

Diplomarbeit

**Tageszeitabhängige
„Delayed-Type-Hypersensitivity (DTH)“ Immunantworten**

eingereicht von

Nina Frings

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

**Lehrstuhl für Physiologie der Medizinischen Universität Graz/
Klinikum der Ludwigs-Maximilians-Universität München, Klinik
für Anästhesiologie**

unter der Anleitung von

Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med. Nandu Goswami, PhD

Prof. Dr. med. Alexander Choukér

Graz, 04.06.2020

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 04.06.2020

Nina Frings eh

i. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med. Nandu Goswami, PhD, und Prof. Dr. med. Alexander Choukér für die Unterstützung bei der Suche des Themas und der Ausführung und Fertigstellung meiner Diplomarbeit bedanken.

Ich bedanke mich herzlichst beim Team der Arbeitsgruppe „Translationale Forschung – Stress und Immunologie“, Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München, für den Support bei sämtlichen Vorbereitungen und Versuchen. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Dominique Moser, die mir eine große Hilfe beim Einstieg ins wissenschaftliche Arbeiten war und ohne die ich im Labor und bei der Auswertung meiner Daten sicher verzweifelt wäre.

Auch möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium der Humanmedizin überhaupt erst ermöglicht haben und mir die letzten Jahre den Rücken freigehalten haben soweit es über 900 km möglich war.

Meinen FreundInnen und StudienkollegInnen danke ich für wunderbare Studienjahre mit allen Höhen und Tiefen auf dem Weg zum Abschluss. Dabei sind vor allem Andrzej Hecker, Katharina Haslacher und Giannis Konstantellos zu erwähnen, die mich in den letzten Monaten tatkräftig bei Teestunden und Fachsimpeleien unterstützt haben.

ii. Inhaltsverzeichnis

i. Danksagung.....	ii
iii. Abkürzungsverzeichnis.....	vii
iii.i Abkürzungen	vii
iii.ii Einheiten	x
iv. Tabellenverzeichnis.....	xi
v. Abbildungsverzeichnis.....	xii
vi. Zusammenfassung	xiv
vi. Abstract.....	xv
1. Einleitung.....	1
1.1 Vorwort.....	1
1.2 Regulation des Zirkadianen Rhythmus.....	1
1.3 Immunsystem	3
1.3.1 Delayed-Type-Hypersensitivity	4
1.3.2 Angeborene Immunität.....	4
1.3.3 Toll-like-Rezeptoren	6
1.3.4 Adaptive Immunität	6
1.3.5 MHC-System	8
1.3.6 Cluster of Differentiation	10
1.3.7 Zytokine	14
1.4 Antigene.....	17
1.4.1 Heat-killed Listeria Monocytogenes.....	17
1.4.2 Candida albicans	17
1.5 Hypophysäre Regelkreisläufe der Hormone.....	17
1.6 Hormone der Nebenniere.....	18

1.6.1 Glucocorticoide	18
1.6.2 Adrenalin/ Noradrenalin	21
1.7 Stressresponse	21
1.8 Endocannabinoide	22
1.8.1 Historie.....	22
1.8.2 Funktionen	22
1.8.3 Effekte auf Immunantworten.....	23
1.8.4 Zirkadianität der Endocannabinoide	23
1.9 Hypothese.....	24
2. Material	26
2.1 Geräte	26
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.3 Chemikalien	27
2.3.1 Lösungen.....	27
2.3.2 Aktivatoren/ Inhibitoren	28
2.3.3 Antikörper	29
2.3.4 Kits	30
2.4 Software.....	30
2.5 Fragebögen	30
3. Methoden	31
3.1 Probandenkollektiv	31
3.2 Studienaufbau.....	31
3.3 Monitoring der Probanden	31
3.4 Probenabnahme	32
3.5 Bestimmung der Lymphozytenuntergruppen mittels IMK-Lymphocyte	32

3.6 Messung der Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten anhand der H ₂ O ₂ -Produktion (Oxidative Burst)	34
3.7 Bestimmung der Funktionalität der DTH nach Antigen-Stimulation	35
3.7.1 Herstellung der Blut-Antigen-Ansätze	35
3.7.2 Monozyten-/ Lymphozytenphänotypisierung	36
3.7.3 Zytokinanalyse mittel Cytometric Bead Array (CBA)	37
3.8 Bestimmung der Hormonspiegel	38
3.8.1 Cortisol	38
3.8.2 Endocannabinoide	38
3.9 Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1 Anthropometrische Daten	42
4.2 Auswertung Blutbild und IMK	42
4.3 H ₂ O ₂ -Produktion durch neutrophile Granulozyten	43
4.4 Expression der Oberflächenmarker auf Monozyten	45
4.4.1 CD14/CD16	45
4.4.1 TLR-2	47
4.4.2 HLA-DR	49
4.4.3 CD40	51
4.4.4 CD69	51
4.4.5 CD80	52
4.5 Lymphozyten	54
4.5.1 CD28	54
4.5.2 CD152	55
4.6 Zytokinspiegel der DTH-Ansätze	56
4.6.1 Tumor-Nekrose-Faktor alpha	56

4.6.2 Interferon gamma	58
4.6.3 Interleukin 2	59
4.6.4 Interleukin 4	61
4.6.5 Interleukin 6	62
4.6.6 Interleukin 10	63
4.7 Steroidspiegel	65
4.7.1 Cortisol und Cortison	65
4.7.2 Androstendion	65
4.7.3 Testosteron	66
4.8 Endocannabinoide	67
4.8.1 2-AG	67
4.8.2 AEA	67
4.8.3 SEA	68
4.8.4 OEA	69
4.8.5 PEA	69
5. Diskussion	71
5.1 Hauptfragestellung	71
5.1 Probandenkollektiv	71
5.2 Leukozyten	72
5.2.1 Neutrophile Granulozyten	72
5.2.2 Monozyten	72
5.2.5 Lymphozyten	73
5.3 Zytokine	73
5.4 Endocannabinoide	74
5.5 Conclusio	74
6. Referenzen	76

iii. Abkürzungsverzeichnis

iii.i Abkürzungen

A1/2/3	Arbeitslösung 1/2/3
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
ADO	Adenosin
AEA	N-Arachidonoylethanolamid
AM	AM1241 ((2-iodo-5-nitrophenyl)-(1-(1-methylpiperidin-2-ylmethyl)-1H-indol-3-yl)methanon)
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BD	Becton & Dickinson
BMAL1	Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1
Cal A-G	Kalibrator A-G
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CB 1/2	Cannabinoidrezeptor 1/2
CBA	Cytokine Bead Array
CCG	Circadian-clock-controlled genes
CD	Cluster of differentiation
CGS	CGS 21680 (4-[2-[[6-amino-9-(N-ethyl-b-D-ribofuranuronamidossyl)-9H-purin-2-yl]amino]ethyl]-benzenpropan-säure)
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
Cry-Gen	Cytochrome-Gen
DHR	DHR 123 (Dihydro-Rhodamin)
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
EC	Endocannabinoid
ECS	Endocannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FAAH	Fatty acid amid hydrolase
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FMLP	Formylmethionylleucinphenylalanin
GC	Glucocorticoid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HKLM	Heat killed <i>Listeria monozytogenes</i>
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPLC	High-performance-liquid-chromatography
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1/2/4/6/10	Interleukin 1/2/4/6/10
IL-10R	Interleukin 10 Rezeptor
IMK	Immunfluoreszenz-Kit
ISM	Interner Standard-Mix
JAK	Januskinase
KAB	Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Leukozytenreiches Plasma
MAGL	Monoacylglycerollipase
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRS	MRS 1754 (N-(4-cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1-H-purin-8-yl) phenoxy]-acetamid)
MTBE	Tertiär-Butyl-Methylether

MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NE	Norepinephrin
NFkB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NNR	Nebennierenrinde
Nor	Noradrenalin
OEA	Oleoyl-Ethanolamid
PE	Phycoerythrin
PEA	Palmitoyl Ethanolamid
Per-Gen	Period-Gen
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PMA	Phorbol myristat acetat
PMN	Polymorphkernige Leukozyten
R1/2	Blut-Rekonstruktions-Puffer 1/2
Rev-erb	Reverse erythroblastoma
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
Ror	Retinoid orphan receptor
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-1640-Medium
SCN	Subchiasmatic Nucleus
SD	Standardabweichung
SEA	Stearoyl-Ethanolamid
THC	Tetrahydrocannabinol
TLR-2/4	Toll-like-Rezeptor 2/4
TNF	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFR	TNF-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem
2-AG	2-Arachidonoylglycerol

iii.ii Einheiten

g	Gramm
kg	Kilogramm
µg	Mikrogramm
pg	Picogramm
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
m	Meter
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mol	Mol
mmol	Millimol

iv. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Lösungen des IMK-KITs.....	32
Tabelle 2 - Granulozyten-Stimulantien/ -Inhibitoren im Hinblick auf H ₂ O ₂ -Freisetzung	34
Tabelle 3 - H ₂ O ₂ -Assay Reagenzien mit Konzentrationen	35
Tabelle 4 - DTH-Ansätze.....	36
Tabelle 5 - Antikörper für die Mono- / Lymphozytentypisierung.....	37
Tabelle 6 - Konzentrationen der ursprünglichen Kalibratoren und interne Standards.....	38
Tabelle 7- Konzentrationen der Kalibratoren zur Bestimmung der Endocannabinoidspiegel in Blut	40
Tabelle 8 - Anthropometrische Daten des Probandenkollektivs	42
Tabelle 9 - Mittelwerte IMK-Messungen	42
Tabelle 10 - Mittelwerte der CD14/CD40-Expression	51
Tabelle 11 - Basalwerte der CD14/CD80-Expression im Vergleich zu mit <i>Candida albicans</i> inkubierten Ansätzen.....	53

v. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Zirkadiane Regulation durch den SCN und Expression der CCGs	2
Abbildung 2 - Überblick über das Immunsystem	4
Abbildung 3 - Degranulation und Phagozytose	5
Abbildung 4 - Aktivierung der adaptiven Immunantwort	8
Abbildung 5 - Interaktion über HLA-Moleküle zwischen APC und T-Zellen	9
Abbildung 6 - Opsonierung und Co-Stimulation durch CD40	12
Abbildung 7 - Affinitäten der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zu den Liganden CD28 und CD152 (CTLA-4)	13
Abbildung 8 - Lokale und systemische Effekte von TNF	15
Abbildung 9 - HPA-Achse	19
Abbildung 10 - Endokrine Regulation der zirkadianen Physiologie	20
Abbildung 11 - Zirkadianität des Cortisolspiegels	20
Abbildung 12 - Zirkadianität und das Endocannabinoidsystem	24
Abbildung 13 - Beispiel für die Auswertung per IMK-Set	33
Abbildung 14 - H ₂ O ₂ -Produktion neutrophiler Granulozyten	43
Abbildung 15 - H ₂ O ₂ -Produktion neutrophiler Granulozyten normiert auf die Kontrollproben	44
Abbildung 16 - H ₂ O ₂ -Produktion neutrophiler Granulozyten normiert auf TNF/fMLP	44
Abbildung 17 - Expression CD14/CD16 basal	45
Abbildung 18 - Expression CD14/CD16 nach HKLM-Inkubation	46
Abbildung 19 - Expression CD14/CD16 nach HKLM-Inkubation	46
Abbildung 20 - Expression CD14/CD16 nach Inkubation mit Candida albicans	47
Abbildung 21 - CD14/TLR-2-Expression basal	48
Abbildung 22 - CD14/TLR-2-Expression nach Inkubation mit Antigenen	48
Abbildung 23 - CD14/HLA-DR-Expression basal	49
Abbildung 24 - CD14/HLA-DR-Expression nach HKLM-Inkubation	50
Abbildung 25 - CD14/HLA-DR-Expression nach Inkubation mit Candida albicans	50
Abbildung 26 - CD14/CD69-Expression nach HKLM-Inkubation	52
Abbildung 27 - CD14/CD80-Expression nach HKLM-Inkubation	53

Abbildung 28 - CD4/CD28-Expression basal.....	54
Abbildung 29 - CD8/CD28-Expression basal.....	54
Abbildung 30 - Basalkonzentration TNF.....	56
Abbildung 31 - Konzentration TNF nach HKLM-Inkubation.....	57
Abbildung 32 - Konzentration TNF nach Inkubation mit <i>Candida albicans</i>	57
Abbildung 33 - Basalkonzentration IFN- γ	58
Abbildung 34 - Konzentration IFN- γ nach HKLM-Inkubation.....	59
Abbildung 35 - Konzentration IFN- γ nach Inkubation mit <i>Candida albicans</i>	59
Abbildung 36 - IL-2-Konzentration nach HKLM-Inkubation.....	60
Abbildung 37 - IL-2-Konzentration nach Inkubation mit <i>Candida albicans</i>	60
Abbildung 38 - IL-4-Konzentration basal.....	61
Abbildung 39 - IL-4-Konzentration nach HKLM-Inkubation.....	61
Abbildung 40 - IL-4-Konzentration nach Inkubation mit <i>Candida albicans</i>	62
Abbildung 41 - IL-6-Konzentration nach HKLM-Inkubation.....	63
Abbildung 42 - IL-6-Konzentration nach Inkubation mit <i>Candida albicans</i>	63
Abbildung 43 - IL-10-Konzentration nach HKLM-Inkubation.....	64
Abbildung 44 - IL-10-Konzentration nach Inkubation mit <i>Candida albicans</i>	64
Abbildung 45 - Speichelcortisol.....	65
Abbildung 46 - Speichelandrosteron Probanden einzeln	66
Abbildung 47 - 2-AG-Konzentrationen auf T1 normiert	67
Abbildung 48 - AEA-Konzentrationen auf T1 normiert	68
Abbildung 49 - SEA-Konzentrationen auf T1 normiert	68
Abbildung 50 - OEA-Konzentrationen auf T1 normiert	69
Abbildung 51 - PEA-Konzentrationen auf T1 normiert.....	70

vi. Zusammenfassung

Einleitung: Die komplexen Zusammenhänge des Immunsystems mit anderen Organsystemen sind bis heute nicht vollständig erforscht. Gegenstand dieser Diplomarbeit ist eine Pilotstudie zur Funktion des Immunsystems in Abhängigkeit der Zirkadianität. Ziel der Studie war, Schwankungen der verzögerten Immunantwort und den Aktivitätszustand von Immunzellen über den Tagesverlauf zu detektieren und in einen Zusammenhang mit den Nebennierenhormonen und den Liganden des Endocannabinoidsystems zu bringen. Es wurde ein breites Spektrum immunologischer und hormoneller Parameter erhoben, um einen Überblick zu schaffen, wo man in Zukunft bei weiterer Forschung ansetzen könnte.

Methoden: Es wurden bei 6 gesunden, männlichen Probanden jeweils am Morgen, Mittag und Abend innerhalb eines Tages Blut- und Speichelproben gesammelt, Vitalparameter gemessen, Angaben zum aktuellen Stresslevel sowie anthropometrische Daten erhoben.

Zu allen drei Zeitpunkten wurde mittels Durchflusszytometrie der Aktivierungsgrad neutrophiler Granulozyten über deren stimulierte H₂O₂-Freisetzung gemessen, sowie der Aktivitätszustand von Monozyten über Oberflächenexpression von TLR-2, HLA-DR, CD40, CD69, CD80 und von Lymphozyten über CD28 und CD152 Expression nach einer Antigen-Inkubation. Mittels High-Performance-Liquid-Chromatographie wurden Steroidspiegel aus Speichelproben sowie Serumkonzentrationen der Endocannabinoide 2-AG, AEA, SEA, OEA und PEA gemessen.

Ergebnisse: Es wurden zirkadiane Variationen in der Aktivität und Stimulierbarkeit bei neutrophilen Granulozyten über die H₂O₂-Freisetzung beobachtet. Zirkadiane Schwankungen der Aktivierungsgrade von Monozyten konnten in der Expression der Oberflächenmoleküle CD16, TLR-2 und HLA-DR beobachtet werden. Die Stimulation durch Antigene zeigte sich zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich stark, sowie die Effekte durch Norepinephrin und des selektiven CB₂-Agonisten AM1241.

Bei den Zytokinen konnte beobachtet werden, dass die Basalspiegel von TNF- α , IFN- γ und IL-6 zirkadianen Schwankungen unterlagen, während sich IL-2, IL-4 und IL-10 basal tageszeitunabhängig verhielten. In der Stimulierbarkeit und Hemmbarkeit der Sekretion konnten zirkadiane Unterschiede beobachtet werden.

Die Spiegel der Endocannabinoide 2-AG, AEA, SEA, OEA, PEA zeigten Unregelmäßigkeiten zur Mittagszeit. Bei AEA, OEA und PEA zeigten fast alle Probanden abends niedrigere Werte als morgens.

Conclusio: Aufgrund der niedrigen Probandenzahl und der nicht standardisierten Rahmenbedingungen ist die Aussagekraft der Studie limitiert. In Zukunft könnte man die direkten Einwirkungen der Zytokine und Hormone auf die Expression der einiger Oberflächenmoleküle unter standardisierten Bedingungen mit größeren Probandenzahlen genauer untersuchen, auch im Hinblick auf Altersgruppen- und Geschlechterunterschiede.

vi. Abstract

Introduction: The complex relationships between the immune system and other organic systems have not been fully researched, yet. The subject of this diploma thesis is a pilot study on the function of the immune system and its circadian changes. The aim of the study was to identify fluctuations in the delayed type hypersensitivity and cellular activity through the course of the day, in connection with the hormones of the adrenal gland and the ligands of the endocannabinoid system. A wide range of immunological and hormonal parameters were collected in order to provide possibilities of further research.

Methods: Blood and saliva samples were taken from 6 healthy, male subjects at morning, noon and evening within a day, their vital parameters were measured and a standardized questionnaire on their current stress level was filled out and anthropometric data was collected.

On the basis of flow-cytometry, the degrees of activation of neutrophil granulocytes were measured by means of their H_2O_2 -release at all three points in time, as well as the monocyte activity by the surface expression TLR-2, HLA-DR, CD40, CD69, CD80 and CD28 and CD152 expression on lymphocytes after incubation with antigenes. Steroid levels from saliva samples and serum concentrations of the ligands of the endocannabinoids 2-AG, AEA, SEA, OEA and PEA were measured by high-performance-liquid-chromatography.

Results: In neutrophil granulocytes regular circadian variations in activity and stimulability was observed via H_2O_2 -release. Circadian fluctuations in the degree of activation of monocytes was observed in the expression of the surface molecules CD16, TLR-2 and HLA-DR. The degree of stimulation by pathogens varied in strength at different times as well as the effects by norepinephrine and the selective CB2-agonist AM1241.

With regards to the cytokines, circadian fluctuations in the basal levels of TNF, IFN- γ and IL-6 were observed whereas IL-2, IL-4 and IL-10 behaved basally independent of the time of day. Circadian differences were observed in the stimulability and inhibibility.

The levels of the endocannabinoids 2-AG, AEA, SEA, OEA, PEA, however, showed irregularities at noon and in the case of AEA, OEA and PEA, almost all subjects showed lower values in the evening than in the morning.

Conclusion: Due to the low number of subjects and the non-standardized conditions, the significance of the study is limited. For future research, the direct effects of the cytokines and hormones on the expression of some surface molecules under standardized conditions with larger numbers of subjects could be examined more closely, also with regard to the age group and gender differences.

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Das Immunsystem ist seit Jahren Gegenstand der medizinischen Forschung, es ist jedoch noch ein weiter Weg bis zum vollständigen Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge der immunologischen Prozesse mit anderen Organsystemen.

Gegenstand dieser Diplomarbeit ist eine Pilotstudie, die sich mit den zirkadianen Schwankungen des Immunsystems im Zusammenhang mit hormonellen Einflüssen auseinandersetzt. Dabei wurde der Fokus auf die verzögerte Immunantwort (*Delayed-Type-Hypersensitivity*) gelegt und ein Spektrum an Experimenten und Messungen gewählt, welches erste Einblicke über die Stimulierbarkeit und Hemmbarkeit der Zellen des Immunsystems gewähren soll und die Schwankungen von Hormonspiegeln und des Endocannabinoidsystems im Tagesverlauf abbildet.

Es ist bereits bekannt, dass Immunantworten von Stresshormonen und unterschiedlichen Liganden des Endocannabinoidsystems (*ECS*) beeinflusst werden (Yaeger *et al.*, 2008; Tanasescu and Constantinescu, 2010; Buchheim *et al.*, 2018). Außerdem wurde beobachtet, dass sowohl Immunzellen (Man *et al.*, 2017) als auch die Stresshormone der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*HPA-Achse*) tageszeitlichen Schwankungen unterliegen (Neumann *et al.*, 2019) und auch das ECS einen zirkadianen Rhythmus aufweist (Vaughn *et al.*, 2010).

Diese Diplomarbeit soll bereits bekannte Schwankungen der Hormon-, Endocannabinoid- und Zytokinspiegel sowie Veränderungen der Immunaktivität im Tagesverlauf zusammenfassen und die in der Pilotstudie neu erhobenen Daten zu diesen Punkten vorstellen.

1.2 Regulation des Zirkadianen Rhythmus

Der Tagesrhythmus der physiologischen und psychologischen Funktionen der Säugetiere wird von endogenen Oszillatoren des zentralen Nervensystems (*ZNS*) gesteuert, die aus Neuronen mit sich rhythmisch verändernder Membranleitfähigkeit bestehen. Diese werden

durch innere und äußere Zeitgeber wie Licht, Sozialkontakte und Nahrungsaufnahme beeinflusst und an den 24-Stunden-Rhythmus angepasst, der durch die Rotation der Erde um die eigene Achse entsteht. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Tsang *et al.*, 2015; Hirayama, Mure and Panda, 2018)

Seit den 1950er Jahren wurde durch unterschiedliche Studien festgestellt, dass helles Licht einer der wichtigsten äußeren Zeitgeber ist (Pilorz, Helfrich-Förster and Oster, 2018).

Über den Nucleus suprachiasmaticus (SCN) als „Master Clock“ werden die inneren Uhren mit der 24- Stunden-Periodik der Außenwelt synchronisiert.

Spezialisierte Ganglienzellen in der Retina enthalten den Photorezeptor Melanopsin, welcher auf diffuses Licht reagiert und über glutamaterge Synapsen des retinohypothalamischen Traktes (RHT) Informationen über die Lichtverhältnisse an den SCN überträgt. Dieser synchronisiert die unterschiedlichen endogenen Oszillatoren über die Expression molekularer Zeitgeber. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

Neben hunderten weiteren Molekülen konnte im letzten Jahrzehnt ein Modell entwickelt werden mit den Transkriptionsfaktoren BMAL1 (*brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1*) und CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) und die Per- (*Period*) und Cry- (*Cytochrome*) Gene, sowie Ror (*retinoid orphan receptor*) und Rev-erb (*reverse erythroblastoma*) als zentrale Elemente der zirkadianen Rückkopplungsschleife auf molekularer Ebene identifiziert wurden (Abb. 1) (Zhang and Kay, 2010).

