schedlowski, M., Husband, A.J., King, M.G., Hibberd, A.D., Bowen, K.M. (1991): Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Brain Behav. Immun.*, 5, 349-356.
53. Gutiérrez, H., Miranda, M.I., Bermúdez-Rattoni, F. (1997): Learning impairment and cholinergic deafferentation after cortical nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.*, 17, 3796-3803.
54. Hansen, J.J., Krogsgaard-Larsen P. (1990): Structural, conformational, and stereochemical requirements of central excitatory amino acid receptors. *Med. Res. Rev.*, 10, 55-94.
55. Hiramoto, R.N., Hiramoto, N.S., Solvason, H.B., Ghanta, V.K. (1987): Regulation of natural immunity (NK activity) by conditioning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 496, 545-552.
56. Hucklebridge, F. (2002): Neuroimmune relationships in perspective. *Int. Rev. Neurobiol.*, 52, 1-15.
57. Husband, A.J., King, M.G., Brown, R. (1987): Behaviorally conditioned modification of T cell subset ratios in rats. *Immunol. Lett.*, 14, 91-94.
58. Ito, S. (1992): Multiple projection of vagal non-myelinated afferent to the anterior insular cortex in rats. *Neurosci. Lett.*, 148, 151-154.
59. Kahan, B.D. (1989): Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.*, 321, 1725-1737.
60. Kelley, K.W., Bluthé, R.-M., Dantzer, R., Zhou, J.-H., Shen, W.-H., Johnson, R.W., Broussard, S.R. (2003): Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behav. Immun.*, 17, 112-118.
61. Kiefer, S.W. (1985): Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443, 100-109.
62. Kirschbaum, C., Jabaajj, L., Buske-Kirschbaum, A., Hennig, J., Blom, M., Dorst, K., Bauch, J., DiPauli, R., Schmitz, G., Ballieux, R., Hellhammer, D.H. (1992):

- Conditioning of drug-induced immunomodulation in human volunteers: a European collaborative study. *Br. J. Clin. Psychol.*, 31, 459-472.
63. Klein, R.L., Wilson, S.P., Dzielak, D.J., Yang, W.H., Viveros, O.H. (1982): Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. *Neuroscience*, 7, 2255-2261.
64. Klosterhalfen, W., Klosterhalfen, S. (1983): Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjuvant arthritis in rats. *Behav. Neurosci.*, 97, 663-666.
65. Klosterhalfen, W., Klosterhalfen, S. (1985): Conditioned immunopharmacologic effects and adjuvant arthritis: further results. *In*: N.H. Spector (Ed.): *Proceedings of the First International Workshop on Neuroimmunomodulation*. S. 183-87. Bethesda, MD: IWGN.
66. Klosterhalfen, S., Klosterhalfen, W. (1987): Classically conditioned effects of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 496, 569-577.
67. Klosterhalfen, W., Klosterhalfen, S. (1990): Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behav. Neurosci.* 104(5), 716-724.
68. Köhler, T. (2001): *Biopsychologie*. Stuttgart: Kohlhammer.
69. Kramer, T.H., Sclafani, A., Kindya, K., Pezner, M. (1983): Conditioned taste aversion in lean and obese rats with ventromedial hypothalamic knife cuts. *Behav. Neurosci.*, 97, 110-119.
70. Lasiter, P.S., Glanzman, D.L. (1982): Cortical substrates of taste aversion learning: dorsal prepiriform (insular) lesions disrupt taste aversion learning. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 96 (3), 376-392.
71. Maier, S.F., Watkins, L.R.(2003): Immune-to-central nervous system communication and its role in modulating pain and cognition: Implications for cancer and cancer treatment. *Brain, Behav. Immun.*, 17, 125-131.
72. Masek, K., Petrovicky, P., Seifert, J. (1992): An introduction on the possible role of central nervous system structures in neuroendocrine-immune system interactions. *Int. J. Immunopharmacol.*, 14, 317-322.
73. Metal'nikov, S., Chorine, V. (1926): The role of conditioned reflexes in immunity. *In*: S. Locke, R. Ader, H.O. Besedovsky, N. Hall, G. Solomon, G. Strom (Eds.): *Foundations of psychoneuroimmunology*. S. 263-267. New York: Aldine.