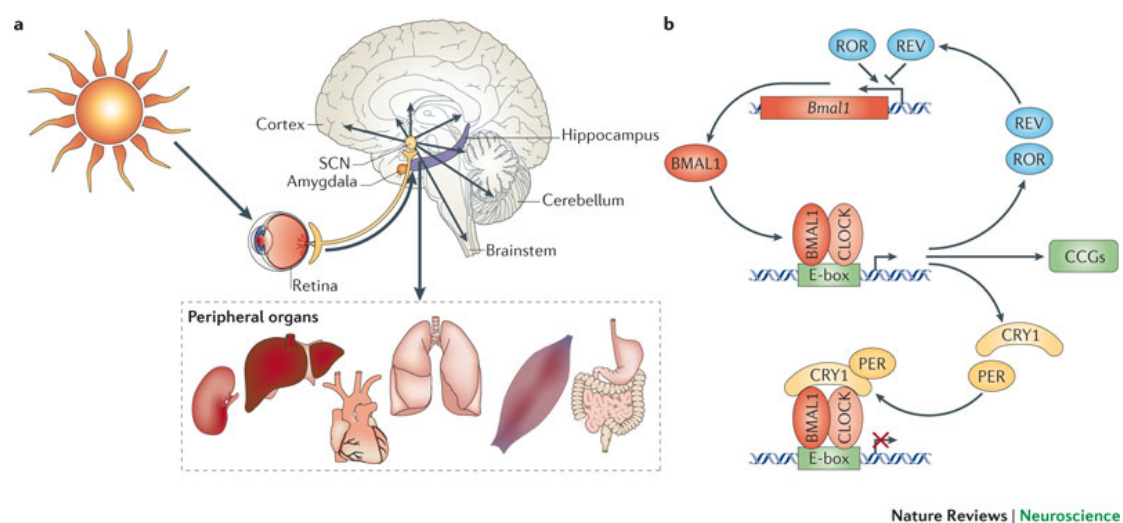


Abbildung 1 - Zirkadiane Regulation durch den SCN und Expression der CCGs (circadian-clock-controlled genes) auf molekularer Ebene (Kondratova and Kondratov, 2012)

Der positive Arm des Feedback-Mechanismus (rot) beinhaltet die BMAL1 und CLOCK-Heterodimere, die die Transkription von PER, CRY, ROR und REV-ERB aktivieren. Der negative Arm des Feedback-Mechanismus (gelb) besteht aus der Phosphorylierung der PER Proteine durch Kaseinkinase 1. PER und CRY Proteine hemmen ihre eigene Transkription über die Hemmung der Aktivität des BMAL1/CLOCK Heterodimers. REV-ERB hemmt die Transkription von BMAL1 und ROR aktiviert die Transkription als stabilisierender Faktor (blau) (Piorz, Helfrich-Förster and Oster, 2018)

Ohne diese Master Clock verschieben sich die Perioden der unterschiedlichen inneren Uhren. So pendelt sich zwar der Schlaf-Wach-Rhythmus in Isolationsstudien auf eine individuelle Periodendauer ein, andere vegetative Funktionen werden von dieser jedoch völlig entkoppelt. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

1.3 Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe pathogene Mikroorganismen abzuwehren und fehlgebildete Zellen zu erkennen und zu zerstören. Die „First-Line-Defense“ besteht aus natürlichen Barrieren wie Haut und Schleimhäuten, Mukus bzw. Flüssigkeiten mit darin enthaltenen Antikörpern und für Pathogene schlecht verträglichen pH-Werten, sowie einer schützenden Hautflora. Überwindet ein Mikroorganismus diese Barrieren, greift die „Second-Line-Defense“ der zellulären und humoralen Immunantwort. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Choukèr, 2012)

Es gibt eine angeborene und eine adaptive Immunabwehr. Die beiden Systeme induzieren sich gegenseitig und sind so untereinander verbunden. (Schmetzer, 2009; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Choukèr, 2012; Parija, 2012)

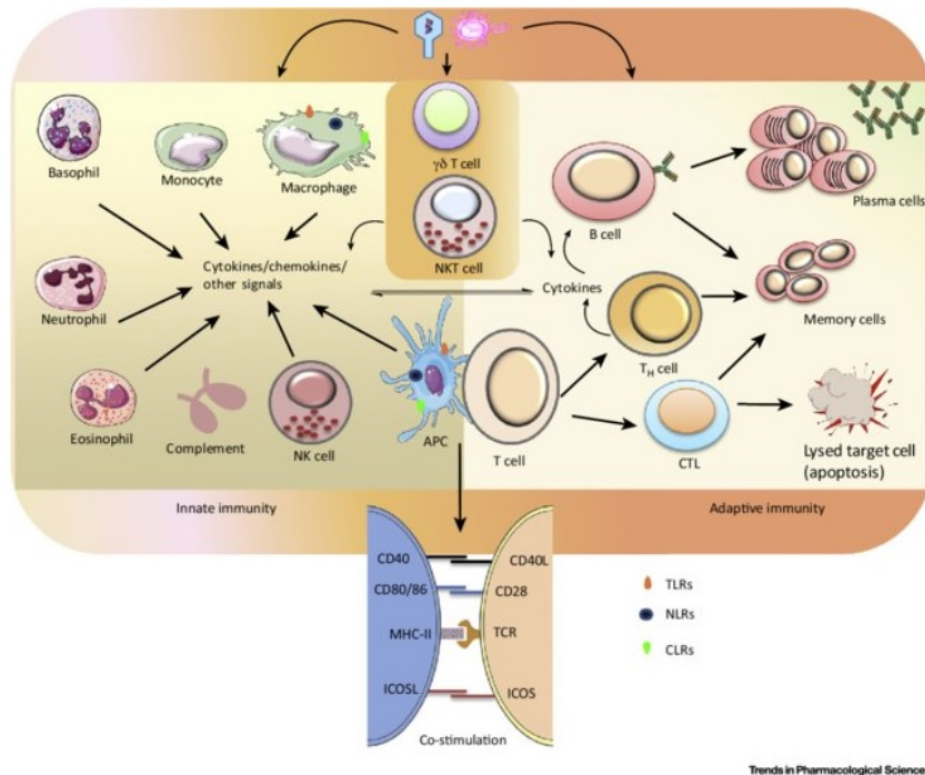


Abbildung 2 - Überblick über das Immunsystem (Bonam *et al.*, 2017)

1.3.1 Delayed-Type-Hypersensitivity

Die Delayed-Type-Hypersensitivity (DTH) ist die verzögerte Immunantwort auf Pathogene und wird in erster Linie zellulär vermittelt. Im Gegensatz zu den durch zirkulierende Antikörper vermittelten Sofortreaktionen (Immunreaktion Typ I, II und III) setzt die verzögerte Typ IV Immunantwort erst einige Stunden bis Tage nach Erstkontakt mit einem Antigen ein. Während der DTH werden große Mengen unspezifischer Immunzellen aktiviert. (Parija, 2012)

Die DTH konnte durch DTH-Hauttests objektiviert werden, mittlerweile gibt es jedoch in-vitro-Methoden, bei denen man an Vollblutproben spezifischer die Effekte unterschiedlicher Antigene und Hormone untersuchen kann, ohne Probanden möglicherweise sensibilisierenden Substanzen auszusetzen (Feuerecker *et al.*, 2012; Van Walleghem *et al.*, 2017).

1.3.2 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität ist eine unspezifische Reaktion auf Pathogene, die durch neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (polymorphkernige Leukozyten), Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelt wird.

Polymorphkernige Leukozyten (*PMN*) bilden den größten Anteil der Leukozyten, ca. 50% der PMN haften an Gefäßwänden und können unter Adrenalin- und Cortisoleinwirkung stimuliert und mobilisiert werden. Sie sind in der Lage, durch Phagozytose Pathogene ins Zellinnere aufzunehmen und dort zu verdauen. Sie können Enzyme wie Lysozym, Phosphatasen, Proteasen und Kollagenasen freisetzen, um Mikroorganismen zu zerstören und die Migration von Immunzellen ins Gewebe zu erleichtern (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010).

Neutrophile Granulozyten haben die Fähigkeit, unter hohem Sauerstoffverbrauch durch die NADPH-abhängige Oxidase Sauerstoffradikale, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale zu bilden, welche stark toxisch auf bakterielle Membranen wirken. Dieser Prozess wird auch als „Oxidative Burst“ bezeichnet. (Wilson *et al.*, 1986)

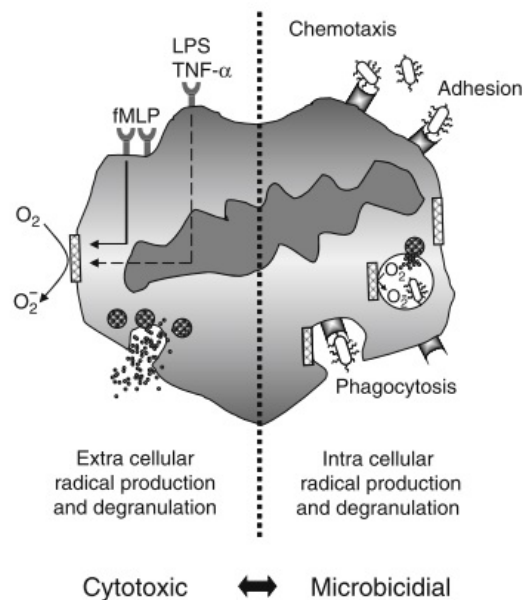


Abbildung 3 - Degranulation und Phagozytose (Choukèr, 2012)

Monozyten können aktiv ins Gewebe einwandern und sich zu Makrophagen, den sogenannten „Fresszellen“ differenzieren. Sie werden durch Zytokine angelockt und stimuliert, phagozytieren Bakterien und zerlegen sie in Lysosomen in ihre Bestandteile.

Dendritische Zellen befinden sich vor allem in Geweben der Körperoberflächen, z.B. in der Haut als Langerhans-Zellen, wo sie fremde Antigene über ihre langen Ausläufer sehr effektiv aufnehmen um sie nach Einwanderung in lokale Lymphknoten zu präsentieren.

Als Antigen-präsentierende Zellen (*APCs*) transportieren Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen aufgenommene Zellbestandteile zerstörter Mikroorganismen zum Golgi-Apparat, wo sie an MHC-II-Moleküle binden, zur Zelloberfläche transportiert werden und dort unter anderem T-Zellen präsentiert werden um diese zu aktivieren. (Schmetzer, 2009; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

NK-Zellen sind Lymphozyten, die sich von den T- und B-Lymphozyten insofern unterscheiden, dass sie infizierte Zellen und Tumorzellen zerstören können, ohne vorher aktiviert zu werden (Parija, 2012). Sie spielen außerdem eine Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Blanca *et al.*, 2001). NK-Zellen sind in der Lage ohne MHC-Expression der Zielzellen zytotoxisch und apoptotisch wirksam zu werden, so wird ganz im Gegenteil davon ausgegangen, dass Zellen zerstört werden, die nicht in der Lage sind MHC-I-Antigene auf der Zelloberfläche zu exprimieren und dadurch zu signalisieren, nicht körperfremd zu sein (Orange and Ballas, 2006; Parija, 2012).

Über die Sekretion verschiedener Zytokine und Induktion von B-Zellen über Oberflächenmarker bilden NK-Zellen eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr (Blanca *et al.*, 2001; Orange and Ballas, 2006).

1.3.3 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (*TLR*) sind von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimierte Rezeptoren, die auf bestimmte Bakterienbestandteile reagieren. Sie bilden einen wichtigen Bestandteil der Pathogenerkennung der angeborenen Immunität. Der Name leitet sich von der Fliege *Drosophila* ab, bei der als erstes ähnliche Rezeptoren entdeckt wurden.

Toll-like-Rezeptor 2 (*TLR-2*) bindet an Peptidoglykane von Bakterienoberflächen und aktiviert dadurch die zelluläre Immunantwort. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

1.3.4 Adaptive Immunität

Die adaptive Immunität ist eine pathogenspezifische Reaktion, die nach Antigenpräsentation Gedächtniszellen hervorbringt, um bei erneutem Eindringen bereits bekannter Erreger diese sofort zu identifizieren und sie über Aktivierung zellulärer und humoraler Immunantworten unschädlich zu machen. Die Zellen der adaptiven Immunabwehr werden in B- und T-Lymphozyten unterteilt. Um immunologisch wirksam zu werden, müssen sowohl B- als auch T-Lymphozyten zuerst aktiviert werden. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Choukèr, 2012)

Alle T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren. Diese werden von naiven T-Zellen im Thymus exprimiert und besitzen einen variablen Anteil, der über genetisches „rearrangement“ entsteht. Nach Prüfung im Thymus, dass die T-Zell-Rezeptoren zu keinen körpereigenen Antigenen passen, zirkulieren sie in Blut und Lymphgewebe. Werden die T-Zell-Rezeptoren durch passende Antigene von APCs aktiviert, differenzieren sich die T-Lymphozyten zu reifen T-Zellen. Diese lassen sich in CD4-positive T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen unterteilt. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

T-Helferzellen wirken über die Sekretion von Zytokinen und haben keine direkte zytotoxische Funktion. Sie stimulieren, nach ihrer Aktivierung durch APCs, CD8-positive T-Zellen sich zu aktivierten zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen zu differenzieren. Außerdem aktivieren sie die unspezifischen Zellen der angeborenen Immunität. (Smith *et al.*, 2004; Parija, 2012)

Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage nach Co-Stimulation durch APCs und T-Helfer-Zellen über MHC-Moleküle und Interleukine insbesondere virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu erkennen und sie durch Perforin direkt zu zerstören oder über CD95-Liganden und Granzym Apoptose zu induzieren (Munroe, 2009; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010).

B-Zellen sind Lymphozyten, die im Knochenmark reifen bevor sie in Milz und Lymphknoten wandern. Ähnlich den T-Zell-Rezeptoren tragen sie auf ihrer Oberfläche B-Zell-Rezeptoren, die jedoch membranständige IgM- und IgD-Antikörper sind. B-Zellen können sowohl T-Zell-unabhängig, als auch T-Zell-abhängig aktiviert werden.

Bindet ein Antigen direkt an einen passenden B-Zell-Rezeptor, wird der Rezeptor-Antigen-Komplex in die Zelle eingeschleust, die B-Zelle aktiviert und sie beginnt IgM-Antikörper zu sezernieren. Das eingeschleuste Antigen wird in Lysosomen zerlegt und über MHC-II-Moleküle wieder an der Zelloberfläche präsentiert. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

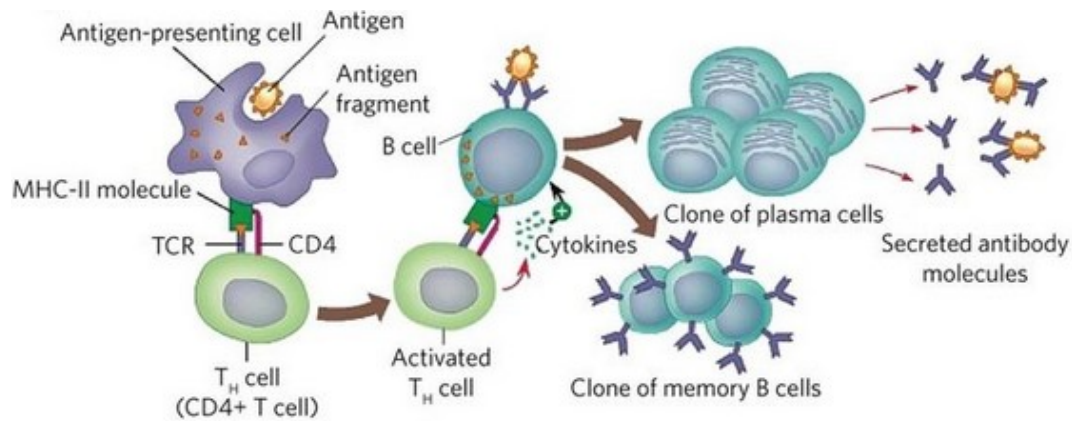


Abbildung 4 – Aktivierung der adaptiven Immunantwort (Wolfert and Boons, 2013)

Bindet eine T-Helferzelle an den Komplex, kann diese über Zytokine die B-Zelle stimulieren und die Immunantwort verstärken, indem die B-Zellen vermehrt zu Plasmazellen proliferieren, welche in großen Mengen IgM- und IgG-Antikörper sezernieren, und zytotoxische T-Zellen aktiviert werden. In diesem Prozess entstehen auch Gedächtniszellen, die Monate bis Jahre alt werden können und bei erneuten Antigenkontakt diese schnell ohne Co-Stimulation durch andere Zellen neutralisieren können. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

1.3.5 MHC-System

Das MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-System besteht aus Oberflächenmolekülen, die der Erkennung von Antigenen durch Leukozyten dienen. Der Genkomplex, auf dem die MHC-Moleküle kodiert sind, befindet sich auf dem kurzem Arm des Chromosom 6 und wird als HLA (*Humanes Leukozyten Antigen*)-Komplex bezeichnet.

MHC-Moleküle lassen sich in unterschiedliche Klassen einteilen. Moleküle der MHC Klasse I befinden sich auf allen Zellen des menschlichen Körpers, die einen Nucleus besitzen. Sie besitzen eine hochvariable pleomorphe Region, welche für die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden von großer Bedeutung ist. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

Man geht zudem davon aus, dass durch MHC-I-Moleküle NK-Zellen daran gehindert werden autologe Zellen anzugreifen. (Orange and Ballas, 2006)

Die konstante Region der MHC-I-Moleküle bindet an CD8-Rezeptoren von zytotoxischen T-

Zellen und aktiviert diese. MHC-I-Moleküle sind somit in zelluläre Immunreaktionen involviert und spielen eine große Rolle bei Transplantatabstoßungen. (Parija, 2012)

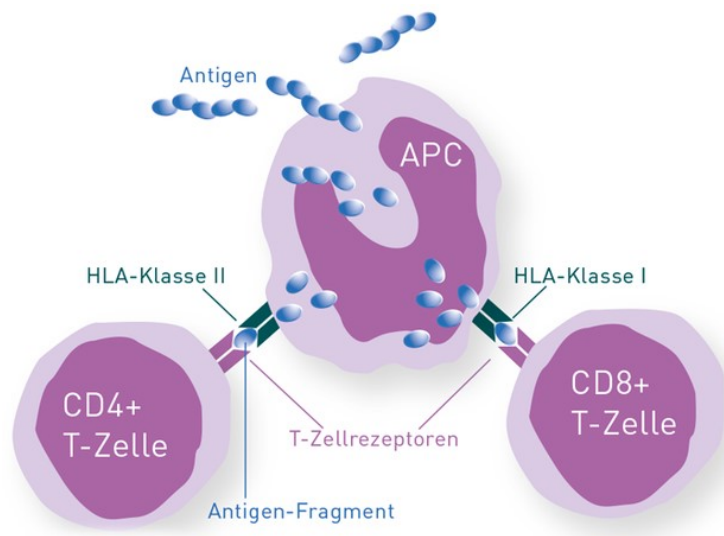


Abbildung 5 – Interaktion über HLA-Moleküle zwischen APC und T-Zellen (IMD Berlin, no date a)

Moleküle der Klasse II werden vor allem auf APCs exprimiert. Sie dienen dazu, vorher aufgenommene Proteine, die in Lysosomen zerkleinert wurden und im Endoplasmatischen Retikulum an MHC-II-Moleküle gebunden wurden, auf der Zelloberfläche CD4-positiven Zellen zu präsentieren. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

Zu den MHC-II-Molekülen gehört unter anderem HLA-DR. Eine niedrige HLA-DR-Expression auf Monozyten wurde in unterschiedlichen Studien mit hohen Plasmaspiegeln anti-inflammatorischer Zytokine sowie Cortisol assoziiert, außerdem wurde über niedrige HLA-DR Expression bei Sepsis, starken Verletzungen, Pankreatitiden und starken Schädel-Hirn-Traumen berichtet und mit einer Immunsuppression assoziiert (Satoh *et al.*, 2002; Caille *et al.*, 2004; Venet *et al.*, 2007; Winkler *et al.*, 2017).

Es gibt Ansätze, HLA-DR als Marker für Immunfunktionen und Verläufe bei septischen Zuständen herzunehmen, da es mit anderen Antigen-präsentierenden Molekülen assoziiert ist und die Messung für den klinischen Alltag geeignet ist. (Lukaszewicz, Faivre and Payen, 2010).

1.3.6 Cluster of Differentiation

Das Cluster of Differentiation (CD) ist eine international gültige Nomenklatur für Membranproteine von Immunzellen. Zelltypen und Aktivierungszustände lassen sich über die Expression verschiedener CD-Moleküle differenzieren. Über diese spezialisierten Membranproteine, Glykoproteine und Glykolipide, sind Immunzellen in der Lage, mit der Umgebung zu interagieren und ihre spezifischen Funktionen auszuführen. CD-Moleküle können durch Bindung ihrer Liganden unterschiedlichste intrazelluläre Effekte zum Beispiel als Rezeptoren oder Enzyme haben. Bisher sind hunderte unterschiedlicher CD-Oberflächenmerkmale entdeckt worden. (Zola, 2006; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

CD4/CD8

In vorherigen Abschnitten wurde schon die Identifizierung von CD4-positiven T-Zellen als T-Helferzellen und CD8-positiven Zellen als zytotoxische T-Zellen angesprochen, die unter Bindung passender MHC-Moleküle an die CD4- bzw CD8-Rezeptoren zu aktivierten T-Zellen proliferieren. Neben zytotoxischen T-Zellen findet man CD8 auch auf regulatorischen T-Zellen. (Parija, 2012; Bruno *et al.*, 2017)

CD14/CD16

Spezielle Lipopolysaccharide (LPS) bakterieller Oberflächen binden mit hoher Affinität an CD14-Rezeptoren, welche dann TLR-4 aktivieren und damit Entzündungsreaktionen induzieren. CD14 befindet sich auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen.

Man kann zwischen CD16-negativen und CD16-positiven Monozyten differenzieren. Man geht davon aus, dass CD16 ein Marker für ausgereifte Monozyten ist, da sie mehr proinflammatorische Merkmale vorweisen wie deutlich höhere Expression von HLA-DR, wodurch sie bessere Eigenschaften zur Antigenpräsentation aufweisen. Dagegen konnte nur ein geringer Anteil der CD16-negativen Monozyten starke HLA-DR-Expressionen vorweisen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich aus stark CD14-positiven Monozyten CD16-positive Makrophagen entwickeln, deren CD14-Expression gering ist.

CD16 wird ebenfalls von NK-Zellen, Dendritischen Zellen und einigen Granulozyten exprimiert. (Ziegler-Heitbrock, 2007; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Choukèr, 2012; Naeim *et al.*, 2018)

CD28

CD28 befindet sich auf 80% der CD4-positiven und 50% der CD8-positiven Zellen. Es wirkt co-stimulatorisch zu T-Zell-Rezeptoren und bindet unter anderen CD80 und CD86 als Liganden. Diese binden mit einer etwas höheren Affinität an CD152 (auch als CTLA-4 beschrieben), welches als Gegenspieler zu CD28 die T-Zell-Funktionen inhibiert. Da es außerdem auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, scheint es ein wichtiger Bestandteil der T-Zell-Homöostase zu sein. Unter Einfluss von IL-2 (*Interleukin 2*) spielt CD28 eine Rolle bei der Ausreifung naiver T-Lymphozyten zu regulatorischen T-Zellen im Thymus. (Hoff *et al.*, 2009; Esensten *et al.*, 2016)

Der immunsupprimierende Effekt von CD28-Antagonisten wird in der Behandlung von Rheumatoider Arthritis und nach Transplantationen genutzt, im Gegensatz dazu könnten CD28-Agonisten einen Ansatz in der Therapie viraler Infektionen und Tumore bilden.

Neben T-Zellen wird CD28 auch durch aktivierte Plasmazellen, Granulozyten und Knochenmarkstammzellen exprimiert, bei denen die Funktion jedoch noch nicht geklärt ist. (Guo *et al.*, 2008; Esensten *et al.*, 2016)

CD40

CD40 wird durch APCs, B- und T-Lymphozyten exprimiert. Es gehört zu der Familie der TNF (*Tumor Nekrose Faktor*)-Rezeptoren. In Interaktion mit dem Liganden CD154 (auch CD40L), welcher vor allem auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ist es an der Co-Stimulation adaptiver Immunantworten und der Bildung von Gedächtniszellen beteiligt. Außerdem wird CD154 neben anderen kontaktabhängigen co-stimulatorischen Faktoren durch NK-Zellen exprimiert.

Die Aktivierung von CD40 auf Monozyten und Makrophagen führt zu einer Reihe proinflammatorischer Prozesse. So werden vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF (*Tumor Nekrose Faktor alpha*) produziert und die Expression von MHC-II-Molekülen sowie CD80 und CD86 stimuliert. Außerdem wird durch Aktivierung von CD40 bei Monozyten die Apoptose verhindert. Unter Einfluss von IL-4 und IL-10 wird die proinflammatorische Wirkung von CD40 gehemmt. (Baccam *et al.*, 2003; Munroe, 2009; Suttles and Stout, 2009)

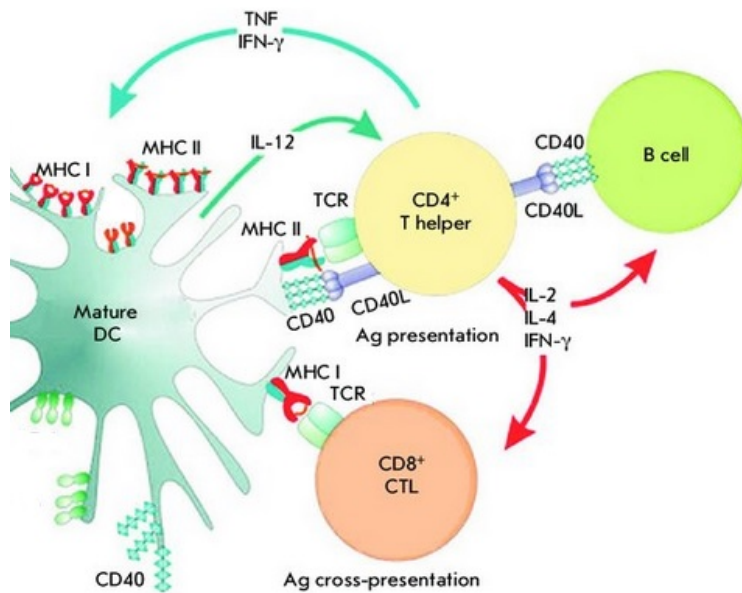


Abbildung 6- Opsonierung und Co-Stimulation durch CD40; (angepasst von Markov et al., 2016)

CD69

CD69 wird bei Aktivierung der meisten Leukozyten innerhalb von 1-2 Stunden exprimiert und kann somit als früher Aktivierungsmarker verwendet werden. Die Funktion von CD69 ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint es eine Rolle in der Regulation der Zytokinausschüttung zu spielen. So wurde bei genetischer Auslöschung des CD69-Gens festgestellt, dass die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ (*Interferon gamma*) und TNF deutlich gestiegen ist. Man geht davon aus, dass CD69 eine wichtige Rolle in der Ausreifung regulatorischer T-Zellen spielt. CD69 hat Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF- κ B (*nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B-cells*), welcher wichtig für die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen ist und durch diverse Zytokine und Membranproteine beeinflusst wird (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017).

Im Hinblick auf die CD69 Expression bei NK-Zellen wurde eine Induktion durch IL-2 ermittelt. Das CD69-Antigen ist wichtig für die Regulation zytotoxischer Zellfunktionen und TNF-Produktion, sowie der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen. Es scheint keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Identifikation der Zielzellen zu haben. (Choukèr, 2012; Radulovic et al., 2012; Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017)

CD80

CD80 spielt in der Regulation der T-Zell-Aktivität eine Rolle als CD28- und CD152-Ligand.

CD80 wird als co-stimulatorisches Molekül gemeinsam mit CD86 von APCs exprimiert, welche große Ähnlichkeiten aufweisen, wobei CD80 die größere Affinität zu den Liganden vorweist.

Bindet CD28 an CD80 kommt es zu einer maximalen Stimulation der APCs, über NF- κ B wird die Produktion vor allem von IL-6 induziert. Zwar wird CD80 vor allem durch APCs exprimiert, jedoch wurde auch eine Expression durch aktivierte T-Zellen beobachtet.

Die basale Stimulation durch CD80 scheint eine wichtige Rolle in der Vermeidung von Autoimmunität zu spielen, indem es die Aktivität regulatorischer T-Zellen aufrecht erhält. Ein Anstieg der CD80-Expression konnte im Zusammenhang mit Sepsis und septischem Schock gemessen werden. (Guo *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2009; Esensten *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2017)

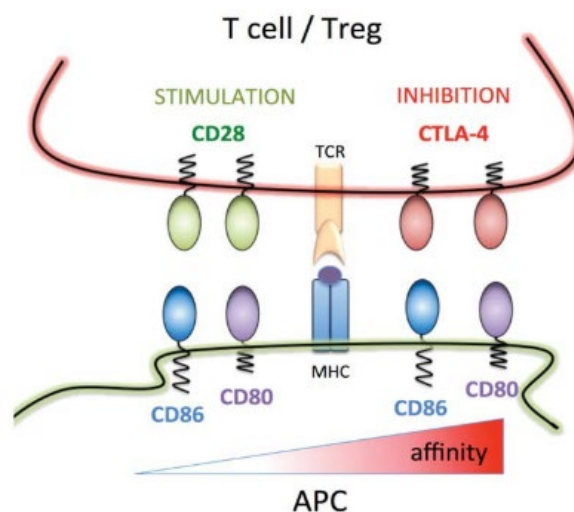


Abbildung 7 – Affinitäten der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zu den Liganden CD28 und CD152 (CTLA-4) (Verma *et al.*, 2017)

CD152

Als Gegenspieler zu CD28 wird CD152 ebenso vor allem auf T-Lymphozyten exprimiert. Während es auf regulatorischen T-Zellen dauerhaft exprimiert ist, wird die Expression bei anderen T-Zellen erst durch Aktivierung induziert. Durch Internalisation des Liganden-Komplexes

findet sowohl ein Recycling, als auch eine Herunterregulation der CD28-stimulierenden Liganden statt. Sowohl CD28 als auch CD152 regulieren die Auswanderung von T- und B-Zellen aus dem Thymus. Während CD28 co-stimulatorisch bei der Aktivierung von T-Zellen wirkt und der kompetitive bzw. opponierende Effekt durch CD152 als erwiesen gilt, sind noch nicht alle in-vivo-Effekte der beiden Rezeptoren verstanden. So konnten zum Beispiel bei mehreren PatientInnen mit CD152-Mutation T-Lymphopenien festgestellt werden. (Guo *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2009; Esensten *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2017)

1.3.7 Zytokine

Zytokine sind von Immun-und Gewebezellen freigesetzte Moleküle, die über die entsprechenden Zytokinrezeptoren wichtige Entzündungsreaktionen regulieren.

Die Effekte variieren je nach Zytokin. So können zum Beispiel Immunzellen zur Proliferation stimuliert bzw. gehemmt werden, Zellen durch Chemotaxis angelockt werden und die Migration ins Gewebe erleichtern indem die Durchlässigkeit erhöht wird, oder Fieber ausgelöst werden. Die verschiedenen Zytokine lassen sich in Untergruppen einteilen, dazu gehören unter anderen die Interferone, Tumor-Nekrose-Faktoren (*TNF*) und Interleukine (*IL*). (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

Tumor-Nekrose-Faktor

TNF wird neben NK-Zellen in erster Linie durch Makrophagen gebildet und wird vor allem bei bakteriellen Infektionen vermehrt ausgeschüttet. TNF wirkt zytotoxisch, indem es über TNF-Rezeptor 1 (*TNFR1*) direkt und TNF-Rezeptor 2 (*TNFR2*) indirekt durch autokrine und parakrine Aktivierung von *TNFR1* apoptotisch wirkt. So konnte bei bakteriellen Infektionen eine Regredienz von Tumorzellen nachgewiesen werden, dieser Effekt wurde durch IFN- γ verstärkt. Aufgrund der Toxizität schon geringer Mengen ist die therapeutische Anwendung jedoch begrenzt.

TNF stimuliert die Sekretion von Interleukin 1 und 6 und hat dadurch pyrogene Effekte. Sowohl die Aktivität neutrophiler Granulozyten, als auch die zytotoxischen Eigenschaften von Makrophagen und NK-Zellen wird durch TNF stimuliert, so spielt es eine wichtige Rolle in der Immunmodulation. (Idriss and Naismith, 2000; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

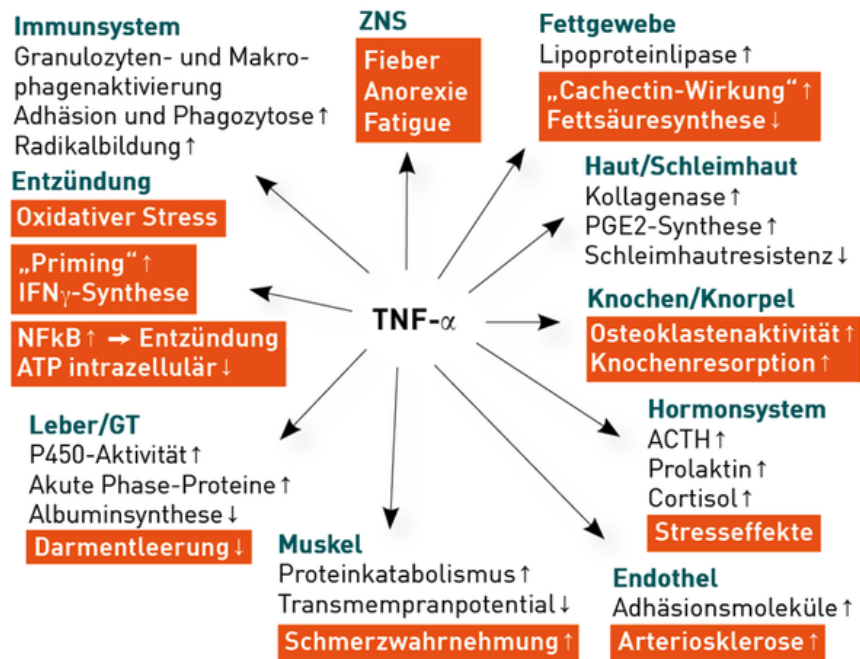


Abbildung 8 – Lokale und systemische Effekte von TNF (IMD Berlin, no date b)

TNF ist auch an anderen physiologischen Prozessen beteiligt, so scheint es in der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus eine Rolle zu spielen. Man konnte nachts höhere TNF-Spiegel nachweisen, sowie eine schlaffördernde Wirkung bei exogener Zufuhr (Idriss and Naismith, 2000). Außerdem konnte ein hemmender Effekt von Glucocorticoiden auf die TNF- Sekretion festgestellt werden (Rijk *et al.*, 1997).

Interferon gamma

IFN- γ wird im Gegensatz zu Interferon alpha und beta, welche von fast jeder Körperzelle durch Induktion viraler RNA freigesetzt werden können, bei Entzündungsreaktionen von aktivierten T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen ausgeschüttet. Auch in vitro konnte eine Stimulation der IFN- γ -Freisetzung durch virale oder bakterielle Antigene gemessen werden, während Pilzantigene keinen Effekt zeigten.

Interferone stimulieren die Expression von MHC-I und -II Molekülen, aktivieren antivirale Zellen wie NK-Zellen und Makrophagen und hemmen die Virusreplikation direkt.

(Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Feurecker *et al.*, 2012; Parija, 2012)

Interleukin 2

Die Produktion von Interleukin 2 erfolgt in erster Linie durch aktivierte T-Helferzellen. Es wirkt als starker T-Zell Wachstumsfaktor autokrin stimulierend auf die IL-2-Rezeptor-Expression und stimulierend auf aktivierte zytotoxische T-Zellen. Fällt das Antigen als Stimulus der T-Helferzelle weg, zerfallen die IL-2-Rezeptoren und die Proliferation der aktivierten T-Zellen wird unterbrochen. Zusätzlich kann IL-2 die Sekretion von pro-inflammatorischem IL-1 und IFN- γ stimulieren sowie das Wachstum von B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten.

Bakterielle Enterotoxine wirken unter anderen überstimulierend auf IL-2 und führen dadurch zum klinischen Bild von Lebensmittelvergiftungen. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

Interleukin 4

Interleukin 4 wird von Makrophagen und T-Helfer-Zellen freigesetzt. Es stimuliert B-Zellen zu Plasmazellen heranzureifen und fördert damit die humorale Immunabwehr. Außerdem wird die Expression von MHC-II-Molekülen stimuliert und damit die Fähigkeit der Antigenpräsentation von APCs. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Parija, 2012)

Interleukin 6

Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin 6 stimuliert unter anderem die Sekretion hepatischer Akute Phase Proteine, die Aktivität von B-Zellen, es wirkt pyrogen und reguliert T-Zell-Aktivitäten. In der Behandlung von Autoimmunerkrankungen zeigte sich eine Blockade von IL-6-Rezeptoren effektiv. Bei schweren Infektionen und septischen Verläufen können erhöhte IL-6-Spiegel gemessen werden. (Rose-John, 2018)

Interleukin 10

Die Funktion von Interleukin 10 ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. IL-10 wird von den meisten Immunzellen produziert, darunter APCs, T- und B-Zellen, sowie NK-Zellen.

In erster Linie wirkt es inhibitorisch auf Immunantworten, so hemmt es die Freisetzung von IFN- γ . Die Expression von MHC-II-Molekülen in Makrophagen, sowie die Zytokinproduktion LPS-aktivierter Makrophagen wird durch IL-10 gehemmt.

Es wurde jedoch gezeigt, dass IL-10 in Kombination mit IL-2 und IL-4 in vitro zytotoxische T-Zellen stimuliert. Ohne diese Co-Stimulation bzw. in Anwesenheit Dendritischer Zellen gibt

es Hinweise auf die Reduktion von Graft-versus-Host-Reaktionen. Auch bei anderen Immunzellen, zum Beispiel T-Helfer- und NK-Zellen, konnten unter Co-Stimulation verschiedener Zytokine widersprüchliche Effekte gezeigt werden.

Im Hinblick auf B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation und Differenzierung durch IL-10 stimuliert werden und die Apoptose verhindert wird. (Parija, 2012; Mannino *et al.*, 2015)

1.4 Antigene

1.4.1 Heat-killed *Listeria Monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein Gram-positives, opportunistisches Pathogen, welches Listeriose, Meningitis und Sepsis auslösen kann und über Nahrung aufgenommen wird. Heat-killed *Listeria Monocytogenes* (HKLM) wirkt über TLRs, vor allem über TLR-2, stark immunstimulierend und induziert die Sekretion einer Reihe proinflammatorischer Zytokine (Shihab *et al.*, 2015)

1.4.2 *Candida albicans*

Candida albicans ist ein Hefepilz, welcher auf Schleimhäuten weit verbreitet ist. Der Pilz kann sich als opportunistisches Pathogen bei immunsupprimierten PatientInnen im Sinne einer Candidose ausbreiten und bis zu septischen Verläufen führen. *C. albicans* besitzt drei verschiedene Typen an Zellbestandteilen (Chitin, Glucan, Mannan), welche durch Zellen der angeborenen Immunität über unterschiedliche Wege erkannt werden. Darunter auch TLR-2, wodurch eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine vermittelt wird. Phagozytierte Zellbestandteile werden durch MHC-Moleküle präsentiert und aktivieren die adaptierte Immunantwort. Es wurde eine verstärkte Neigung zu *Candida*-Infektionen bei verminderten Mengen CD4-positiven-Zellen beobachtet werden, wie sie zum Beispiel bei HIV-Erkrankten auftritt. (Ashman, 2008; Tong and Tang, 2017)

1.5 Hypophysäre Regelkreisläufe der Hormone

Über den Hypothalamus und die Hypophyse laufen endokrine Regelkreisläufe, über die sowohl Stresshormone als auch Sexual-, Wachstums- und Stoffwechselformone ausgeschüttet

und reguliert werden. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und die Hypothalamus-Hypophysen-Thyroidea-Achse folgen alle dem selben hierarchischen Prinzip, bei dem über Liberine, sogenannte „Releasing-hormone“, und Statine des Hypothalamus die Produktion und Freisetzung stimulierender Hormone des Hypophysenvorderlappens (*Adenohypophyse*) induziert bzw. gehemmt werden, welche dann über den Blutkreislauf das spezifische Organgewebe erreichen und dort die Freisetzung der Effektorhormone induzieren (Neumann *et al.*, 2019). Durch negative Rückkopplung, Einflüsse verschiedener Stoffwechselfparameter und Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Regelkreisen werden die Hormonspiegel im Gleichgewicht gehalten und dem jeweiligen Bedarf des Metabolismus angepasst (*Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31., 2010).

1.6 Hormone der Nebenniere

Die Glandula Suprarenalis ist eine paarige Hormondrüse der Säugetiere. Im Nebennierenmark werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin gebildet, in der Nebennierenrinde (*NNR*) die Steroide. Die Steroide lassen sich in drei Gruppen unterteilen: 1.) Mineralcortikoide, die den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt regulieren, 2.) Glucocorticoide, die den Energiehaushalt regulieren und 3.) Androgene wie Testosteron und Androstendion, die zusätzlich in den Gonaden produziert werden und die Reproduktion regulieren. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

1.6.1 Glucocorticoide

Glucocorticoide (GC) sind Hormone, die in der Zona fasciculata der *NNR* gebildet werden. Der Stoffwechsel wird insofern stimuliert, dass Energie bereitgestellt wird. Der Blutzucker steigt, die Lipolyse und Gluconeogenese werden stimuliert und der Herzmuskel wird für Adrenalin und Noradrenalin sensibilisiert.

Die Hormonspiegel werden über die HPA-Achse reguliert. Die Produktion und Sekretion der Glucocorticoide in der *NNR* wird über das von der Hypophyse ausgeschüttete Hormon Corticotropin (*ACTH – Adrenocorticotropes Hormon*) induziert, dessen Sekretion wiederum vom hypothalamischen Peptid Corticoliberin (*CRH – Corticotropin-Releasing-Hormon*) stimuliert wird. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

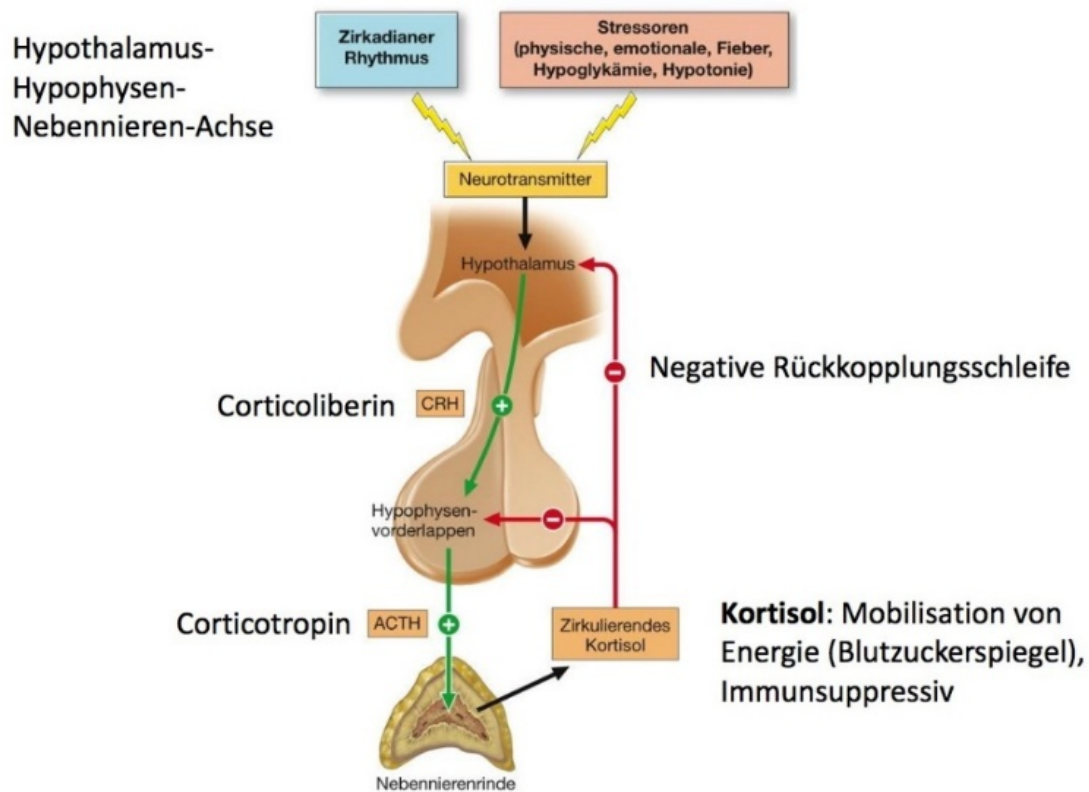


Abbildung 9 - HPA-Achse (Repetico Lernkarten, no date)

Der wichtigste Vertreter der Glucocorticoide ist das Cortisol. Es ist bekannt, dass der Cortisolspiegel zirkadianen Schwankungen unterliegt, die sowohl direkt über die endokrine Aktivität der HPA-Achse, als auch über Sensitivisierung der NNR auf ACTH über das autonome Nervensystem, also direkt über den SCN gesteuert werden, und außerdem noch über periphere adrenerge Mechanismen. Die Glucocorticoide selbst spielen wiederum eine wichtige Rolle in der zirkadianen Synchronisation anderer Organe und metabolischer Funktionen. (Neumann *et al.*, 2019)

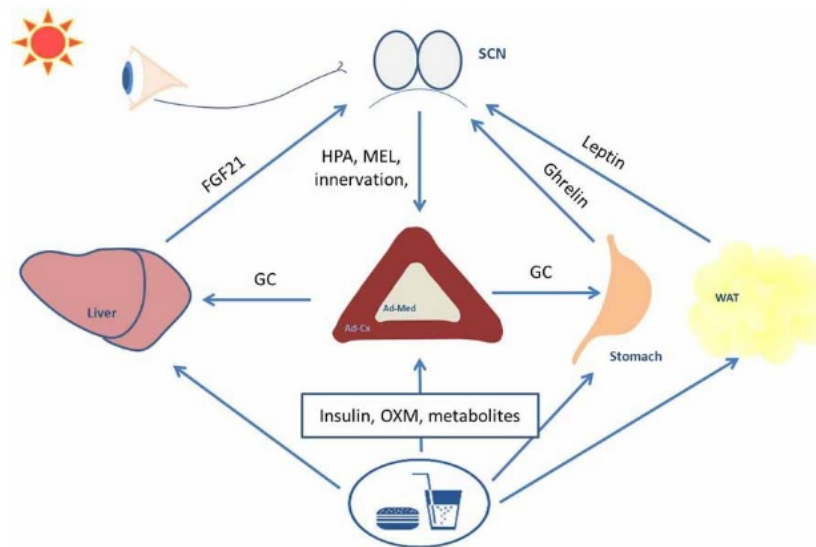


Abbildung 10 – Endokrine Regulation der zirkadianen Physiologie (Tsang et al., 2015)

Es ist besonders der morgendliche Peak des Cortisolspiegels zu nennen. Im Laufe des Tages nimmt der Hormonspiegel kontinuierlich ab und erreicht seinen Nadir gegen Mitternacht, woraufhin es ab 2:00 – 3:00 Uhr wieder zu einem Anstieg bis ungefähr 8:30 Uhr kommt (Chan and Debono, 2010).

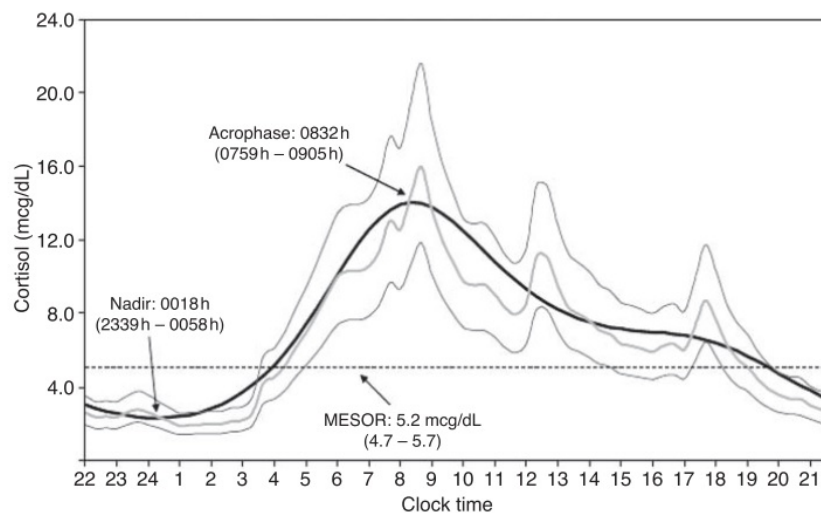


Abbildung 11 – Zirkadianität des Cortisolspiegels (Chan and Debono, 2010a)

Über die Glucocorticoidrezeptoren entfalten sich die systemischen Effekte. Die Auswirkungen auf das Immunsystem sind vielseitig. So findet primär eine Immunsuppression über die Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und IL-2 statt. Es gibt jedoch aktuelle Studien, in denen eine dosisabhängige Stimulation einiger Immunparameter

durch Glucocortikoide festgestellt wurde. Außerdem scheint die Produktion zirkulierender Antikörper durch vermehrte Freisetzung von IL-4 und IL-10 unter Glucocorticoiden stimuliert zu werden. (Yaeger *et al.*, 2008; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Choukèr, 2012)

1.6.2 Adrenalin/ Noradrenalin

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin werden im Nebennierenmark produziert. Sie wirken sowohl endokrin, als auch als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Durch die Sekretion von Adrenalin werden adrenerge alpha- und beta-Rezeptoren aktiviert, die Effekte variieren je nach Gewebe und Rezeptor, ähneln in ihren systemischen Funktionen denen der Glucocorticoide, wobei die Wirkungen jedoch wesentlich schneller einsetzen. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010)

In der Literatur sind sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte von Katecholaminen beschrieben. So heißt es bei Elenkov *et al.*, 2000, dass Katecholamine die zelluläre Immunität zu hemmen scheinen, während die humorale Immunität gefördert wird. Es wird eine Stimulation der Zytokine IL-1, IL-8, IL-10 beschrieben, sowie eine Hemmung von IFN- γ . Im Hinblick auf TNF gibt es widersprüchliche Aussagen, jedoch wird eine Lokalisierung von Entzündungsprozessen vermutet.

Laut Tintinger *et al.*, 2001, wirken Nor-/ Adrenalin über β_2 -Rezeptoren an Immunzellen inhibitorisch indem der cAMP-Spiegel erhöht und darüber die Produktion des Zytokins TNF gehemmt wird und weniger neutrophile Granulozyten mobilisiert und aktiviert werden.

1.7 Stressresponse

Wird der Organismus physischem oder psychischem Stress ausgesetzt, wird das sympathische Nervensystem aktiviert und als Vorbereitung auf eine „*Fight or Flight*“- Reaktion Energie bereitgestellt. Dabei werden sowohl Glucocorticoide als auch Katecholamine ausgeschüttet. Unter chronischem Stress können dabei hormonelle Regelkreisläufe beeinträchtigt werden und durch dauerhaft erhöhte Steroid- und Adrenalin Spiegel chronische Erkrankungen begünstigt werden. So wird die verzögerte Immunantwort unter akutem Stress in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung gesteigert, unter chronischen Stress jedoch supprimiert. (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010; Choukèr, 2012)

1.8 Endocannabinoide

1.8.1 Historie

Die Erforschung des Endocannabinoidsystems (ECS) begann 1964 mit der Entdeckung des Tetrahydrocannabinol (THC) durch Raphael Mechoulam und sein Team (Mechoulam and Gaoni, 1965). 1988 wurde das erste Mal der CB1-Rezeptor (*Cannabinol binding*) in Rattenhirnen durch Alan Howlett und sein Team entdeckt (Devane *et al.*, 1988). Erst 1992 wurde das erste Endocannabinoid (EC) als endogen synthetisierter Ligand entdeckt, das N-Arachidonoyl ethanolamid (AEA) oder Anandamid, drei Jahre später als weiterer Ligand das 2-Arachidonoylglycerol (2-AG). 1993 entdeckten Forscher einen weiteren Cannabinol-Rezeptor-Typ, dieser wurde CB2 genannt (Choukèr, 2012).

Nach heutigen Erkenntnissen weiß man, dass das ECS ein im ganzen Körper verbreitetes Signalsystem ist, welches über die Endocannabinoide (EC) als Liganden, die an die EC-Rezeptoren binden, gesteuert wird. Es wurden mittlerweile noch sehr viel mehr Variationen der Rezeptoren CB1 und CB2 aus der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und weitere Endocannabinoide entdeckt, außerdem Enzyme, die Endocannabinoide synthetisieren und degradieren, sowie spezifische Membrantransportproteine und intrazelluläre Transportproteine (Oláh, Szekanecz and Bíró, 2017).