74. Nachman, M., Ashe, J.H. (1974): Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *J.Comp. Physiol. Psychol.*, 87, 622-643.
75. Okamoto, S., Ibaraki, K., Hayashi, S., Saito, M. (1996): Ventromedial hypothalamus suppresses splenic lymphocyte activity through sympathetic innervation. *Brain Res.*, 739, 308-313.
76. Paxinos, G., Watson, C. (1998): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Harcourt Brace.
77. Pavlov, I.P. (1928): *Lectures on conditioned reflexes*. New York : Liveright.
78. Pinel, J.P.J. (2001): *Biopsychologie*. Heidelberg: Spektrum.
79. Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Ormsby, C.E., Martinez, R.B., Perez-Montfort, R., Bermudez-Rattoni, F. (1996): Insular cortex lesion impair the acquisition of conditioned immunosuppression. *Brain Behav. Immun.*, 10, 103-114.
80. Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Bermudez-Rattoni, F. (1998): Differential effects of NMDA lesions into the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain Behav. Immun.*, 12, 149-60.
81. Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F. (1999): Conditioned enhancement of antibody production is disturbed by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain Behav. Immun.*, 13, 46-60.
82. Resch, K. , Szamel, M. (1997): Molecular mechanism of the immunosuppressive reaction of cyclosporin A. *Int. J. Immunopharmacol.*, 19, 579- 585.
83. Rogers, M.P., Reich, P., Strom, T.B., Carpenter, C.B. (1976): Behaviorally conditioned immunosuppression: Replication of a recent study. *Psychosom. Med.*, 38, 447-452.
84. Roudebush, R.E., Bryant, H.U. (1991): Conditioned immunosuppression of a murine delayed type hypersensitivity response: Dissociation from corticosterone elevation. *Brain Behav. Immun.*, 5, 308-317.
85. Saito, M., Minokoshi, Y., Shimazu, T (1989): Accelerated norepinephrine turnover in peripheral tissues after ventromedial hypothalamic stimulation in rats. *Brain Res.*, 481, 298-303.
86. Sanders, V.M., Kasprovicz, D.J., Kohm, A.P., Swanson, M.A. (2001): Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Eds.): *Psychoneuroimmunology*. Third Edition. S. 161-196. San Diego: Academic Press.

87. Schafe, G.E., Thiele, T.E., Bernstein, I.L. (1998): Conditioning method dramatically alters the role of amygdala in taste aversion learning. *Learn. Mem.*, 5, 481-492.
88. Schiavi, R.C., Macris, N.T., Camerino, M.S., Stein, M. (1975): Effect of hypothalamic lesions on immediate hypersensitivity. *Am. J. Physiol.*, 228 (2), 596-601.
89. Simonian, N.A., Getz, R.L., Leveque, J. C., Konradi, C, Coyle, J.T. (1996): Kainic acid induces apoptosis in neurons. *Neuroscience* 75, 1047-1055.
90. Spector, N.H. (1987): Old and new strategies in the conditioning of immune responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 741, 283-291.
91. Tracey, K. (2002): The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853-859.
92. Van der Kooy, D.L., Koda, L.Y., McGinty, J.F., Gerfen, C.R., Bloom, F.E. (1984): The organization of projections from the cortex to the amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J. Comp. Neurol.*, 224, 1-24.
93. Van der Meide, P.H., Borman, A.H., Beljaars, H.G., Dubbeld, M.A., Botman, C.A., Schellekens, H. (1989): Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed to rat interferon-gamma. *Lymphokine Res.* 8(4), 439-49.
94. Von Hörsten, S., Exton, M.S., Schult, M., Nagel, E., Stalp, M., Schweitzer, G., Vöge, J., del Rey, A., Schedlowski, M, Westermann, J. (1998): Behaviorally conditioned effects of cyclosporine a on the immune system of rats: specific alterations of blood leukocyte numbers and decrease of granulocyte function. *J. Neuroimmunol.*, 85(2), 193-201.
95. Wayner, E.A., Flannery, G.R., Singer, G. (1978): Effects of taste aversion conditioning on the primary antibody response to sheep red blood cells and *Brucella abortus* in the albino rat. *Physiol. Behav.*, 21(6), 995-1000.
96. Weisman, R., Hamilton, L, Carlton, P. (1972): Increased conditioned gustatory aversion following VMH lesions in rats. *Phys. Beh*, 9, 801-804.
97. Yamamoto, T., Matsuo, R., Kawamura, Y. (1980): Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J. Neurophysiol.*, 44, 440-455.
98. Yamamoto, T., Fujimoto, Y., Shimura, T., Sakai, N. (1995): Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neurosci. Res.*, 22 31-49.
99. Yasoshima, Y., Yamamoto, T. (1998): Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neuroscience* 84(1), 1-5.

## **LEBENS LAUF**

Name: Maj-Britt Niemi

Geburtsdatum: 07.01.1974

Geburtsort: Düsseldorf

Wohnort: Essen

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

## **Ausbildung**

### *Schule*

08/1980-06/1984            Grundschule Martinschule in Ratingen

08/1984-06/1993            Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Ratingen,  
Abschluss ‚Abitur‘

### *Universität*

04/1994-09/1999            Studium der Psychologie an der Technischen Universität  
Braunschweig, Abschluss ‚Diplom-Psychologin‘

10/1999-09/2001            Studium der Physik an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

### *Berufliche Tätigkeiten*

07/2001-10/2001            freiberufliche Tätigkeit, Erstellung von psychothera-  
peutischen Gutachten

seit Oktober 2001            wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische  
Psychologie, Universitätsklinikum Essen