1.8.2 Funktionen

Die wichtigsten Funktionen des ECS beinhalten Neuromodulation, Kontrolle motorischer, kognitiver und emotionaler Funktionen, Homöostase und Motivation. In der Peripherie wirkt es als Modulator des autonomen Nervensystems, des Immunsystems und der Mikrozirkulation. (Pandey *et al.*, 2009)

Die am besten erforschten physiologischen Liganden des ECS, auch „klassische Endocannabinoide“ genannt, sind AEA und 2-AG. Im Laufe der Zeit wurden noch weitere Liganden entdeckt, von denen man ausgeht, dass sie jeweils spezifische Funktionen erfüllen, welche jedoch erst in Ansätzen erforscht sind. Dazu gehören unter anderen Palmitoyl Ethanolamid (PEA), Oleoyl-Ethanolamid (OEA) und Stearoyl-Ethanolamid (SEA). Über einige dieser Endocannabinoide weiß man jedoch, dass sie begleitend zu AEA bzw. 2-AG freigesetzt werden und deren Effekte potenzieren können. (Pandey *et al.*, 2009)

Endocannabinoide werden im Gegensatz zu im Blut zirkulierenden Hormonen nicht gespeichert und über Releasing-Hormone freigesetzt, sondern sind Lipid-Moleküle, die bei Bedarf durch Phospholipide der Zellmembranen synthetisiert werden und lokal ihre Wirksamkeit entfalten. (Choukèr, 2012)

Der CB1-Rezeptor findet sich in erster Linie im Gehirn, wodurch die bereits bekannten psychotropen Effekte vermittelt werden, sowie in metabolisch beteiligten Zellen wie in Fettgewebe, im endokrinen Pankreas, in Muskeln und Leber, aber auch in peripheren Zellen (Hanlon *et al.*, 2015; Turcotte *et al.*, 2016).

Auf Immunzellen befinden sich vor allem CB2-Rezeptoren, welche die immunmodulierenden Effekte der ECs vermitteln. CB2 werden auf fast allen Immunzellen exprimiert. (Turcotte *et al.*, 2016)

1.8.3 Effekte auf Immunantworten

Die Aktivierung des CB2-Rezeptors scheint in erster Linie inhibitorische Effekte auf Immunantworten zu haben. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass ein Fehlen des Rezeptors mit deutlich verstärkter Neutrophilen-Rekrutierung assoziiert ist, sowie eine generelle Hemmung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen (Pandey *et al.*, 2009; Kapellos *et al.*, 2019). Trotz vieler Daten zu diversen anti-inflammatorischen Effekten, die über CB2 vermittelt werden, konnten in einigen Studien ebenso pro-inflammatorische Effekte im Sinne einer modulierenden Wirkung gezeigt werden, darunter auch eine Stimulation der DTH durch 2-AG (Turcotte *et al.*, 2016).

Die Effekte der Endocannabinoide auf Immunzellen scheinen nur vorübergehend zu sein, was darauf schließen lässt, dass sie vor allem vor überschießenden spontanen Immunreaktionen schützen, während bei aktivierten Zellen weniger EC-Rezeptoren exprimiert werden. Sie wirken über unterschiedliche Pfade, darunter auch über den NFkB-Pfad im Sinne einer Hemmung und der damit vermehrten Transkription apoptotischer Gene sowie der verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. (Pandey *et al.*, 2009)

1.8.4 Zirkadianität der Endocannabinoide

Aufgrund der bekannten regulierenden Effekte der Liganden des ECS auf Nahrungsaufnahme, Temperatur und Aktivität, geht man davon aus, dass das ECS einen wichtigen Stellenwert in der Regulierung der Zirkadianität einnimmt (Hodges and Ashpole, 2019).

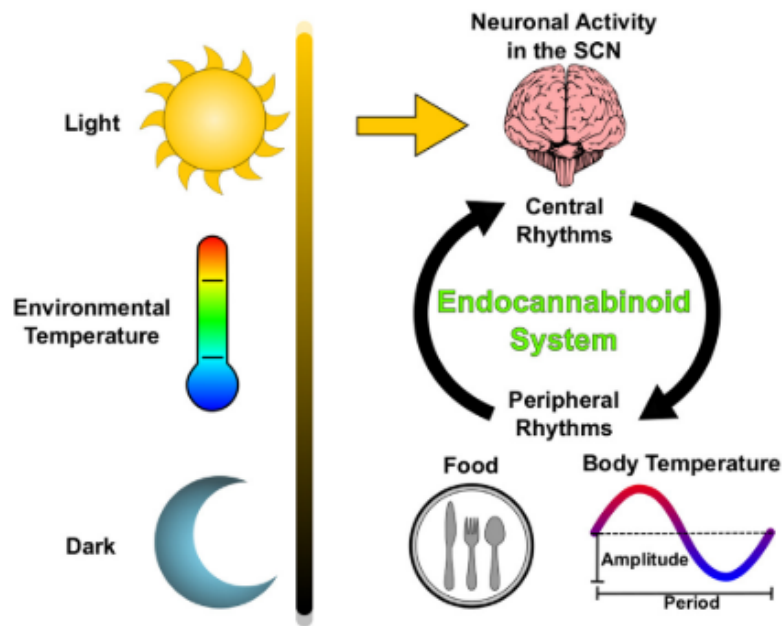


Abbildung 12 -Zirkadianität und das Endocannabinoidsystem (Hodges and Ashpole, 2019)

Zu der Zirkadianität der Endocannabinoidspiegel gibt es bisher wenige Daten, es wurden jedoch unterschiedlich hohe AEA- und 2-AG-Spiegel in Mäuse-Gehirnen im Tagesverlauf gemessen, welche je nach Hirnareal variierten, wobei es Hinweise gibt, dass die beiden Endocannabinoide sich gegenläufig verhalten. Bei Messungen der peripheren Endocannabinoidspiegel beim Menschen wurden für AEA höhere Spiegel in den Morgenstunden gemessen mit einem kontinuierlichem Abfall bis zum Abend hin, während 2-AG einen Nadir in den frühen Morgenstunden gezeigt hat und einen Peak zur Mittagszeit. (Hanlon *et al.*, 2015)

1.9 Hypothese

Als Grundlage für diese Diplomarbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass im Tagesverlauf nicht nur Variationen in der Sekretion der Zytokine, sondern auch in der Aktivität von Immunzellen messbar sein sollten.

So wurde in Zusammenhang der bis hierhin aufgeführten Forschungsergebnisse mit einer Hemmung der zellulären Aktivierungsgrade vor allem morgens und mittags gerechnet. Diese Vermutung basiert vor allem auf den morgendlichen Cortisol-Peak und die hohen Endocan-

nabioidspiegel zur Mittagszeit, welche in bisherigen Arbeiten gemessen wurden. Nach diesem Ansatz wurde mit einem ähnlichen Effekt bei der Stimulierbarkeit durch HKLM und *Candida albicans* gerechnet, während vermutet wurde, dass die Hemmbarkeit durch Noradrenalin Mittags und Abends am höchsten sei und die Hemmbarkeit durch den CB2-Agonisten AM Morgens und Abends am höchsten sei, da zu den anderen Zeitpunkten aufgrund der erhöhten Basalspiegel bereits eine Hemmung durch die beschriebenen Komponenten stattfinden sollte.

2. Material

2.1 Geräte

Infinity M540 Monitor	Dräger, Lübeck, DE
Multipipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortex-Schüttler RS-VA10	Phoenix Instrument, Garbsen, DE
Vortex-Schüttler VF2	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Wasserbad Haake SWB25	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Centrifuge Haraeus Megafuge 40R	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25 CDplus	Christ Martin™, Osterode am Harz, DE
Fluorescence Activated Cell Analyzer FACScan	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Cutasept F 1000ml	Hartmann AG, Heidenheim, DE
Mullkompresse Gazin 5x5cm	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, DE
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
S-Monovette 1,2 ml K3E	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
S-Monovette 7,5 ml K3E	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
S-Monovette 1,2 ml LH	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
S-Monovette 2,6 ml LH	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
S-Monovette 9,0 ml LH	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Vacutainer 5,0 ml PPT K2E 9,0 mg	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey
Salivette® Cortisol, Code blau	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Micro Tube SafeSeal 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Tube 5 ml, 75x12 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE

Polypropylene Round-Bottom-Tube 5 ml, 12x75 mm	Falcon®Corning, Corning, New York
Tube 13 ml, 16,5x101 mm, PP	Sarstedt AG & Co. , Nürnberg, DE
Cellstar® Tube 50 ml, 30x115 mm, Conical bottom	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AUT
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, DE
Pipettierhilfe Pipetboy 2	Integra Biosciences, Biebertal, DE
Pipette Research Plus 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Research Plus 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Research Plus 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Research Plus 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette Reference 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.3 Chemikalien

2.3.1 Lösungen

HBSS (Hank'sche Lösung ohne Phenolrot), Ch.Bez. L20170803-01	Apotheke Klinikum der LMU München Großhadern, DE
FACS Lysing Solution Concentrate, Best.Nr. 349202	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Histopaque®-1077, Best.Nr. 10771-500ML	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Transfix 20 ml, Best.Nr. TFB-20-1	Bioleague GmbH, Poggensee. DE
Acetonitril	Honeywell Chromasolv, Charlotte, North Carolina, USA
Methanol	Honeywell Chromasolv, Charlotte, North Carolina, USA
Wasser aus der Sartoriusanlage	
MTBE (Tertiär-Butyl-Methylether)	
Ammoniumformiat-Lösung für die Biochemie	
Ethanol	
Arachidol Ethanolamide, Best.Nr. 90050	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
2-Arachidonyl Glycerol, Best.Nr. 62160	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA

Palmitoyl Ethanolamide Pulver, Best.Nr. 90350	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Arachidonoyl-Glycine, Best.Nr. 90051	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Oleoyl Ethanolamide Pulver, Best.Nr. 90265	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Stearoyl Ethanolamide Pulver, Best.Nr. 90245	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
2-Arachidonoyl Glycerol Ether, Best.Nr. 62165	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
N-Oleoyl Dopamine, Best.Nr. 100115	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Docosatetraenoyl Ethanolamide 10 mg/ml, Best.Nr. 90385	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Dihomo- γ -Linolenoyl Ethanolamide, Best.Nr. 90235	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Virodhamine (Tocris), Best.Nr. 1569	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Arachidol Ethanolamide-d4, Best.Nr. 10011178	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
2-Arachidonoyl Glycerol-d5, Best.Nr. 362162	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Palmitoyl Ethanolamide-d4, Best.Nr. 10007824	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
N-Arachidonoyl-Dopamine-d8, Best.Nr. 10007431	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Arachidol-Glycine-d8, Best.Nr. 10007531	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA

2.3.2 Aktivatoren/ Inhibitoren

MRS 1754 (N-(4-cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo- 1,3-dipropyl-1-H-purin-8-yl) phenoxy]-acetamide), Best.Nr. 2752	Tocris, Bristol, GB
---	---------------------

CGS 21680, Best.Nr. C-141	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
DHR 123 (Dihydrorhodamin), Best.Nr. D-632	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ADO (Adenosin), Best.Nr. A9251	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
TNF (Tumor Nekrose Faktor alpha), Best.Nr. T0157	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
fMLP, Best.Nr. F3506	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat), Best.Nr. P8139	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
AM1241 ((2-iodo-5-nitrophenyl)-(1-(1-methyl-piperidin-2-ylmethyl)-1H-indol-3-yl)methanone), Best.Nr. 10010118	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Noradrenalin	Sanofi-Aventis über Apotheke Klinikum LMU München Großhadern, DE
RPMI-1640 Medium, Best.Nr. 7638	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
HKLM (10 ⁷ HKLM/ml Stocklösung), Best. Nr. ttrl-hklm	Cayla-InvivoGen, Toulouse, Frankreich
<i>Candida albicans</i>	

2.3.3 Antikörper

CD14FITC, Best.Nr.: 345784	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD16PerCp, Best.Nr.: 338440	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD40Pe, Best.Nr.: 555589	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD80Pe, Best.Nr.: 557227	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD69Pe, Best.Nr.: 555531	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD69PerCP, Best.Nr.: 340548	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD28PerCP, Best.Nr.: 337181	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA

HLA-DR Pe, Best.Nr.: 555812	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD152Pe, Best.Nr.: 555853	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD4FITC, Best.Nr.: 555347	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD8FITC, Best.Nr.: 557085	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA

2.3.4 Kits

Cytometric Bread Array Hum. Th1/Th2 Kit II 80 T, Best.Nr. 551809	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD-Simultest™IMK-Lymphocyte, Best.Nr. 340182	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA

2.4 Software

CellStar-Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Analyst Software	AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, DE
Office 365 Word	Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA
Office 365 Excel	Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA
SPSS Statistics 24	IBM, Armonk, New York, USA
Mendeley Reference Manager	Elsevier, Amsterdam, NL
Adobe Reader DC	Adobe Inc., Delaware, USA

2.5 Fragebögen

KAB-Stresstest	Beltz Test GmbH, Weinheim, DE
----------------	-------------------------------

3. Methoden

3.1 Probandenkollektiv

Für diese Pilotstudie wurden Probanden im Klinikum der LMU München aus den Mitarbeitern verschiedener Abteilungen rekrutiert.

Eingeschlossen wurden gesunde Männer zwischen 18 und 50 Jahren, die in den Tagen davor keinen Nachtdiensten oder sonstigen starken Schwankungen des Tagesrhythmus ausgesetzt waren.

Die Deklaration von Helsinki wurde berücksichtigt, sie wurden nach dem Grundsatz der Informierten Einwilligung aufgeklärt (Weltärztebund, 2013) und eine Einwilligungserklärung wurde unterschrieben. Die Umsetzung wurde nach einem Ethikvotum der örtlichen Ethikkommission unter der **Projektnummer 766-16** durchgeführt.

3.2 Studienaufbau

Bei der Studie, die Gegenstand dieser Diplomarbeit ist, handelte sich um eine prospektive experimentelle Studie.

Die Probanden wurden aus ihrem Arbeitsalltag heraus dreimal innerhalb eines Tages einberufen. Es wurden die Zeitpunkte T1, T2 und T3 für 7:30, 11:30 und 17:00 Uhr für die Probenentnahmen und Datenerhebungen festgelegt. Die Probanden durften kurz vorher nichts essen und keine koffeinhaltigen Getränke zu sich nehmen.

3.3 Monitoring der Probanden

Zu jedem Abnahmezeitpunkt wurden Messungen des Blutdrucks und der Sauerstoffsättigung (Pulsoxymetrie) durchgeführt.

Die Ermittlung des subjektiv empfundenen, aktuellen Stresslevels erfolgte mittels Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung (*KAB*), da hohe Stresslevel die Cortisolspiegel beeinflussen können und somit eventuell Ergebnisse verfälscht wären.

Größe, Gewicht, Alter, Allergien und Medikamenteneinnahme wurden dokumentiert.

3.4 Probenabnahme

Zu allen Messzeitpunkten wurden Blutproben peripher venös abgenommen.

Zu Zeitpunkt T1 wurde eine zusätzliche 1,2ml-EDTA-Monovette abgenommen und genutzt, um ein kleines und ein Differentialblutbild im Hauptlabor des Klinikums der LMU München Großhadern bestimmen zu lassen.

Zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 wurden jeweils eine 9ml-Lithiumheparin-Monovette und 2,6ml-Lithiumheparin-Monovette abgenommen, diese wurden auf Raumtemperatur belassen. Außerdem wurde eine 1,2ml-Lithiumheparin-Monovette zur Messung der Endocannabinoide abgenommen, diese wurde direkt auf Eis gelegt und je 500 µl in zwei 2ml Micro Tubes abpipettiert und bei -80°C tiefgefroren.

Speichel wurde mit Hilfe einer Salivette® Cortisol zu allen drei Zeitpunkten gesammelt, indem die Probanden 60 Sekunden auf der Saugrolle kauten.

3.5 Bestimmung der Lymphozytenuntergruppen mittels IMK-Lymphocyte

Zu Zeitpunkt T1 wurde Vollblut aus der 1,2ml-EDTA-Monovette abgenommen und mit Hilfe des BD Simultest IMK-Lymphocyte (*Immunfluoreszenz-Kit*) (BD Biosciences, 2015) verarbeitet, um die Lymphozytenuntergruppen prozentual zu bestimmen.

Sechs 12x75mm-Tubes (A bis F) wurden jeweils mit 10 µl der entsprechenden Lösungen des IMK-KITs mit je 50 µl Vollblut für 20 Minuten bei Dunkelheit inkubiert.

Tabelle 1 - Lösungen des IMK-KITs (BD Biosciences, 2015)

Lösung im KIT	Antikörper gegen	Zellpopulation
A	CD45, CD14	Unterscheidung Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
B	IgG ₁ , IgG _{2a}	Isotypkontrolle
C	CD3, CD19	B- und T-Lymphozyten
D	CD3, CD4	T Helfer/-Inducer Lymphozyten
E	CD3, CD8	Suppressor-/zytotoxische T-Lymphozyten
F	CD3, CD16, CD56	T-Lymphozyten, NK-Zellen

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit 1 ml FACS Lysing Solution versetzt und 10 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren.

Darauf erfolgte die Wäsche der Proben, indem die Ansatzröhrchen mit kalter HBSS aufgefüllt wurden und 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation bis auf die Zellpellets am Grund verworfen.

Die Proben wurden in 300 µl HBSS gevortext und der prozentuale Anteil der Zellpopulationen konnte entsprechend Tab. 1 per FACScan gemessen und mit der CellStar Software ausgewertet werden.

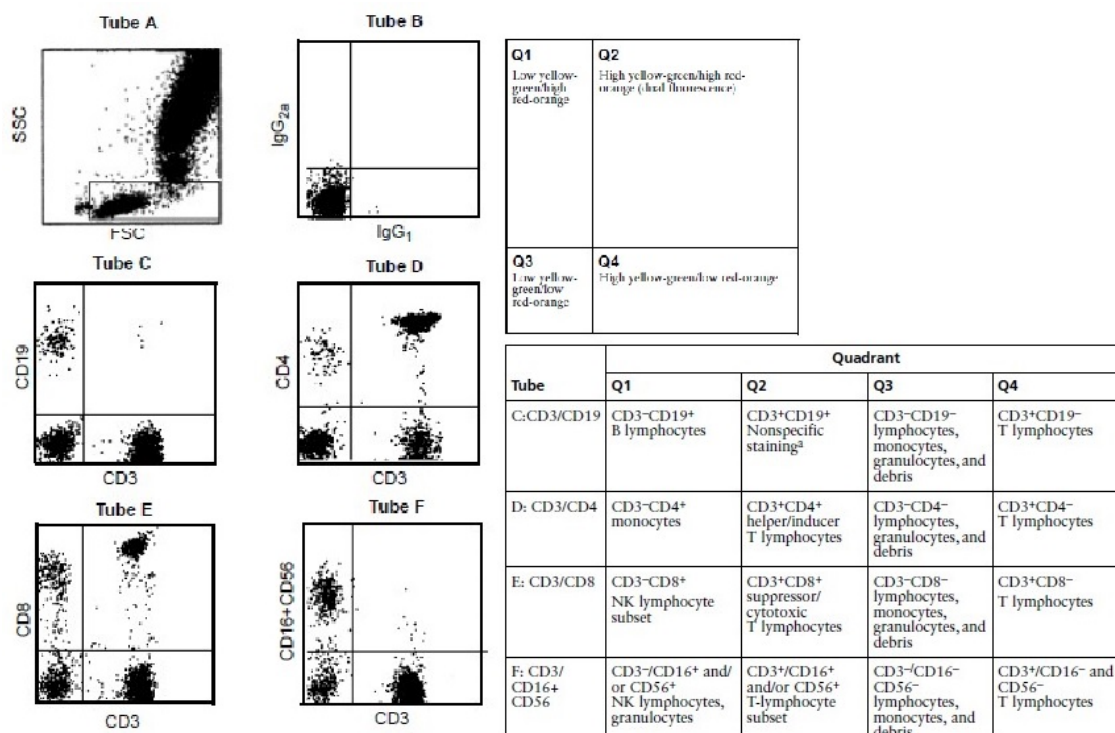


Abbildung 13 - Beispiel für die Auswertung der prozentualen Anteile der Zell-Subpopulationen per IMK-Set: Die ausgegebenen Punktdiagramme der FACS-Messung werden hierfür in die Quadranten Q1-4 eingeteilt und die Anteile der Zellpopulationen ausgelesen (BD Biosciences, 2015)

3.6 Messung der Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten anhand der H₂O₂-Produktion (Oxidative Burst)

Es wurde zu allen Zeitpunkten 2 ml Blut aus der bei Raumtemperatur belassenen 2,6ml-Li-Heparin-Monovette mit einer Pipette auf 2 ml Histopaque geschichtet und 20 Minuten bei Raumtemperatur aufrecht stehen gelassen. Durch Sedimentation wurden die Erythrozyten von den Leukozyten getrennt, als oberste Schicht wurde das Leukozytenreiche Plasma (LRP) abpipettiert und zügig weiterverarbeitet. (Kaufmann *et al.*, 2009)

LRP wurde mit Dihydro-Rhodamin (*DHR*) als Marker für die Detektierbarkeit durch den FACScan versetzt und mit TNF, FMLP (*N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine*), PMA (*Phorbol myristat acetat*), Noradrenalin, AM 1241 (*AM*), Adenosin (*ADO*), MRS 1754 (*MRS*) und CGS 21680 (*CGS*) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert.

Aufgrund der Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten Wasserstoffperoxid als zytotoxischen Komponenten abzusondern, kann man über ausgeschütteten H₂O₂-Mengen auf ihren Aktivierungsgrad zurückschließen.

DHR wird durch das von aktivierten Granulozyten freigesetzte Wasserstoffperoxid zum fluoreszierenden Rhodamin oxidiert, dieses ist mit dem FACScan messbar (Martignoni *et al.*, 2008) .

Tabelle 2 - Granulozyten-Stimulantien/-Inhibitoren im Hinblick auf H₂O₂-Freisetzung (Idriss and Naismith, 2000; Tintinger et al., 2001; Choukér et al., 2005; Kaufmann et al., 2007, 2011)

TNF	Rezeptorabhängige Stimulation, TNFR1/2
fMLP	Rezeptorabhängige Stimulation
PMA	Rezeptorunabhängige Stimulation, Positivprobe
Noradrenalin (NE)	Hemmung
AM 1241 (EC)	Selektiver CB2 Agonist
Adenosin (ADO)	Rezeptorabhängige Hemmung
MRS 1754 (MRS)	Selektiver Adenosinrezeptor-Antagonist A2B
CGS 21680 (CGS)	Selektiver Adenosinrezeptor-Agonist A2A

Zwölf 5-ml-Tubes wurden nach folgendem Schema (Tab. 3) mit jeweils 10 µl der entsprechenden Reagenzien und 1 ml HBSS befüllt, dann 10 Minuten im Wasserbad belassen, um sie zu erwärmen.

Während der Inkubationszeiten und der nächsten Schritte wurden die Ansätze im Wasserbad bei 37°C belassen, um ein physiologisches Milieu zu simulieren.

Tabelle 3 – H₂O₂-Assay Reagenzien mit Konzentrationen (Nach Schema der Arbeitsgruppe „Translationale Forschung – Stress und Immunologie“, Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München)

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reagenzien (Konzentration)	-	-	-	NE1 (10 ⁻⁷)	NE2 (5x10 ⁻⁸)	EC1 (1x10 ⁻⁶)	EC2 (5x10 ⁻⁶)	ADO1 (10 ⁻⁶)	ADO2 (10 ⁻⁸)	ADO (10 ⁻⁶) MRS 1754 (10 ⁻⁷)	CGS1 (10 ⁻⁶)	CGS2 (5x10 ⁻⁷)

Zu den Ansätzen wurden jeweils 20 µl LRP und 10 µl DHR in jedes Ansatzröhrchen gegeben und 5 Minuten inkubiert.

Dann wurden bis auf die Proben 1 und 3 alle mit 10 µl TNF versetzt. Probe 1 wurde als Negativkontrolle ohne Zusatz gelassen und Probe 3 wurde als Positivkontrolle genutzt.

Nach weiteren 5 Minuten wurden in alle außer Probe 1 und 3 10 µl fMPL zupipettiert, in Probe 3 10 µl PMA.

Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben nach Abschluss des Assays und während der durchflusszytometrischen Messungen auf Eis gestellt, um die Reaktionen der Zellen zu stoppen (Kaufmann *et al.*, 2009). Das durch H₂O₂ zu Rhodamin oxidierte DHR wurde per FACScan Durchflusszytometer als Parameter für die Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten gemessen und mit der CellStar-Software ausgewertet.

3.7 Bestimmung der Funktionalität der DTH nach Antigen-Stimulation

3.7.1 Herstellung der Blut-Antigen-Ansätze

Zur Bestimmung der verzögerten Immunantwort wurden Ansätze aus Lithium-Heparin-Vollblut hergestellt, mit den Antigenen HKLM (5µg/ml) oder *Candida albicans*-Lysat (10 µg/ml), jeweils in RPMI gelöst, zu gleichen Teilen gemischt und für jeweils 6 Stunden im Wasserbad

(37°C) inkubiert. Als Kontrolle erfolgte eine Inkubation in RPMI-Medium ohne Antigenzusatz. Dieser in vitro Assay wurde von Feuerecker et al entwickelt, nachdem der DTH-Skin Test in vivo 2002 aufgrund möglicher Antigen-Sensibilisierung eingestellt wurde (Feuerecker *et al.*, 2012).

Die Rolle von Stresshormonen wurde durch eine Co-Inkubation mit 10^{-6} mol/l Norepinephrin und 10^{-5} mol/l AM1242 als selektiven CB2-Rezeptor Agonisten überprüft.

Tabelle 4 - DTH-Ansätze (Nach Schema der Arbeitsgruppe „Translationale Forschung – Stress und Immunologie“, Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München)

	1	2	3
A	DTH basal	DTH HKLM	DTH Candida
B	DTH basal Norepinephrine 10^{-6}	DTH HKLM 10^{-7} Norepinephrine 10^{-6}	DTH Candida Norepinephrine 10^{-6}
C	DTH basal AM1241 10^{-5}	DTH HKLM AM1241 10^{-5}	DTH Candida AM1241 10^{-5}

Die Herstellung der DTH-Ansätze erfolgten nach jeder Blutabnahme (T1 – T3).

Für die Ansätze wurden je Kombination 500 µl Antigenreagenz in 5-ml Polypropylene Tubes vorgelegt.

Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden von jedem Ansatz 150 µl Überstand für die spätere Zytokinmessung in Microtubes abgenommen und bei -80°C eingefroren, die restliche Blut-Antigen-Mischung wurde geschüttelt, 300 µl in Microtubes pipetiert und mit jeweils 60 µl Transfix fixiert. Diese wurden bei 4°C gelagert bis zur anschließenden Analyse.

3.7.2 Monozyten-/Lymphozytenphänotypisierung

Aus den mit Transfix fixierten Proben wurden durch Markierung der verschiedenen Rezeptoren mit PE-/PerCP-/ und FITC-gekoppelten Antikörper die Rezeptorenexprimierung der Monozyten und Lymphozyten gemessen, um die Zellen genau zu typisieren.

Dazu wurde jede Probe der DTH-Ansätze auf 10 Tubes verteilt. Bevor jeweils 20 µl des inkubierten und fixierten Blutes hineinpipettiert wurden, wurden fluoreszierende Antikörper wie

in Tab. 5 in verschiedenen Kombinationen vorgelegt und gut mit dem Blut vermischt. Außerdem gab es ein ungefärbtes Beispiel als Negativkontrolle.

Tabelle 5 - Antikörper für die Mono- / Lyphozytentypisierung (Nach Schema der Arbeitsgruppe „Translationale Forschung – Stress und Immunologie“, Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München)

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
5µl CD14 FITC 5µl CD16PerCp 2 µl TLR-2 PE	5µl CD14 FITC 5µl CD16PerCp 5µl CD40PE	5µl CD14 FITC 5µl CD16PerCp 5µl CD80PE	5µl CD14 FITC 5µl CD16PerCp 5µl CD69PE	5µl CD14 FITC 5µl CD16PerCp 5µl HLA-DR PE
Tube 6	Tube 7	Tube 8	Tube 9	ungefärbte Probe
5µl CD4 FITC 5µl CD69PE 5µl CD28PerCP	5µl CD4 FITC 5µl CD69PerCP 5µl CD152 PE	5µl CD8 FITC 5µl CD69PE 5µl CD28PerCP	5µl CD8 FITC 5µl CD69PerCP 5µl CD152 PE	keine Antikörper

Die Antikörper wurden mit dem Blut 20 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde 1 ml Lysepuffer dazugegeben, gevortext und 10 Minuten in Dunkelheit inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren.

Danach wurden die Proben gewaschen, indem sie mit HBSS aufgefüllt und bei Raumtemperatur 5 Minuten lang bei 2500 U/min zentrifugiert wurden.

Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 300 µl HBSS gevortext.

Der prozentuale Anteil doppelpositiver Monozyten (CD14 +TLR-2, HLA-DR, CD69, CD40, CD80) bzw. Lymphozyten (CD4 bzw. CD8 + CD28/CD152) (von gemessenen 10.000) wurde am FACScan Durchflusszytometer gemessen und mittels der CellStar Software ausgewertet.

3.7.3 Zytokinanalyse mittel Cytometric Bead Array (CBA)

Aus den gesammelten und eingefrorenen Überständen der DTH-Ansätze wurden mit Hilfe des CBA-KITs von BD die Konzentration der Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, und TNF bestimmt. Die Verarbeitung der Proben, Durchführung der Messungen im FACScan Durchflusszytometer und die Auswertung mit Hilfe der CellStar-Software erfolgten nach Herstellerangaben.

3.8 Bestimmung der Hormonspiegel

3.8.1 Cortisol

Die Konzentrationen der Hormone Cortisol, Cortison, Androstendion und Testosteron wurden aus den mit Hilfe der Salivette gesammelten Speichelproben durch standardisierte Verfahren mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) im Anaesthesielabor der LMU München Großhadern gemessen.

3.8.2 Endocannabinoide

Puffer- und Kalibrationslösungen

Im Folgenden wird die Herstellung der benötigten Puffer- und Kalibrationslösungen behandelt.

Tabelle 6 - Konzentrationen der ursprünglichen Kalibratoren und internen Standards

Kalibratoren	
Arachidol Ethanolamide (K-AEA)	50 mg/ml
2-Arachidonyl Glycerol (K-2-AG)	10 mg/ml,
Palmitoyl Ethanolamide (K-PEA)	10 mg/ml
Arachidonoyl-Glycine (K-AG)	50 mg/ml
Oleoyl Ethanolamide (K-OEA)	10 mg/ml
Stearoyl Ethanolamide (K-SEA)	10 mg/ml
2-Arachidonoyl Glycerol Ether (K-2-AG-Ether)	10 mg/ml
N-Oleoyl Dopamine (K-OLDA)	50 mg/ml
Docosatetraenoyl Ethanolamide (K-DEA)	10 mg/ml
Dihomo- γ -Linolenoyl Ethanolamide (K-DLE)	50 mg/ml
Virodhamine (Tocris) (K-O-AEA)	5 mg/ml
Interne Standards	
Arachidol Ethanolamide-d4 (IS-AEA-d4)	1 mg/ml
2-Arachidonoyl Glycerol-d5 (IS-2-AG-d5)	1 mg/ml
Palmitoyl Ethanolamide-d4 (IS-PEA-d4)	1 mg/ml
N-Arachidonoyl-Dopamine-d8 (IS-NADA-d8)	1 mg/ml
Arachidol-Glycine-d8 (IS-AG-d8)	1 mg/ml

Interner Standard-Mix **ISM**: für 10 ml ISM werden 20 µl IS-AEA-d4, 100 µl IS-2-AG-d5, 200 µl IS-PAE-d4, 20 µl IS-NADA-d8 und 20 µl IS-AG-d8 mit Ethanol auf 10 ml aufgefüllt

Arbeitslösung I **A1**: 11 ml A1 enthalten 2 µl K-AEA, 5 µl K-2-AG, 5 µl K-PEA, 2 µl K-AG, 10 µl K-OEA, 5 µl K-SEA, 2 µl K-2-AG-Ether, 2 µl K-OLDA, 10 µl K-DEA, 0,4 µl K-DLE, 2 µl K-O-AEA mit Ethanol aufgefüllt

Arbeitslösung II **A2**: 10 ml A2 enthalten 0,02 µl K-AEA, 0,5 µl K-2-AG, 0,5 µl K-PEA, 0,02 µl K-AG, 0,1 µl K-OEA, 0,5 µl K-SEA, 0,02 µl K-2-AG-Ether, 0,02 µl K-OLDA, 0,1 µl K-DEA, 0,004 µl K-DLE, 0,2 µl K-O-AEA mit Ethanol aufgefüllt

Arbeitslösung III **A3**: A2 im Verhältnis 1:100 mit Ethanol verdünnt

Blut-Rekonstitutions-Puffer **R1**: 5 mM NH₄O₄ in Wasser mit 15% Methanol

Blut-Rekonstitutions-Puffer **R2**: 5 mM NH₄O₄ in Wasser mit 50% Methanol

Kalibrierung

Zur Kalibrierung wird aufsteigend in je ein HPLC-Vial folgendes pipettiert:

- **Cal A** = 5 µL der Arbeitslösung III + 20 µL IS-Mix + 125 µL R2-Puffer
- **Cal B** = 25 µL der Arbeitslösung III + 20 µL IS-Mix + 105 µL R2-Puffer
- **Cal C** = 5 µL der 1:10 verdünnten Arbeitslösung II + 20 µL IS-Mix + 125 µL R2-Puffer
- **Cal D** = 10 µL der 1:10 verdünnten Arbeitslösung II + 20 µL IS-Mix + 120 µL R2-Puffer
- **Cal E** = 25 µL der 1:10 verdünnten Arbeitslösung II + 20 µL IS-Mix + 105 µL R2-Puffer
- **Cal F** = 50 µL der 1:10 verdünnten Arbeitslösung II + 20 µL IS-Mix + 80 µL R2-Puffer
- **Cal G** = 100 µL der 1:10 verdünnten Arbeitslösung II + 20 µL IS-Mix + 30 µL R2-Puffer

Bei der Anwendung von 500 µL Blutplasma aus Poolproben gelten folgende Konzentrationen:

Tabelle 7- Konzentrationen der Kalibratoren zur Bestimmung der Endocannabinoidspiegel in Blut [ng/ml] nach SOP der Arbeitsgruppe „Translationale Forschung – Stress und Immunologie“, Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München

	Cal A	Cal B	Cal C	Cal D	Cal E	Cal F	Cal G
Endocannabinoide							
AEA	0,1	0,5	1	2	5	10	20
2-AG	0,5	2,5	5	10	25	50	100
PEA	0,5	2,5	5	10	25	50	100
AG	0,1	0,5	1	2	5	10	20
OEA	0,1	0,5	1	2	5	10	20
SAE	0,5	2,5	5	10	25	50	100
2-AG-ether	0,02	0,1	0,2	0,4	1	2	4
OLDA	0,1	0,5	1	2	5	10	20
DEA	0,1	0,5	1	2	5	10	20
DLE	0,02	0,1	0,2	0,4	1	2	4
O-AEA	0,1	0,5	1	2	5	10	20

Vorbereitung der Proben

Die Blutspiegel der Endocannabinoide Arachidonoyl Ethanolamid (AEA), 2-Arachidonoyl Glycerol (2-AG), Palmitoyl Ethanolamid (PEA), Oleoyl Ethanolamid (OAE) und Stearoyl Ethanolamid (SEA) wurden aus den zuvor in 2ml-Micro-Tubes eingefrorenen heparinisierten Vollblutproben bestimmt.

Zu den 500 µl Vollblut wurden 20 µl des internen Standard-Mix, der um den Faktor 1:10 mit Ethanol verdünnt wurde, und 1 ml MTBE hinzugegeben.

Die Tubes wurden verschlossen und eine Minute mit dem Vortex geschüttelt, danach für 5 Minuten bei 13970 U/Min zentrifugiert.

Die Überstände wurden in 1,5ml-MicroTubes abpipetiert, das Zentrifugat verworfen.

Die Proben wurden mittels Rotations-Vakuum-Konzentrator eingedampft, mit 80 µl Acetonitril versetzt und gevortext, dann mit 80 µl R1-Puffer versetzt und wieder gevortext.

Danach wurde das ganze wiederum 5 Minuten bei 13970 U/Min zentrifugiert.

Die Überstände wurden abgenommen, in HPLC-Tubes gefüllt und gekühlt.

Messung der Endocannabinoid-Spiegel

Die Messung konnte nach Aufbereitung der Proben und Kalibrierung per High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) durch Kooperationspartner durchgeführt und analysiert werden.

3.9 Statistische Auswertung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit Hilfe der CellStar-Software dargestellt und ausgewertet. Die Daten wurden in Excel-Sheets gesammelt und transformiert.

Die deskriptive Statistik und grafische Darstellung erfolgte sowohl über Excel, als auch über IBM SPSS Statistics.

Die statistischen Vergleiche der gemessenen Daten erfolgte über IBM SPSS Statistics. Sie wurden mittels Varianzanalysen mit Messwiederholung (repeated measures ANOVA) untersucht.

Bei der mehrfaktoriellen ANOVA der Mono- und Lymphozytentypisierung sowie der Zytokine dienten die Messzeitpunkte T1, T2 und T3 sowie die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationen mit NE und AM bzw. HKLM und *C. albicans* als Messwiederholungsfaktor.

Bei der einfaktoriellen ANOVA dienten nur die Messzeitpunkte T1, T2 und T3 als Wiederholungsfaktor. Bei der Analyse der paarweisen Vergleiche wurden Bonferroni-Korrekturen vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Anthropometrische Daten

Es wurden 6 Probanden eingeschlossen. Keiner der Probanden war über- oder untergewichtig, Herzfrequenz Blutdruck und Sauerstoffsättigung befanden sich zu allen Messzeitpunkten im Normbereich. Die Ergebnisse des KAB ergaben einen Mittelwert von 1,95 ($\pm 0,58$; max 3,0; min 0,45).

Es wurden 6 Messdurchläufe (S2-S7) durchgeführt.

Proband S2 und S5 gaben eine Pollinosis an, waren zum Untersuchungszeitpunkt jedoch symptomfrei und ohne Medikation.

Tabelle 8 - Anthropometrische Daten des Probandenkollektivs

	Mittelwerte Probanden [N=6]
Größe	181 cm $\pm$ 4
Gewicht	77,4 Kg $\pm$ 5,4
BMI	23,57 $\pm$ 1,18

4.2 Auswertung Blutbild und IMK

In Blutbild konnten bei keinem Probanden pathologische Werte gemessen werden.

Bei den IMK-Messungen befanden sich die Werte aller Messungen in den vom Hersteller vorgegebenen Normbereichen, lediglich bei S7 konnten erniedrigte Werte der Anteile von CD3⁺CD4⁺(T-Helfer)-Zellen sowie eine Erhöhung der CD3⁺CD4⁺ (Lymphozyten, Granulozyten, Debris) gemessen werden.

Tabelle 9 – Mittelwerte IMK-Messungen

N=6 [%]	mean	SD
Granulozyten	45,42	6,47
Lymphozyten	32,81	5,00
Monozyten	5,51	0,91
Eosinophile	2,43	1,23

CD3-/CD19+ B-Zellen	13,32	6,00
CD3+/CD19- T-Zellen	62,05	9,79
CD3-/CD4+ Monozyten	0,79	0,60
CD3+/CD4+ T-Helfer	34,56	13,08
CD3+/CD4- T-Zellen	20,31	9,01
CD3-/CD4-	44,33	21,85
CD3-/CD8+ NK-Zellen	7,69	3,64
supp./zytotox. T-Zellen	23,90	7,48
CD3+/CD8- T-Zellen	40,83	4,24

4.3 H₂O₂-Produktion durch neutrophile Granulozyten

In Abbildung 14 sind die Mittelwerte der Messungen zur H₂O₂-Produktion durch neutrophile Granulozyten aufgezeigt. Die Messungen von S5 wurden aufgrund eines Fehlers in der Probenverarbeitung ausgeschlossen.

Im Mittel konnte morgens eine höhere Basalproduktion von H₂O₂ gemessen werden, welche zum Mittag und Abend absank. Bei den meisten Probanden wurde ebenso ein kontinuierlicher Abfall der PMA-induzierten H₂O₂-Produktion über den Tagesverlauf gemessen, bis auf S2 und S3, bei denen ein Anstieg zur Mittagszeit gemessen wurde.

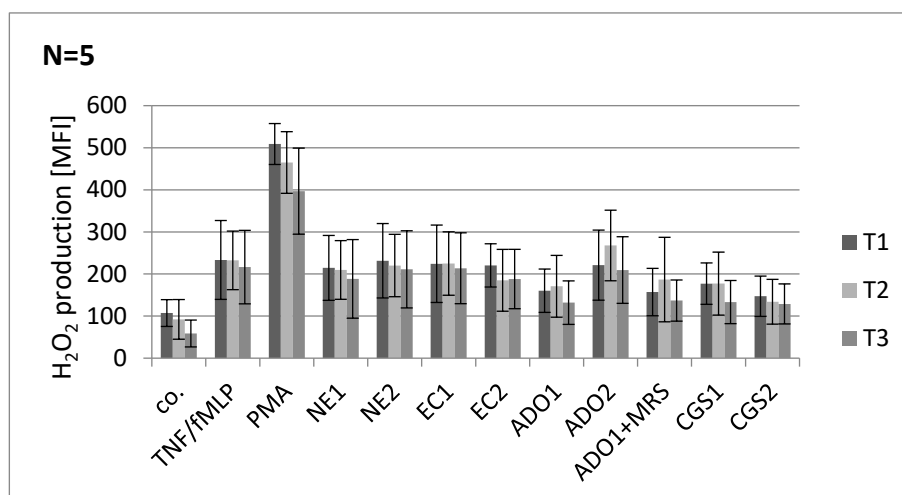


Abbildung 14 – H₂O₂-Produktion neutrophiler Granulozyten, MFI = Mean Fluorescence Intesity

Die Normierung der Daten auf die Basalwerte (Abb. 15) hat gezeigt, dass die Aktivierbarkeit der H₂O₂-Produktion durch TNF/fMLP im Laufe des Tages zugenommen hat.

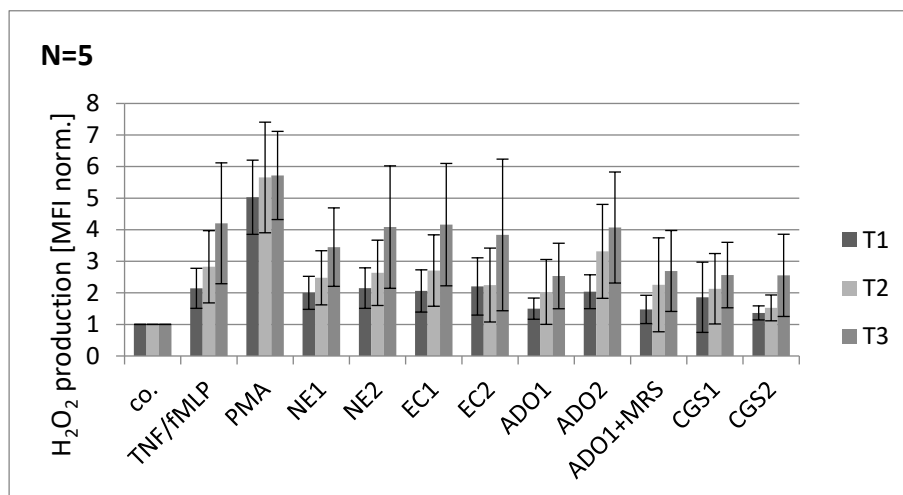


Abbildung 15 - H_2O_2 -Produktion neutrophiler Granulozyten normiert auf die Kontrollproben

Zur Bewertung der Hemmbarkeit durch PMA, NE, EC, ADO, MRS und CGS, wurden die Daten auf die TNF/fMLP stimulierten Ansätze normiert (Abb. 16).

Dabei konnten bei der Auswertung der einzelnen Probanden unterschiedliche Tendenzen der Hemmbarkeit beobachtet werden. Bei 4 von 5 zeigte sich entweder zu T2 oder T3 die größte Hemmbarkeit, während bei S2 die H_2O_2 -Produktion zu T1 am stärksten gehemmt werden konnte. Es konnte beobachtet werden, dass die Hemmung mit größerer Konzentration der Reagenzien Nor und EC stärker ausfiel, bei ADO wurde dies in leichter Ausprägung beobachtet.

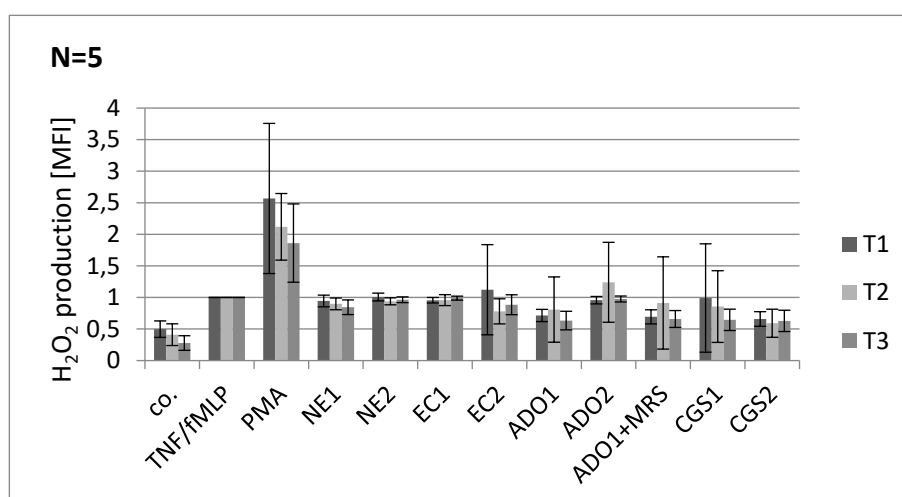


Abbildung 16 - H_2O_2 -Produktion neutrophiler Granulozyten normiert auf TNF/fMLP

4.4 Expression der Oberflächenmarker auf Monozyten

4.4.1 CD14/CD16

Die basale Ausprägung an CD14/CD16-positiven Zellen konnten für die Probanden jeweils 5 Werte pro Zeitpunkt gemessen werden. Die gemittelten Werte fielen niedrig aus und zeigten im Tagesverlauf keine deutlichen Schwankungen.

Es konnte zu T1 und T2 eine Hemmung der CD14/CD16-Expression durch NE und AM beobachtet werden, die bei AM stärker ausfiel. Zu T3 konnte eine Erhöhung der Expression beobachtet werden, diese fiel nach NE-Einwirkung stärker aus (Abb. 17).

Die ANOVA mit Messwiederholung (Sphärizität angenommen) zeigte, dass die Mittelwerte der CD14/CD16-positiven Expression nach AM-Einwirkung sich zu den unterschiedlichen Zeitpunkten statistisch signifikant unterschieden, $F(2, 58) = 4.41$, $p = 0.016$.

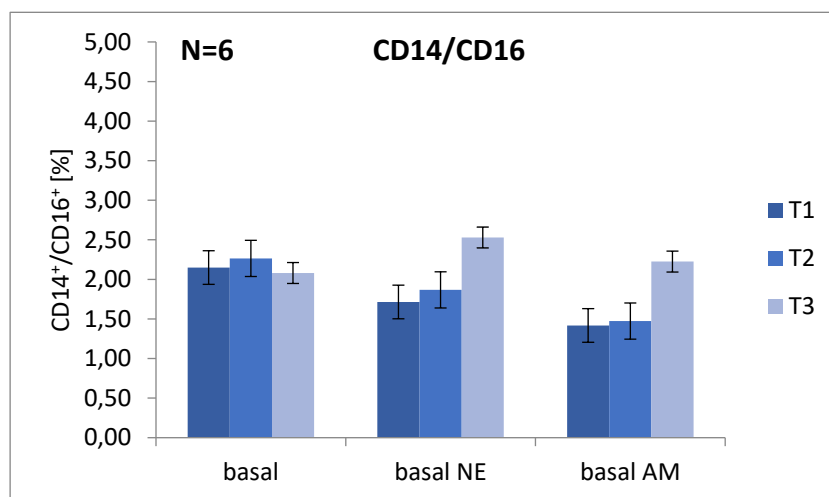


Abbildung 17 – Expression CD14/CD16 basal

Nach HKLM-Inkubation konnte zu allen Zeitpunkten eine erhöhte CD14/CD16-Expression im Vergleich zu den Basalwerten beobachtet werden. Es konnte ein Peak zur Mittagszeit festgestellt werden und ein Abfall von T1 zu T3 (Abb. 18). Die ANOVA mit Messwiederholung zeigte nach Greenhouse-Geisser-Korrektur, dass sich die Mittelwerte statistisch signifikant unterschieden, $F(1.84, 53.42) = 14.78$, $p < 0.001$. Durch paarweise Vergleiche konnten nach Bonferroni-Korrektur statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten T1 und T3, 95%-CI(0.48, 6.37) Mittlere Differenz = 3.43, $p = 0.019$, und T2 und T3, 95%-CI(3.74, 8.79) Mittlere Differenz = 6.27, $p < 0.001$.

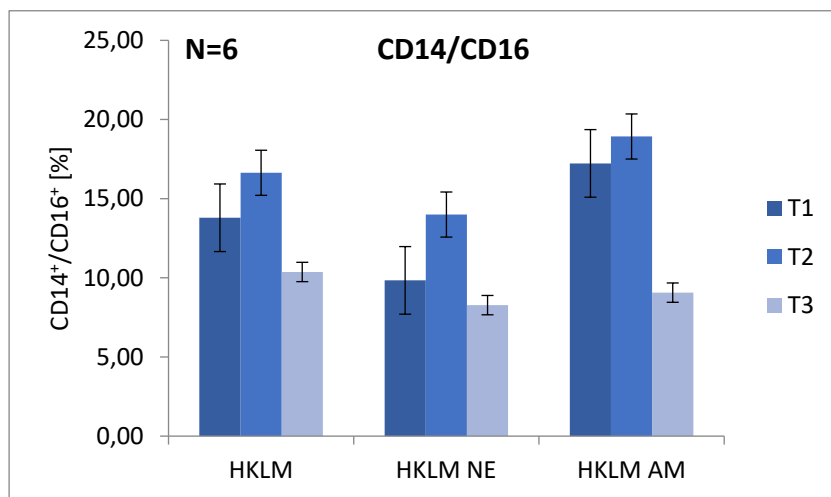


Abbildung 18 - Expression CD14/CD16 nach HKLM-Inkubation

Bei den mit HKLM stimulierten Proben konnte eine Verringerung der CD14/CD16-Expression durch NE festgestellt werden, welche zu T1 am stärksten ausgeprägt war.

Zu T1 und T2 konnte eine Erhöhung durch AM beobachtet werden, zu T3 zeigte sich eine Verringerung (Abb.19).

Sowohl nach NE- als auch nach AM-Einwirkung konnten in der ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Zeitpunkte in der CD14/CD16-Expression festgestellt werden, NE: $F(1.90, 55.09) = 37.32, p < 0.001$, AM: $F(1.83, 53.18) = 66.05, p < 0.001$.

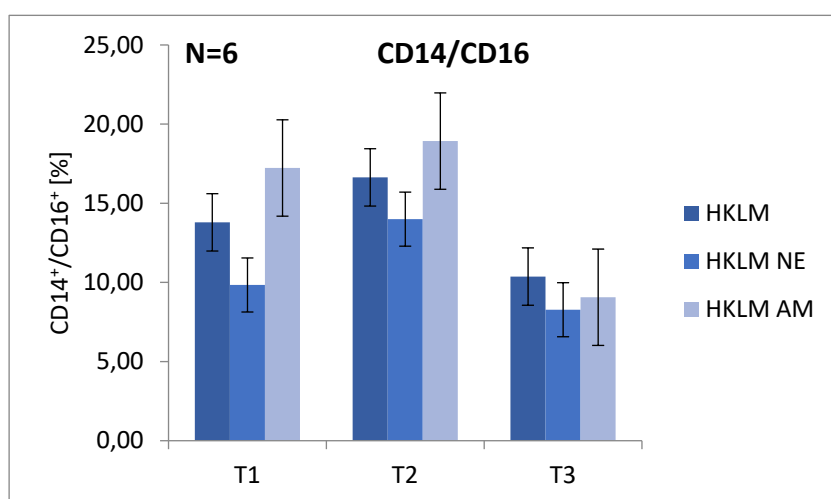


Abbildung 19 - Expression CD14/CD16 nach HKLM-Inkubation

Die CD14/CD16-Expression konnte zu allen Zeitpunkten durch *C. albicans* stimuliert werden. Die Stimulierbarkeit war ungefähr halb so effektiv wie durch HKLM. Zu T2 fiel die Stimulation etwas stärker aus und zu T3 etwas geringer im Vergleich zu T1 (Abb. 20).

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geissler-Korrektur zeigte, dass die Mittelwerte der CD14/CD16-Expression sich statistisch signifikant unterschieden, $F(1.88, 54.41) = 5.47, p = 0.008$. Die Bonferroni-korrigierten paarweisen Vergleiche zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen T2 und T3, 95%-CI(0.43, 2.94) Mittlere Differenz = 1.68, $p = 0.006$.

Die CD14/CD16-Expression der durch *C. albicans* stimulierten Proben konnte zu allen Zeitpunkten durch NE geringfügig gehemmt werden. Es konnte eine deutlichere Hemmung zu allen Zeitpunkten durch AM beobachtet werden, welche zu T3 geringer ausfiel.

Die Anova mit Messwiederholung (Sphärizität angenommen) zeigte bei den Mittelwerten sowohl der durch NE als auch durch AM gehemmten Proben statistisch signifikante Unterschiede, NE: $F(2, 58) = 4.05, p < 0.023$, AM: $F(2, 58) = 6.54, p = 0.003$. In den paarweisen Vergleichen konnten nach Bonferroni-Korrektur keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

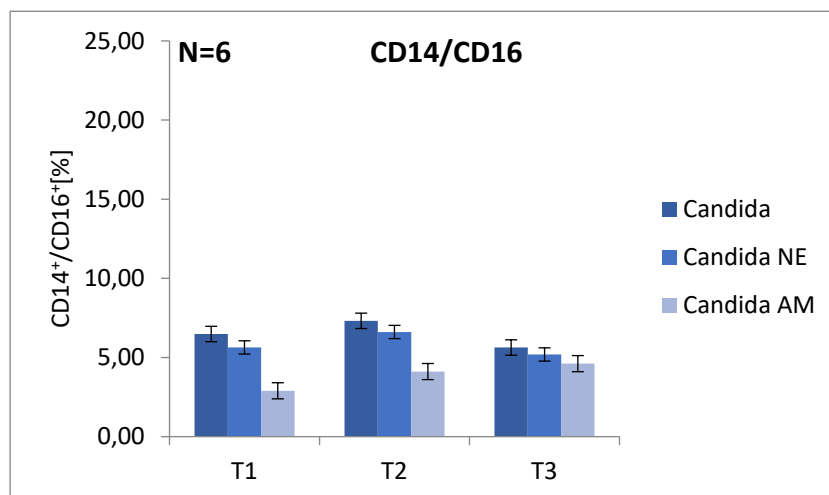


Abbildung 20 - Expression CD14/CD16 nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.4.1 TLR-2

Die basale Expression von TLR-2 auf CD14-positiven Monozyten schien in der ersten Tageshälfte höher zu sein, bei allen Probanden konnte entweder zu T1 oder zu T2 ein Peak der

TLR-2-Expression festgestellt werden. Eine zusätzliche Inkubation mit NE oder AM1241 resultierte in einer Hemmung der TLR-2-Expression, die insbesondere in der zweiten Tageshälfte deutlich ausgeprägt gewesen ist (Abb. 21).

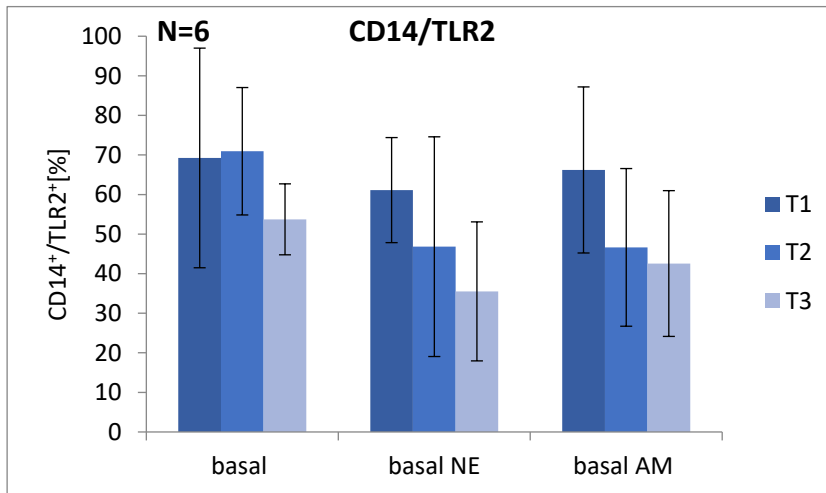


Abbildung 21 – CD14/TLR-2-Expression basal

Die TLR-2-Expression ist nach Inkubation mit *C. albicans* höher ausgefallen als nach HKLM-Inkubation.

Bei den Ansätzen mit HKLM und *C. albicans* konnte im Mittel eine Verringerung der TLR-2-Expression über den Tagesverlauf beobachtet werden (Abb. 22).

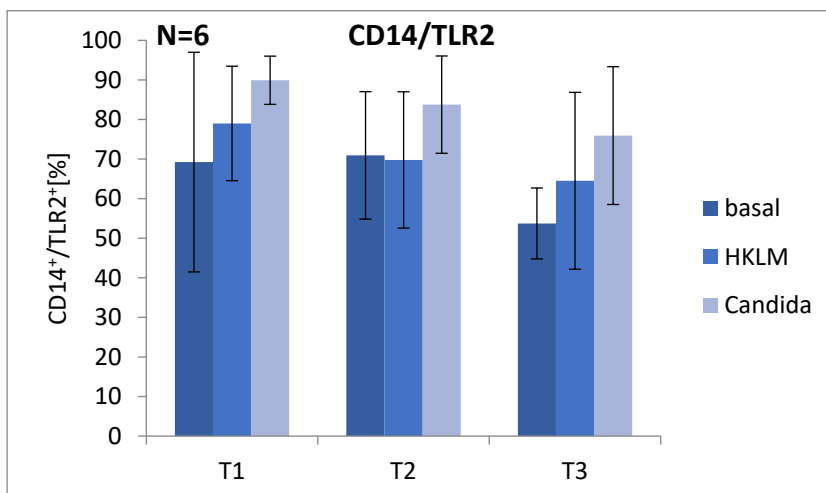


Abbildung 22 – CD14/TLR-2-Expression nach Inkubation mit Antigenen

In der ANOVA mit Messwiederholung konnten in der CD14/TLR-2-Expression keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten gezeigt werden.

4.4.2 HLA-DR

Die basale Expression von HLA-DR bei CD14-positiven Zellen zeigte bei den meisten Probanden einen Peak zu T1, sowie ein Absinken der HLA-DR-Expression von T1 zu T3.

NE zeigte bei den meisten Probanden zu T1 einen stimulierenden Effekt auf die Expression, bei 2 Probanden fiel dieser nur sehr leicht aus. Zu T2 zeigte sich bei allen bis auf einen Probanden ein hemmender Effekt, zu T3 bei 4 von 6 Probanden.

AM wirkte bei 4 von 6 Probanden zu T1 und T2 stimulierend, teilweise nur leicht. Zu T3 zeigte sich bei 4 von 6 Probanden ein hemmender Effekt (Abb. 23).

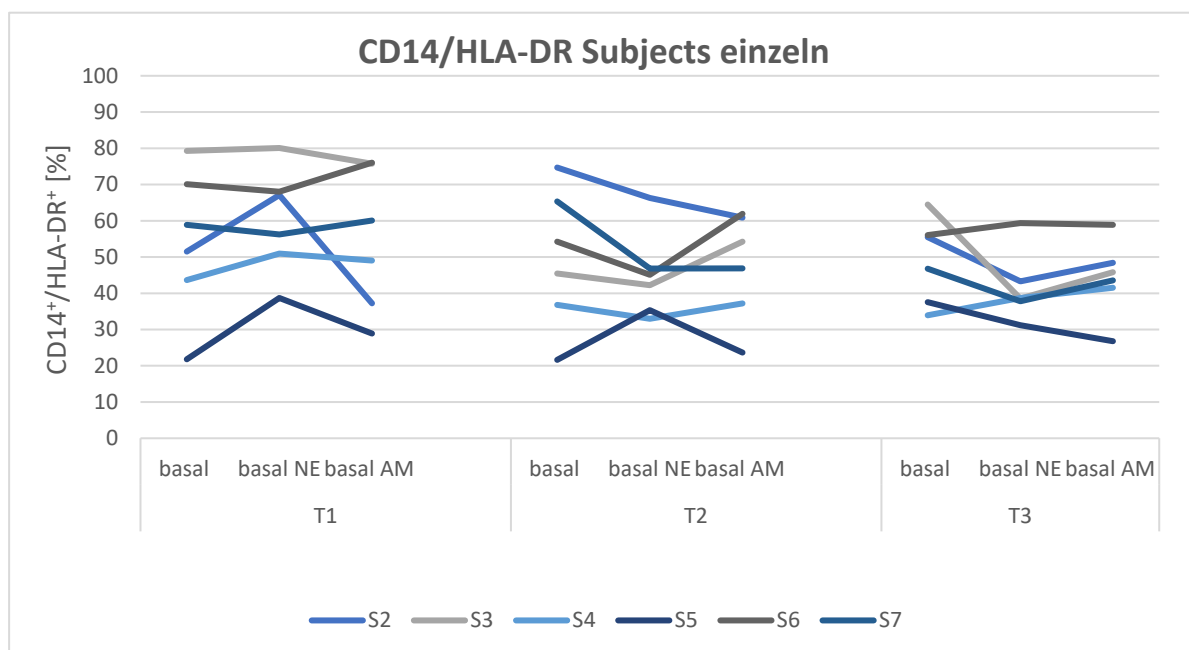


Abbildung 23 – CD14/HLA-DR-Expression basal

Durch HKLM wurde eine Erhöhung der HLA-DR-Expression zu allen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (Erhöhung der MW um 10-12%) induziert. Nach Einwirkung durch NE konnte über den Tagesverlauf ein Abfall der CD14/HLA-DR-Expression beobachtet werden.

AM zeigte keine eindeutigen Effekte (Abb. 27).

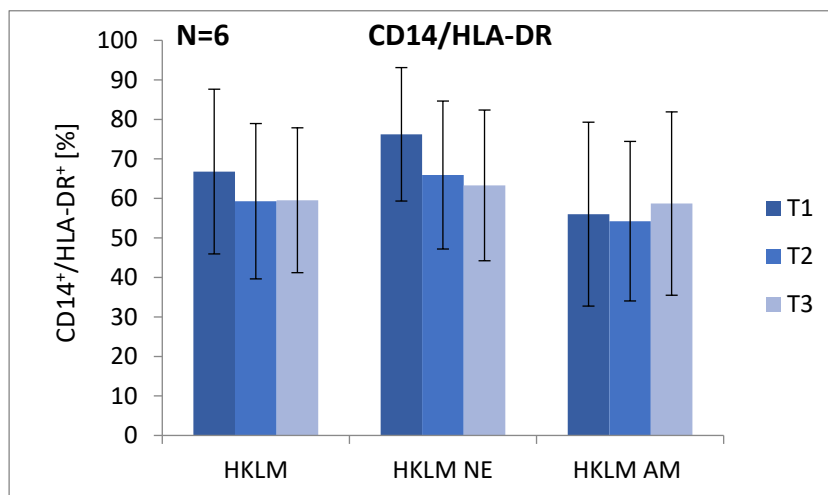


Abbildung 24 – CD14/HLA-DR-Expression nach HKLM-Inkubation

Die Erhöhung der Oberflächenexpression von HLA-DR durch *C. albicans* war im Mittel zu allen Zeitpunkten etwas effektiver als durch HKLM. Hier konnte ebenfalls eine stärkere Expression zu T1 beobachtet werden, sie fiel im Tagesverlauf ab.

Die Einwirkung von NE zeigte bei den mit *C. albicans* stimulierten Proben widersprüchliche Effekte, die meistens nur gering ausfielen. Im Mittel war auch hier ein Abfall der Expression im Tagesverlauf zu beobachten.

AM zeigte vor allem stimulierende Effekte auf die Expression, die zu T3 am stärksten ausfielen (Abb. 25).

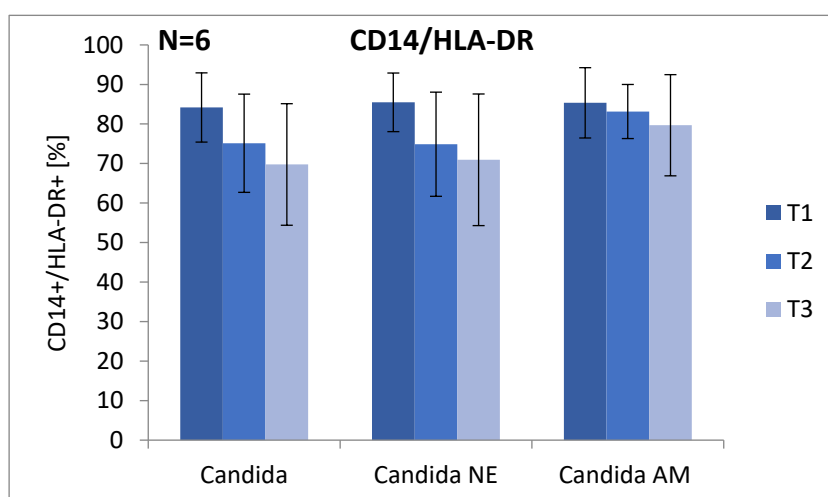


Abbildung 25 – CD14/HLA-DR-Expression nach Inkubation mit *Candida albicans*

In der ANOVA mit Messwiederholung konnten weder in der basalen CD14/HLA-DR-Expression, noch nach Stimulation durch HKLM und *C. albicans* statistisch signifikante Unterschiede gezeigt werden.

4.4.3 CD40

Aufgrund der geringen CD14/CD40-Expression konnten keine Aussagen über den Tagesverlauf getroffen werden. Auch bei den Ansätzen mit HKLM und *C. albicans* konnte jeweils nur eine minimale Stimulation beobachtet werden, deren geringe Ausprägung keine Aussagen zulässt.

Tabelle 10 - Mittelwerte der CD14/CD40-Expression

N=6 [%]	MW	SD	MW	SD	MW	SD
CD14/CD40	basal		HKLM		Candida	
T1	0,623	0,383	1,268	0,356	0,680	0,520
T2	0,595	0,286	0,780	0,766	0,767	0,495
T3	0,798	0,444	1,130	1,077	1,352	1,044
	basal NE		HKLM NE		Candida NE	
T1	0,433	0,357	0,848	0,464	0,792	0,505
T2	0,425	0,430	1,072	0,531	0,930	0,573
T3	0,535	0,436	0,977	0,980	1,355	1,170
	basal AM		HKLM AM		Candida AM	
T1	0,462	0,185	1,443	0,492	0,617	0,465
T2	0,700	0,469	1,502	0,864	1,282	0,933
T3	0,988	0,699	0,983	1,475	1,422	1,185

4.4.4 CD69

Zur basalen Expression von CD14/CD69 konnte aufgrund sehr niedriger Werte keine Aussage über Regelmäßigkeiten im Tagesverlauf getroffen werden. Zwei Proben zeigten Abweichungen nach oben (Daten nicht gezeigt).

Durch HKLM konnte die CD69-Expression tageszeitunabhängig stimuliert werden, teilweise mit Ausreißern nach oben. Es konnte eine Hemmbarkeit der stimulierten Proben durch NE und etwas effektiver durch AM beobachtet werden, welche sich ebenfalls tageszeitunabhängig präsentierten (Abb. 26).

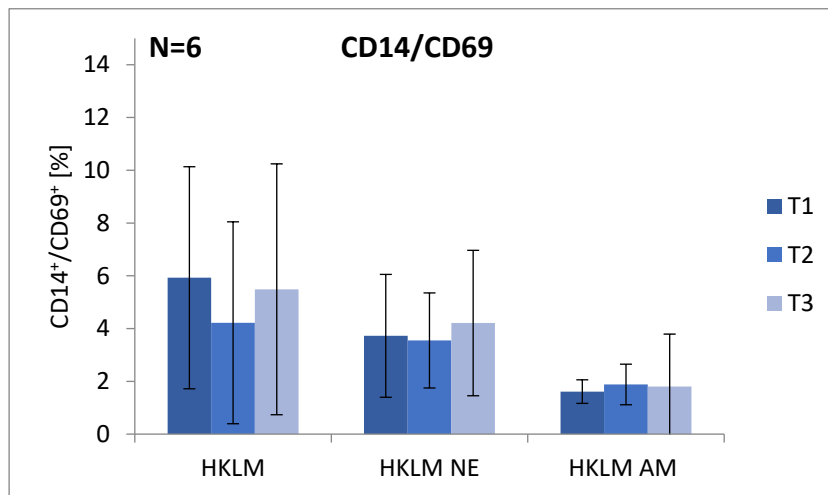


Abbildung 26 – CD14/CD69-Expression nach HKLM-Inkubation

Die Inkubation mit *C. albicans* zeigte nur eine sehr geringe Stimulation der CD14/CD69-Expression. Es konnte keine Aussage über Zirkadianität, sowie Effekte durch NE und AM getroffen werden.

4.4.5 CD80

Die basale Ausprägung der CD14/CD80-Expression zeigte sich sehr gering, sodass die Messwerte keine Vergleiche in Hinblick auf Zirkadianität zuließen (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation durch HKLM konnte bei der Hälfte der Probanden ein Peak zu T1 mit einem Abfall im Tagesverlauf beobachtet werden.

Die HKLM-stimulierten Proben zeigten zu allen Zeitpunkten eine Hemmbarkeit durch NE, welche zu T1 am effektivsten war. Durch AM konnte eine deutlichere Hemmung ausgelöst werden, welche sich zu allen Zeitpunkten ähnlich effektiv zeigte (Abb. 27).

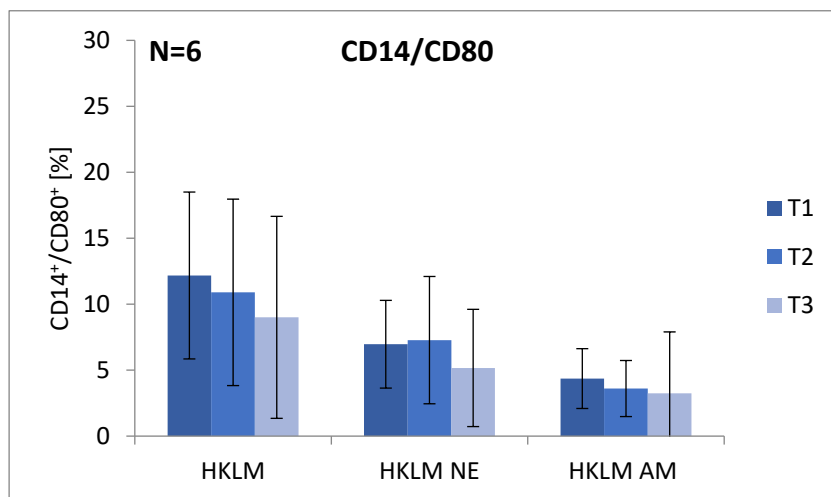


Abbildung 27 – CD14/CD80-Expression nach HKLM-Inkubation

Die CD14/CD80-Expression konnte durch *C. albicans* nur geringfügig beeinflusst werden. So weit bei der niedrigen Ausprägung beurteilbar zeigten sich durch NE und AM vor allem hemmende Effekte.

Tabelle 11 – Basalwerte der CD14/CD80-Expression im Vergleich zu mit *Candida albicans* inkubierten Ansätzen

	MW	SD	MW	SD
CD14/CD80	basal		Candida	
T1	0,930	0,645	1,715	0,757
T2	0,868	0,839	2,392	1,612
T3	0,787	0,655	2,352	2,009
	basal NE		Candida NE	
T1	0,438	0,220	0,922	0,435
T2	0,717	0,284	1,848	0,696
T3	0,960	0,431	1,268	0,594
	basal AM		Candida AM	
T1	0,682	0,524	0,692	0,402
T2	0,740	0,514	1,582	0,856
T3	1,888	1,933	1,813	1,496

4.5 Lymphozyten

4.5.1 CD28

Die basale CD28-Expression auf CD4-positiven Zellen betrug bei allen Probanden fast 100%.

Über den Tagesverlauf zeigten sich die Werte stabil.

Es konnten weder unter NE noch unter AM Veränderungen beobachtet werden (Abb. 28).

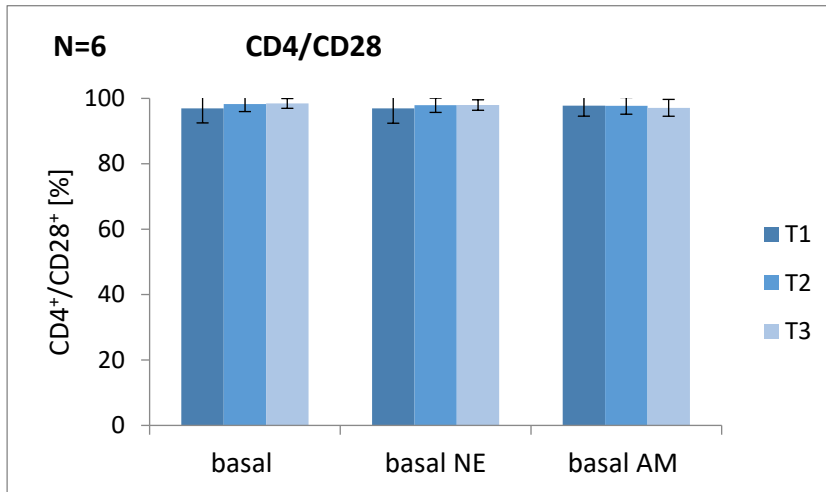


Abbildung 28 – CD4/CD28-Expression basal

Durch HKLM und *C. albicans* konnte keine weitere Stimulation der CD28-Expression ausgelöst werden. Auch hier zeigten sich keine Veränderungen durch NE und AM.

Die basale CD28 Expression auf CD8-positiven Zellen betrug im Mittel um die 65%. Über den Tagesverlauf zeigten sich keine Veränderungen (Abb. 29).

Es konnten keine Regelmäßigkeiten bei den Effekten durch NE und AM beobachtet werden.

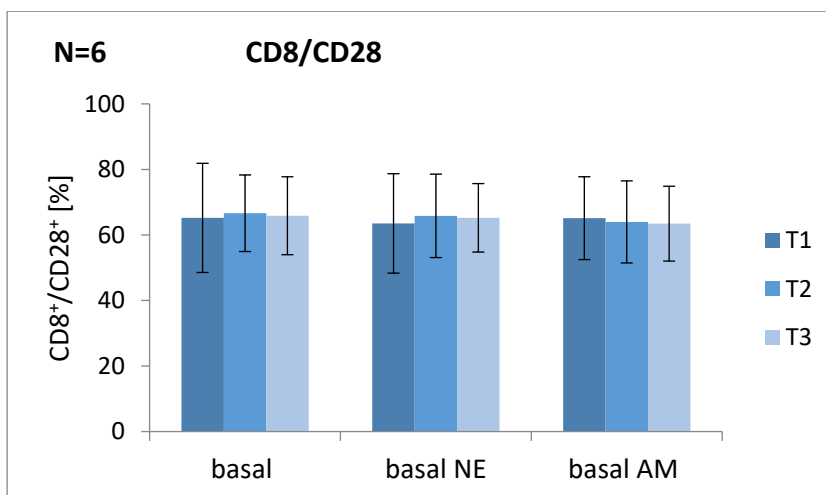


Abbildung 29 – CD8/CD28-Expression basal

Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine Stimulation oder Hemmung durch HKLM ausgelöst werden. Über den Tagesverlauf zeigten sich die Werte auch hier stabil, jedoch waren zu T2 bei den meisten Probanden die CD28-Expression sehr leicht verringert.

Auch hier konnten keine eindeutigen Veränderungen durch NE oder AM beobachtet werden, lediglich zu T1 zeigten zwei der mit AM versetzten Proben deutlich niedrigere Werte (Daten nicht gezeigt).

4.5.2 CD152

Aufgrund eines Fehlers bei der Auswertung konnten bei S2 und S3 keine Daten zur CD152-Expression erhoben werden (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von CD152 auf CD4- und CD8-positiven Zellen betrug bei fast allen Proben, auch nach Einwirkung durch HKLM und *C. albicans*, unter 1%. Es konnten keine Veränderungen durch NE und AM beobachtet werden.

4.6 Zytokinspiegel der DTH-Ansätze

4.6.1 Tumor-Nekrose-Faktor alpha

Die Messwerte der Basalkonzentrationen von TNF befanden sich zwischen 3,99 pg/ml und 45,05 pg/ml. Sie zeigten große interindividuelle Variabilitäten (S6 und S7 zeigten niedrigere Basalwerte). Im Tagesverlauf unterlagen sie nur leichten Schwankungen, bei der Hälfte der Probanden zeigte sich ein Peak zu T2. Es konnte keine deutliche Hemmbarkeit oder Stimulierbarkeit der TNF-Spiegel durch NE und AM beobachtet werden, lediglich S2 und S7 zeigten zu T3 höhere Spiegel nach Inkubation durch NE (Abb. 30).

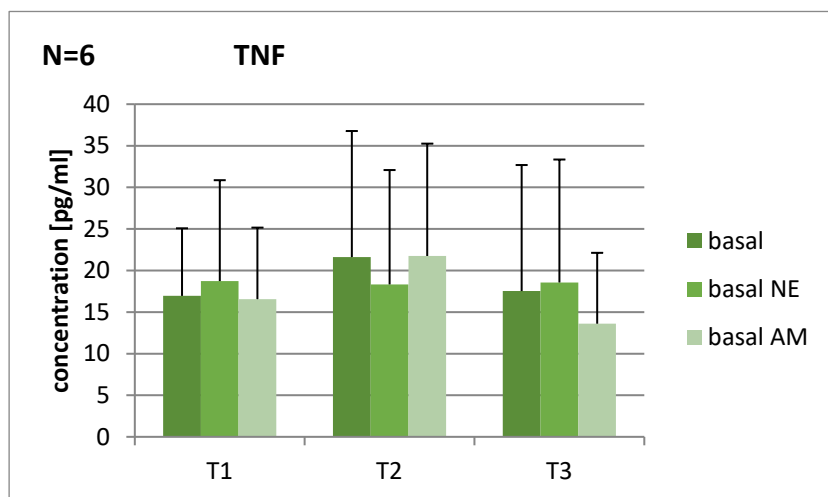


Abbildung 30 – Basalkonzentration TNF

Die TNF-Sekretion konnte zu allen drei Zeitpunkten stark durch HKLM stimuliert werden, bei den allen bis auf S7 fiel die Stimulation zu T2 geringer aus als zu T1 und T3. Es konnte eine deutliche Hemmbarkeit durch NE beobachtet werden, welche zu T1 im Mittel am stärksten ausgeprägt war. Bei allen Probanden waren nach Stimulation durch HKLM und Hemmung durch NE die Spiegel zu T1 am niedrigsten und zu T3 am höchsten.

Die Hemmung durch AM zeigte sich am stärksten ausgeprägt. Bei den meisten Probanden waren die Messwerte zu T3 etwas höher als zu T1 und T2 (Abb. 31).

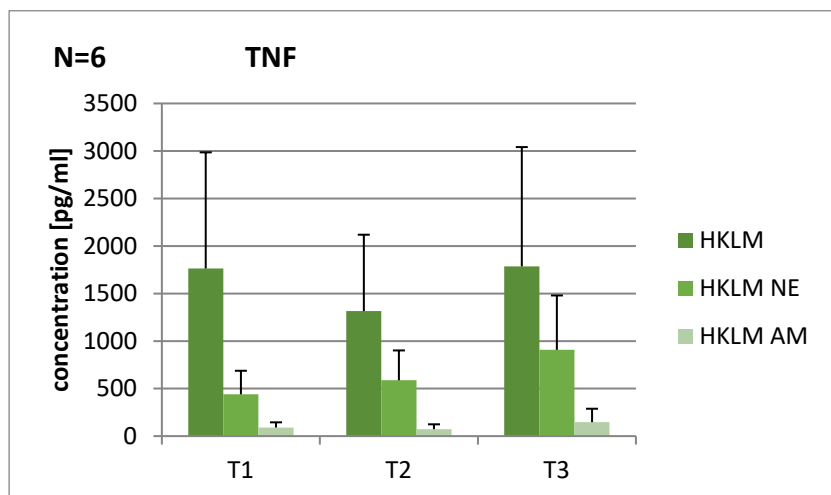


Abbildung 31 – Konzentration TNF nach HKLM-Inkubation

Die Stimulation durch *Candida albicans* fiel bei allen Probanden deutlich geringer aus im Vergleich zur der durch HKLM. Die Werte fielen im Mittel über den Tagesverlauf ab, bei 4 von 6 Probanden konnte ein Peak zu T1 beobachtet werden.

Bei den meisten durch *C. albicans* stimulierten Proben konnte bei eine leichte Hemmung durch NE festgestellt werden, bei S2 zu T1 und T3 sowie bei S5 zeigte sich jedoch zu allen Zeitpunkten eine deutliche Stimulation.

AM zeigte zu allen Zeitpunkten einen hemmenden Effekt mit der größten Differenz zu T1 (Abb. 32).

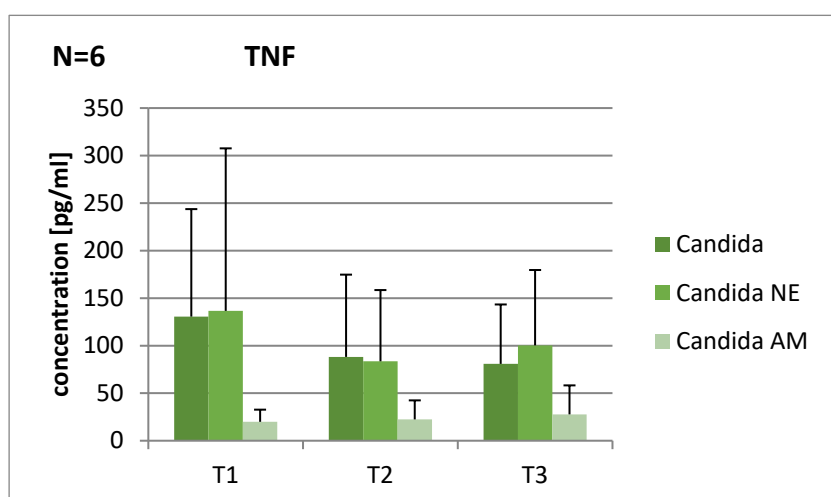


Abbildung 32 – Konzentration TNF nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.6.2 Interferon gamma

Die Basalkonzentrationen von IFN- γ befanden sich zwischen 20,87 pg/ml und 247,04 pg/ml. S6 und S7 zeigten zu allen Zeitpunkten niedrigere Basalwerte als die anderen Probanden. Die Hälfte der Probanden zeigte einen Peak der IFN- γ Spiegel zu T3.

Es konnte keine effektive Hemmung durch NE oder AM beobachtet werden (Abb.33), lediglich S5 zeigte zu T3 deutlich niedrigere Werte bei den mit NE und AM versetzten Proben.

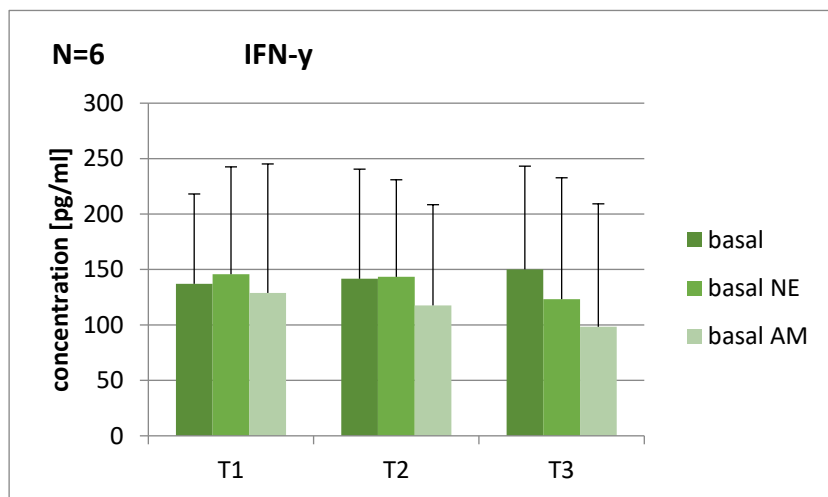


Abbildung 33 – Basalkonzentration IFN- γ

Unter Einfluss von HKLM konnte ein sehr starker Anstieg der IFN- γ -Spiegel beobachtet werden, die meisten Werte wurden mit deutlich über 1000 pg/ml gemessen.

Die Stimulierbarkeit zeigte sich bei den meisten Probanden in der zweiten Tageshälfte effektiv, bis auf einen zeigte sich entweder zu T2 oder T3 ein Peak der IFN- γ -Konzentration.

Zu allen Zeitpunkten konnte eine sehr effektive Hemmung durch NE beobachtet werden, lediglich zu T3 wurden bei S2 höhere Werte gemessen im Vergleich zur Probe ohne NE.

AM bewirkte bei allen Probanden zu allen Zeitpunkten eine starke Hemmung, die Werte zeigten sich ähnlich wie die Basalwerte (Abb. 34).

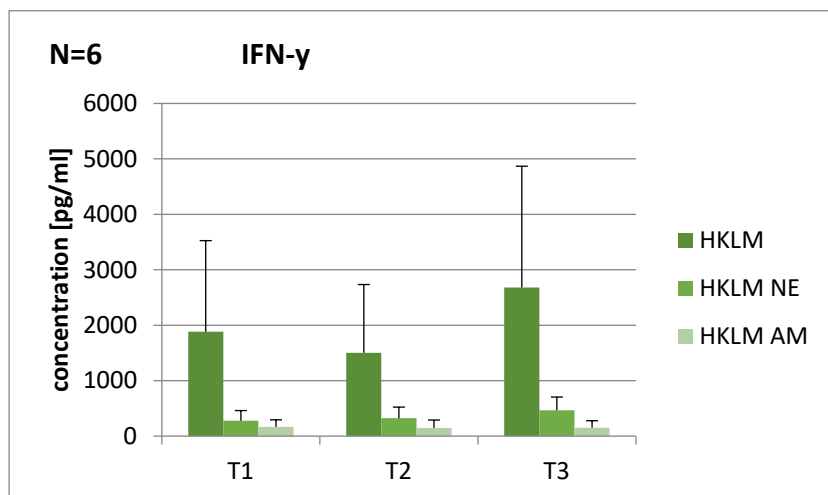


Abbildung 34 – Konzentration IFN- γ nach HKLM-Inkubation

Unter Einfluss von *C. albicans* konnte keine Erhöhung der IFN- γ -Spiegel beobachtet werden, es zeigte sich jedoch ein Abfall der Mittelwerte über den Tagesverlauf (Abb. 35).

Nach Einwirkung von NE und AM zeigten zu T1 und T3 erniedrigte Spiegel, zu T2 zeigten sich widersprüchliche Tendenzen bei den einzelnen Probanden.

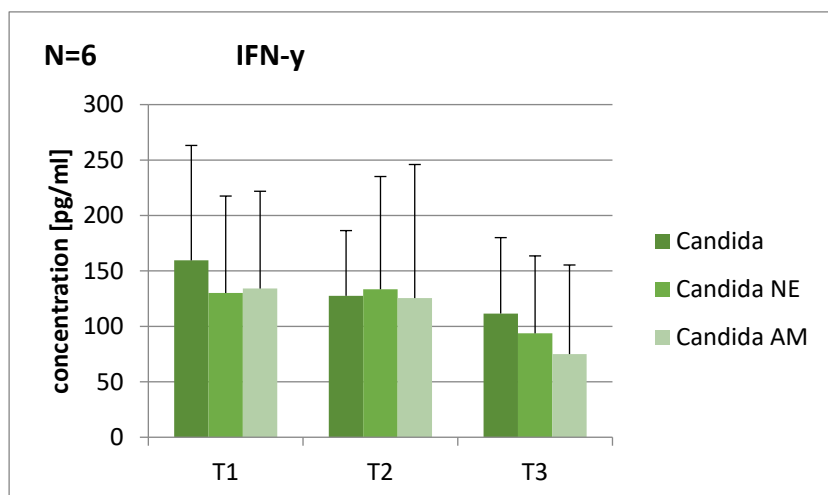


Abbildung 35 – Konzentration IFN- γ nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.6.3 Interleukin 2

Die basalen Konzentrationen von IL-2 zeigten bei den Probanden zu allen Zeitpunkten nur leichte Schwankungen, sie befanden sich zwischen 11,18 pg/ml und 20,44 pg/ml. Durch NE und AM konnten bei den unstimulierten Proben keine eindeutige Hemmung oder Stimulation beobachtet werden.

Es konnte zu allen Zeitpunkten eine Erhöhung der IL-2-Spiegel durch HKLM ausgelöst werden. In der Stimulierbarkeit konnten zwar keine Regelmäßigkeiten im Tagesverlauf beobachtet werden. Die IL-2-Sekretion konnte zu allen Zeitpunkten durch NE und AM gehemmt werden, die Hemmung durch AM zeigte sich effektiver (Abb. 36).

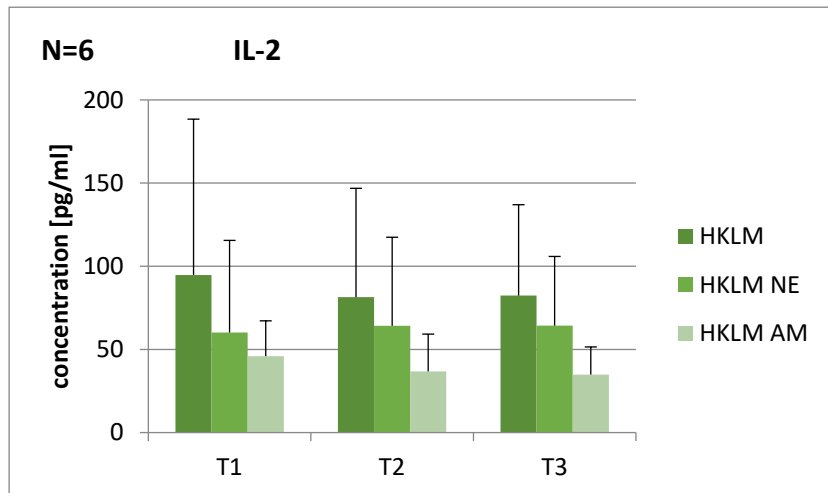


Abbildung 36 – IL-2-Konzentration nach HKLM-Inkubation

Die Stimulation durch *C. albicans* war zu allen Zeitpunkten etwas effektiver als durch HKLM. Die durch *C. albicans* stimulierten Ansätze zeigten zu allen Zeitpunkten eine leichte Hemmung der IL-2-Spiegel durch NE und eine stärkere durch AM (Abb. 37).

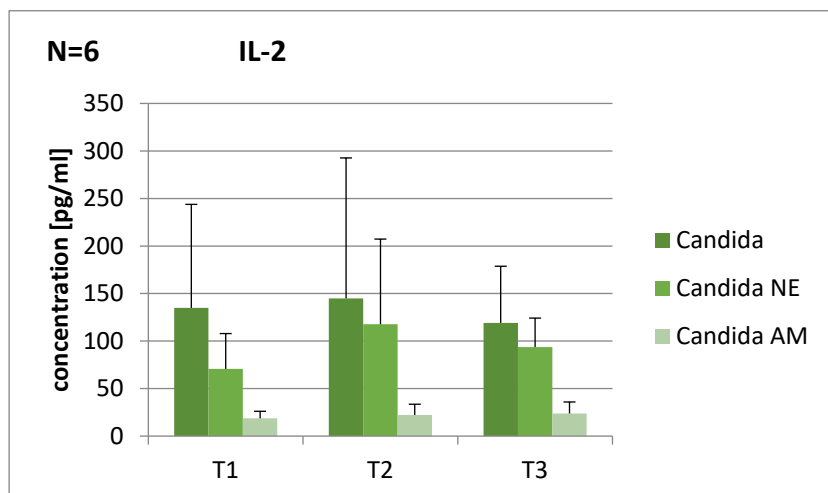


Abbildung 37 – IL-2-Konzentration nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.6.4 Interleukin 4

Die IL-4-Basalspiegel wurden zwischen 16,75 pg/ml und 34,16 pg/ml gemessen. Über den Tagesverlauf zeigten sich nur leichte Schwankungen, die keine Regelmäßigkeiten aufwiesen (Abb. 38). Durch NE konnten keine eindeutigen Effekte bei den unstimulierten Proben gezeigt werden, AM hatte bei einigen Probanden stimulierende Effekte.

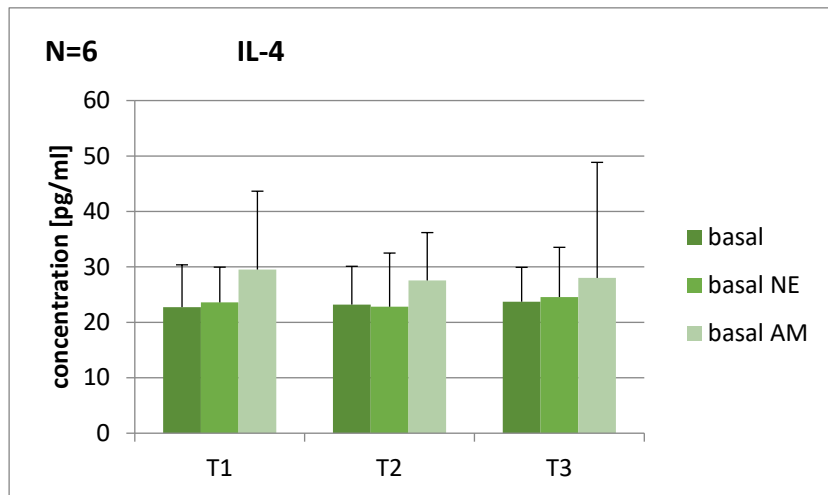


Abbildung 38 – IL-4-Konzentration basal

Die IL-4- Sekretion konnte zu allen Zeitpunkten effektiv durch HKLM induziert werden, NE bewirkte eine leichte Hemmung der IL-2 Sekretion, wohingegen AM bei ungefähr der Hälfte der Ansätze zu einer deutlichen Erhöhung der IL-2 Konzentration führte, bei den anderen zu einer Hemmung.

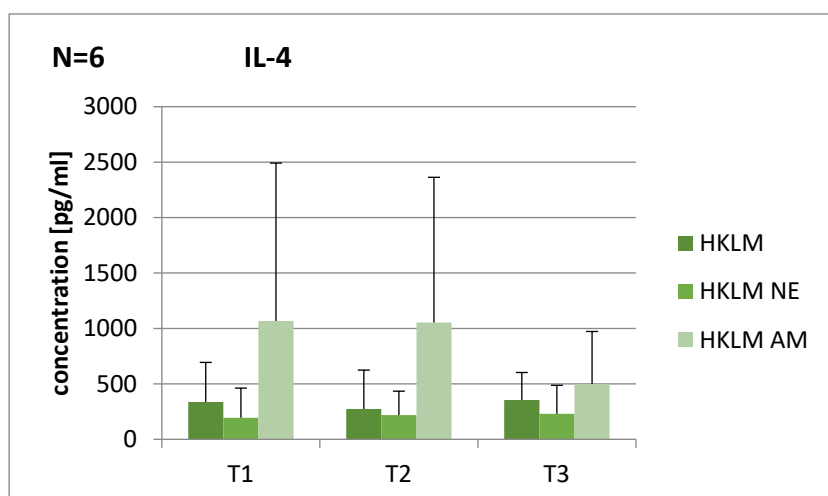


Abbildung 39 – IL-4-Konzentration nach HKLM-Inkubation

Candida albicans bewirkte eine stärkere Konzentrationerhöhung als HKLM, besonders zu T1 war diese sehr ausgeprägt. Die Effekte durch NE zeigten sich indifferent, so konnte zu T1 eine eindeutige Hemmung beobachtet werden, zu T2 bei 4 Proben ebenfalls, während bei 2 Proben eine Stimulation des IL-4-Spiegels beobachtet wurde. Zu T3 zeigte sich bei 4 Proben eine Stimulierbarkeit durch NE und bei 2 eine Hemmung. Unter AM konnten zu allen Zeitpunkten eindeutig hemmende Effekte beobachtet werden, der Effekt war zu T1 am stärksten ausgeprägt (Abb. 40).

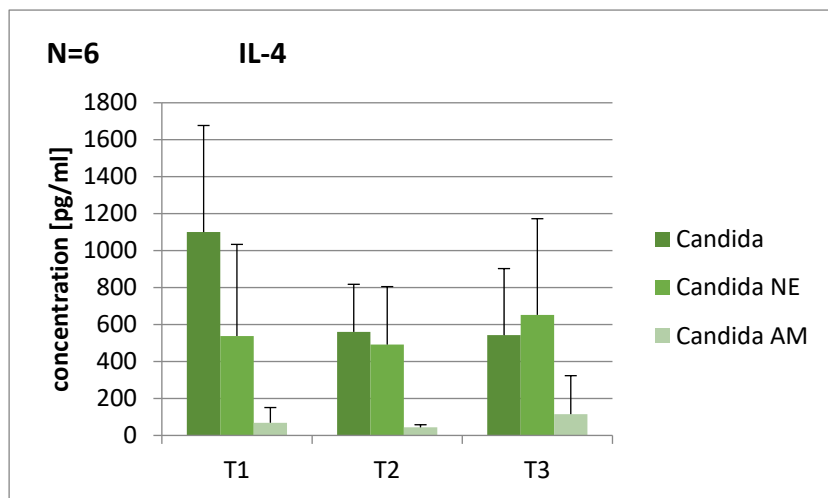


Abbildung 40 – IL-4-Konzentration nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.6.5 Interleukin 6

Die Konzentrationen von IL-6 betrugen basal zwischen 11,77 pg/ml und 22,07 pg/ml, sie zeigten lediglich leichte zirkadiane Variationen (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation der IL-6- Sekretion war zu allen Zeitpunkten nach HKLM-Einwirkung besonders stark, die meisten Werte waren über 15.000 pg/ml. Über den Tag konnten keine Regelmäßigkeiten in den Schwankungen beobachtet werden.

Durch NE konnten keine eindeutigen Effekte festgestellt werden, es zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine deutliche Hemmbarkeit durch AM (Abb. 41).

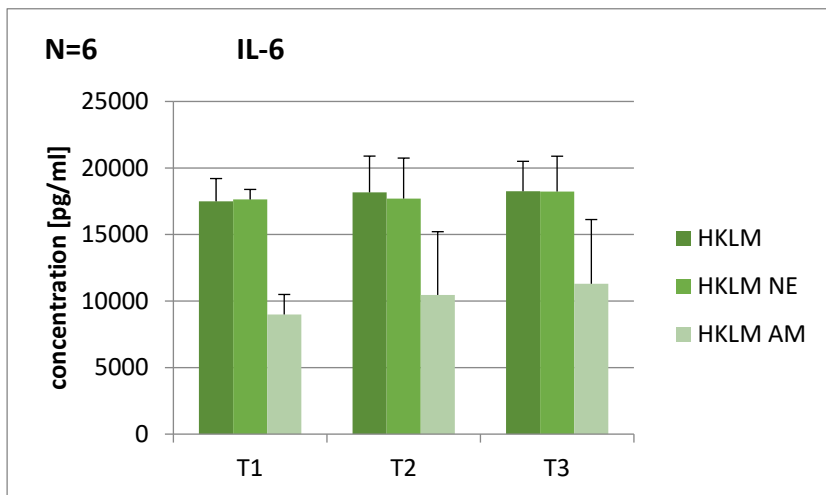


Abbildung 41 – IL-6-Konzentration nach HKLM-Inkubation

Unter Einwirkung von *C. albicans* stiegen die IL-6-Spiegel deutlich an, jedoch nicht so ausgeprägt wie unter HKLM. Es zeigten sich große Variabilitäten zwischen den Probanden und Zeitpunkten.

NE zeigte zu allen Zeitpunkten vor allem stimulierende Effekte, AM zeigte zu allen Zeitpunkten eine sehr effektive Hemmung der IL-6-Spiegel, es konnten keine Regelmäßigkeiten im Tagesverlauf festgestellt werden (Abb. 42).

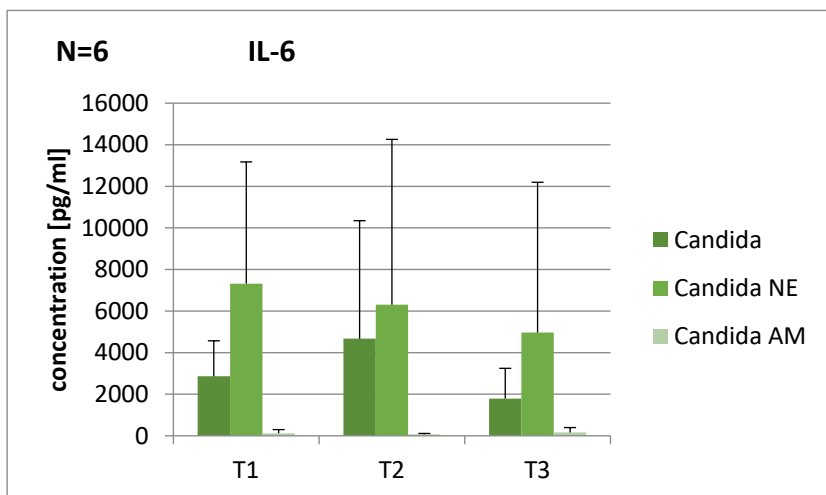


Abbildung 42 – IL-6-Konzentration nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.6.6 Interleukin 10

Die Basalspiegel von IL-10 befanden sich zwischen 3,99 pg/ml und 17,32 pg/ml. Es konnten keine Regelmäßigkeiten der zirkadianen Schwankungen beobachtet werden.

Die Effekte von NE und AM zeigten sich indifferent (Daten nicht gezeigt).

Durch HKLM konnte die Sekretion von IL-10 zu allen Zeitpunkten stark stimuliert werden. NE zeigte sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte. Durch AM konnte eine Hemmung bewirkt werden, diese war zu T2 weniger ausgeprägt (Abb. 43).

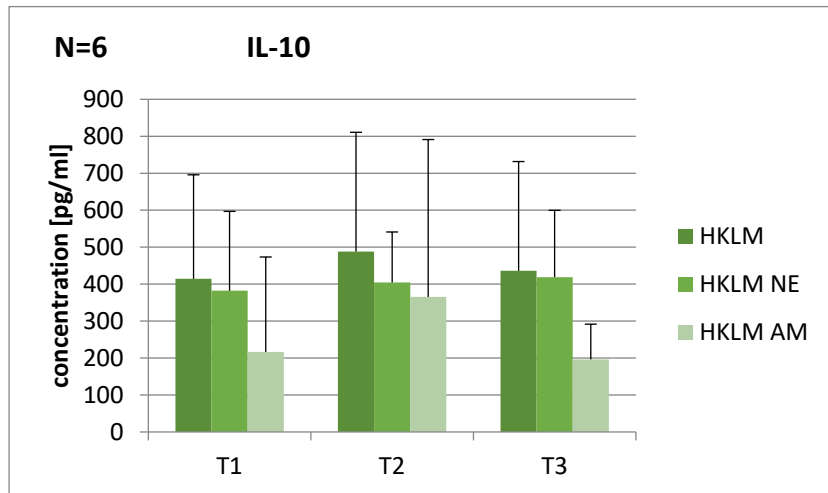


Abbildung 43 – IL-10-Konzentration nach HKLM-Inkubation

C. albicans bewirkte eine leichte Stimulation der IL-10- Sekretion. Die Effekte durch NE waren auch hier nicht eindeutig. AM bewirkte zu allen Zeitpunkten eine effektive Hemmung (Abb. 44), die Werte befanden sich auf dem Niveau der Basalwerte.

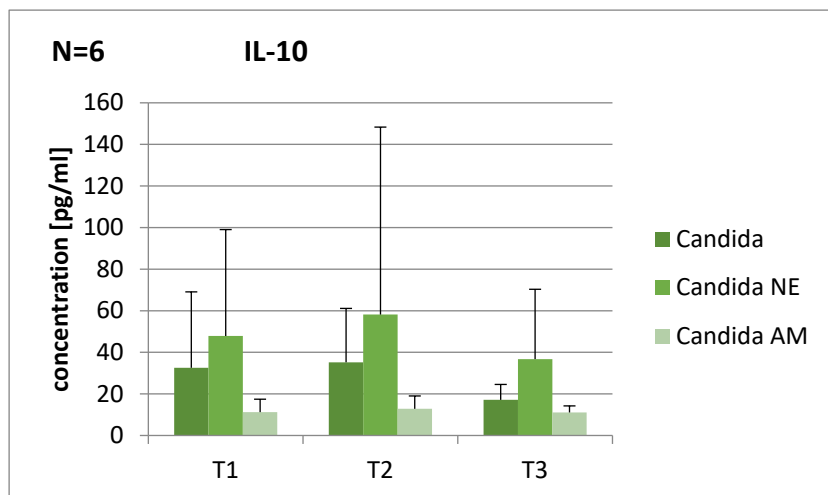


Abbildung 44 – IL-10-Konzentration nach Inkubation mit *Candida albicans*

4.7 Steroidspiegel

4.7.1 Cortisol und Cortison

Die Speichelkonzentrationen von Cortisol und Cortison zeigten erwartungsgemäß zu T1 die höchsten Werte und fielen über den Tagesverlauf ab (Abb. 45).

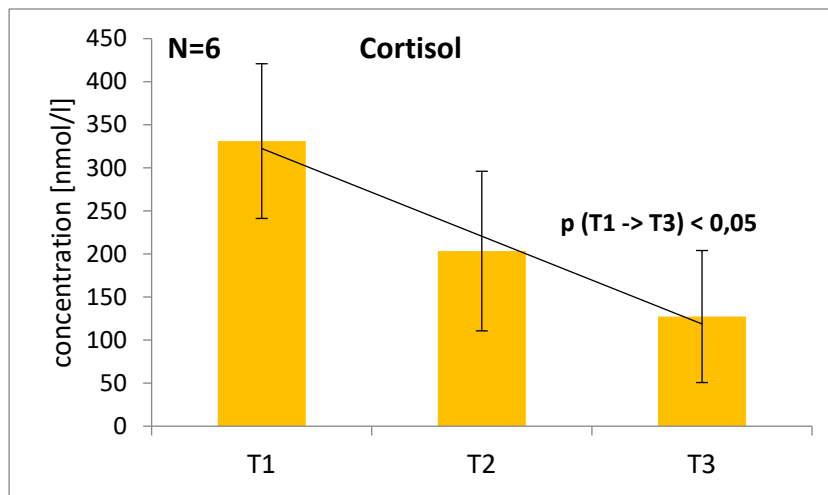


Abbildung 45 – Speichelcortisol

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte, dass die Mittelwerte der Cortisolspiegel sich statistisch signifikant unterschieden, $F(1.68, 8.42) = 8.11$, $p = 0.013$. Die Bonferroni-korrigierten paarweisen Vergleiche zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen T1 und T3, 95%-CI(27.88, 379.54) Mittlere Differenz = 203.71, $p = 0.028$.

Die Cortisonspiegel zeigten bei der ANOVA mit Messwiederholung zeigten nach Greenhouse-Geisser-Korrektur keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(1.26, 6.32) = 4.61$, $p = 0.068$.

4.7.2 Androstendion

Die Konzentrationen des Steroids Androstendion zeigten wie im folgenden Diagramm aufgezeigt bei allen Probanden einen Abfall von T1 zu T3, bei 4 der Probanden konnte ein Peak zu T1 beobachtet werden, bei S4 und S5 zeigte sich ein Peak zu T2 (Abb. 46).

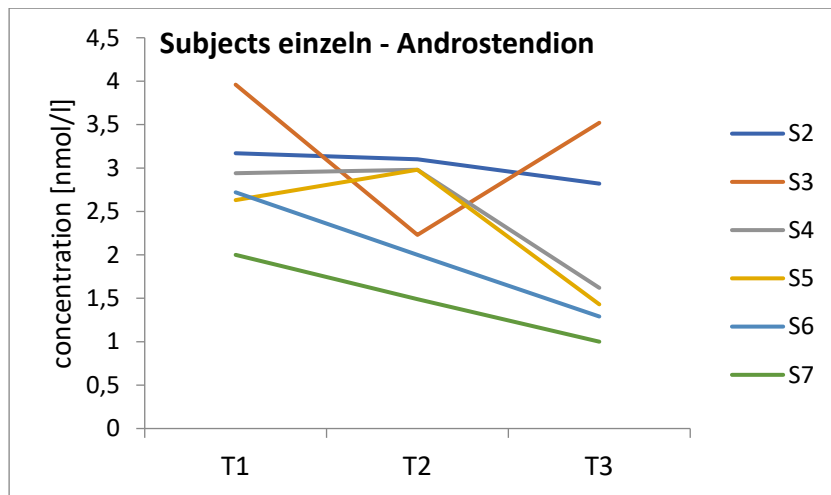


Abbildung 46 – Speichelandrostendion Probanden einzeln

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(1.22, 6.11) = 4.62, p = 0.070$.

4.7.3 Testosteron

Die Testosteronspiegel zeigten bei den meisten Probanden über den Tagesverlauf nur leichte Schwankungen (Daten nicht gezeigt).

4.8 Endocannabinoide

4.8.1 2-AG

Die Spiegel des Endocannabinoids 2-AG zeigten bei den meisten Probanden einen Peak zu T2, bei S3 konnte jedoch ein Nadir bei T2 beobachtet werden und die 2-AG-Spiegel von S4 fielen im Tagesverlauf ab. Bei der Hälfte der Probanden waren die Werte zu T3 höher als zu T1, bei der anderen Hälfte umgekehrt (Abb. 47).

Die Plasmakonzentrationen befanden sich zwischen 9,08 ng/ml und 31,5 ng/ml und zeigten damit die Werte im Vergleich zu den anderen gemessenen Endocannabinoiden.

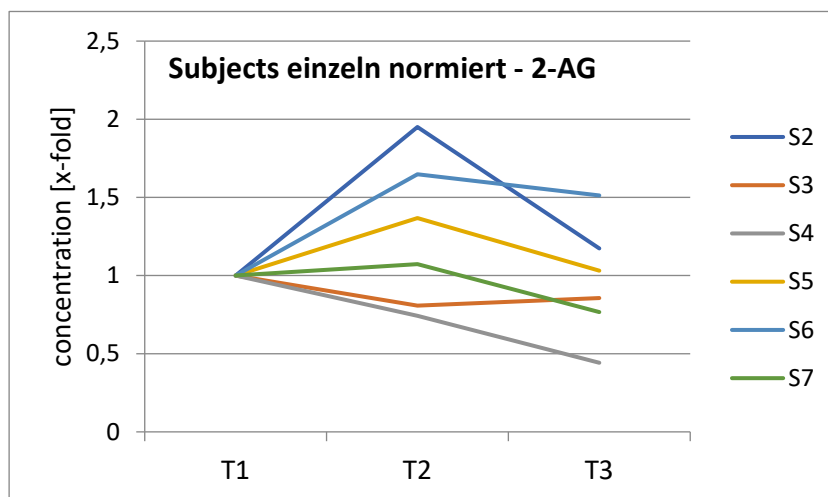


Abbildung 47 – 2-AG-Konzentrationen auf T1 normiert

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Mittelwerte der 2-AG-Spiegel zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(1.32, 6.62) = 1.48$, $p = 0.278$.

4.8.2 AEA

Die Konzentrationen von AEA zeigten im Tagesverlauf unterschiedliche Verläufe. Bei einer Hälfte konnte ein Peak zu T2 beobachtet werden, bei S3 und S5 ein Nadir und bei S7 ein kontinuierlicher Abfall über den Tagesverlauf (Abb. 48). Die meisten Probanden zeigten am Abend ähnlich hohe oder nur leicht geringere AEA-Spiegel im Vergleich zum Morgen. Es wurden Werte von 0,17 ng/ml bis 0,48 ng/ml gemessen.

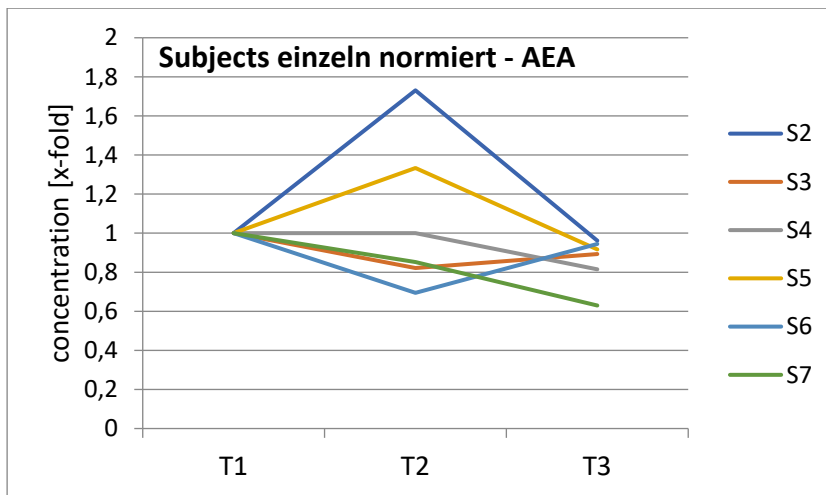


Abbildung 48 – AEA-Konzentrationen auf T1 normiert

Die ANOVA mit Messwiederholung (Sphärizität angenommen) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Mittelwerte der AEA-Spiegel zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(2, 10) = 1.26, p = 0.324$.

4.8.3 SEA

Die Messwerte zu SEA zeigten ähnlich wie bei 2-AG bei 4 von 6 Probanden einen Peak zur Mittagszeit (Abb. 49). Bei S3 und S6 wurde ein Peak zu T1 gemessen und ein Nadir zu T2. Die Werte zu T1 und T3 waren bei den meisten ähnlich hoch mit leichten Abweichungen nach oben oder unten.

Die Messwerte befanden sich zwischen 0,83 ng/ml und 1,7 ng/ml.

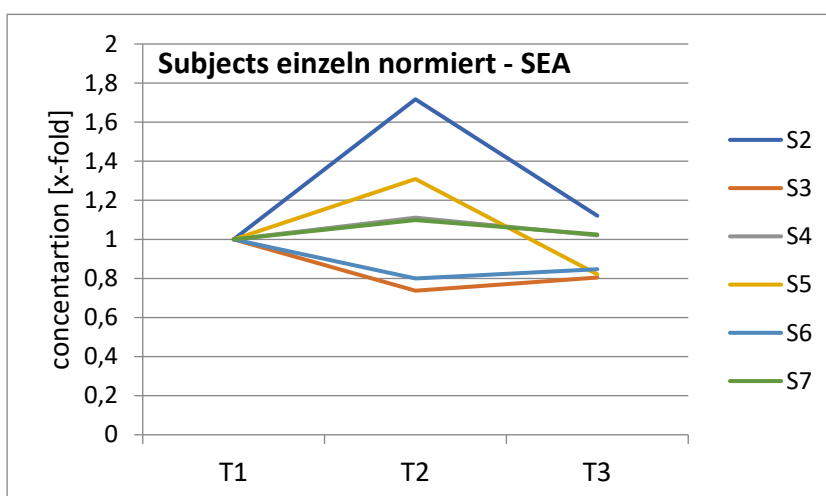


Abbildung 49 – SEA-Konzentrationen auf T1 normiert

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Mittelwerte der SEA-Spiegel zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(1.2, 6) = 1.43, p = 0.286$.

4.8.4 OEA

Die OEA-Spiegel zeigten bei allen Probanden bis auf S4 zu T3 niedrigere Werte als zu T1. Bei S2 und S5 konnte ein Peak zu T2 beobachtet werden, die Werte von S4 blieben konstant, S3 und S6 zeigten einen Nadir zu T2 (Abb. 50). Die Messwerte lagen zwischen 0,74 ng/ml und 1,64 ng/ml

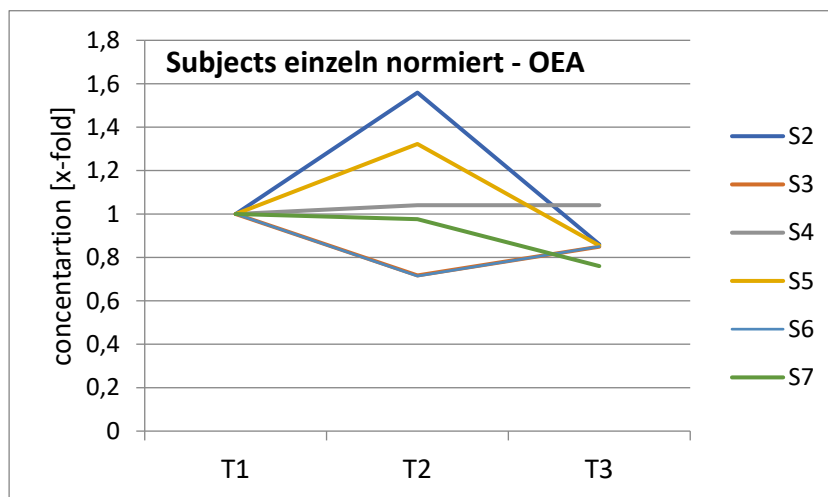


Abbildung 50 – OEA-Konzentrationen auf T1 normiert

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Mittelwerte der OEA-Spiegel zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(1.14, 5.68) = 1.35, p = 0.299$.

4.8.5 PEA

Die Messwerte der meisten Probanden zeigten zu T3 etwas niedrigere Werte als zu T1. S4 zeigte nur einen Abfall um 0,08 ng/ml, bei S7 konnte zu T3 ein stärkerer Abfall im Vergleich zu den Anderen beobachtet werden. 2 Probanden zeigten zu T2 einen Peak, 2 Probanden einen Nadir, 2 hatten zu T2 ähnliche Werte wie zu T1 (Abb. 51).

Die Messwerte lagen zwischen 1,71 ng/ml und 3,0 ng/ml.

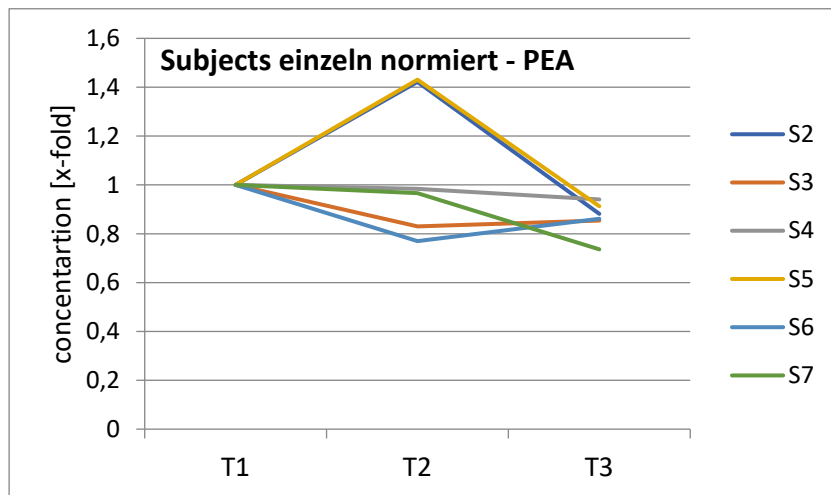


Abbildung 51 – PEA-Konzentrationen auf T1 normiert

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Mittelwerte der PEA-Spiegel zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, $F(1.13, 5.65) = 2.24$, $p = 0.190$.

5. Diskussion

5.1 Hauptfragestellung

Die Hypothese dieser Diplomarbeit konnte teilweise bestätigt werden. In der experimentellen Studie wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass es auf zellulärer Ebene durchaus zirkadiane Variationen der Basalausprägung sowie der Hemmbarkeit und Stimulierbarkeit durch Antigene bzw. Norepinephrin und selektive CB2-Agonisten gibt. Darunter fallen die H₂O₂-Produktion neutrophiler Granulozyten, die Expression der Oberflächenmoleküle von Monozyten und die Hemmbarkeit und Aktivierbarkeit der Zytokine.

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Studie bei einigen Parametern gezeigt werden, dass sie sich über den Tagesverlauf stabil zeigten. An dieser Stelle sind besonders die Ergebnisse der Lymphozyten zu nennen. Außerdem zeigten sich die Basalwerte der Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 tagsüber stabil.

Wie aus der Literatur bereits bekannt (Chan and Debono, 2010b; Schmidt, Lang and Heckmann, 2010), konnte bei den gemessenen Steroiden ein Abfall über den Tag beobachtet werden. Lediglich bei den Testosteronspiegeln, bei welchen nur leichte zirkadiane Schwankungen gemessen wurden, entsprachen nicht dem erwarteten Abfall über den Tagesverlauf, wie in der Literatur beschrieben (Bribiescas and Hill, 2010).

5.1 Probandenkollektiv

Bei den Probanden wurden in Blutbild und IMK keine Hinweise auf aktuelle Infektionen oder Immunschwächen gefunden. Alle Werte der IMK-Messungen entsprachen den vom Hersteller vorgegebenen Normwerten (BD Biosciences, 2015). Die Abweichungen der Messung S7 können als Mess- oder Färbungsfehler interpretiert werden, da ein hoher Anteil ungefärbter Bestandteile gemessen wurde.

Bei Proband S2 und S5 konnten bei der Auswertung der Daten keine regelmäßigen Abweichungen festgestellt werden, die auf die Allergien zurückführbar wären. Bei weiteren Laborstudien mit einer höheren Probandenzahl könnte man Probanden mit Allergien eventuell als eigene Gruppe beobachten, um für zukünftige Studien sicher sagen zu können, ob man dies als Ausschlusskriterium setzen sollte.

5.2 Leukozyten

5.2.1 Neutrophile Granulozyten

Die Grundaktivität der neutrophilen Granulozyten nahm laut den gemessenen Daten im Mittel ab, während die Aktivierbarkeit durch TNF/fMLP über den Tag zunahm. Möglicherweise könnte die vermehrte Aktivität in der ersten Tageshälfte mit den höheren physiologischen Steroidspiegeln zusammenhängen, da nach derzeitigem Wissensstand Neutrophile Granulozyten durch Steroide und Kathecholamine mobilisiert werden (Strewe *et al.*, 2015).

5.2.2 Monozyten

CD14/CD16

Bei der Auswertung der Expression der Oberflächenmoleküle CD14/CD16 auf Monozyten konnte beobachtet werden, dass zwar die basalen Anteile der ausgereiften Monozyten über den Tag konstant blieben, jedoch in der ersten Tageshälfte eine deutlichere Hemmung durch NE und AM stattfand. Dies könnte mit den morgens und mittags physiologisch höheren Basalspiegel der Endocannabinoide zusammenhängen, dessen hemmende Wirkung durch NE und AM im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung verstärkt wird. Zu dieser Theorie widersprüchlich wäre die vermehrte Stimulierbarkeit durch HKLM in der ersten Tageshälfte.

CD14/TLR-2

Entgegen den Erwartungen unserer Hypothese zeigte sich vor allem in der ersten Tageshälfte eine erhöhte TLR-2-Expression. Auch die Stimulation durch *Candida albicans* war effektiver als durch HKLM, obwohl laut Literatur (Schmidt, Lang and Heckmann, 2010) TLR-2 vor allem auf bakterielle Peptidoglykane reagiere. Dies scheint jedoch nicht die Expression des Rezeptors zu stimulieren.

CD14/HLA-DR

In dieser Studie zeigte sich morgens eine höhere HLA-DR-Expression, was im Widerspruch zu der Aussage von Lukaszewicz, Faivre and Payen, 2010, steht, dass niedrige HLA-DR-Expressionen mit hohen Cortisolspiegeln assoziiert wurden. In diesem Artikel wurde auch von Assoziationen hoher IL-10-Spiegel mit niedrigen HLA-DR-Spiegeln berichtet. Dass unter HKLM-Inkubation die IL-10-Spiegel sehr viel höher ansteigen als unter *C. albicans* und sich die Dynamik bei HLA-DR gegenläufig zeigt, könnte dort durchaus in Zusammenhang stehen. Da *in vivo*

noch weitere Einflussgrößen wie andere pro- und antiinflammatorische Zytokine im Spiel sind, könnte der Cortisolspiegel möglicherweise nicht die dominante Größe in diesem Zusammenhang sein oder der Effekt könnte dosisabhängig sein. Dies könnte man möglicherweise in vitro näher beobachten und den Einfluss verschiedener Cortisolkonzentrationen auf die HLA-DR-Expressionen direkt untersuchen, auch im Zusammenhang mit Zytokinen.

5.2.5 Lymphozyten

Die erhobenen Ergebnisse zeigten, dass die Expression von CD28 und 152 auf CD4- und CD8-positiven Zellen über den Tagesverlauf sich eher stabil verhielten. Anteilig konnte in den Daten dieser Arbeit eine höhere CD28-Expression als bei Esensten *et al.*, 2016, gemessen. Auch konnte durch Einsatz von Antigenen keine Veränderung der Expression beobachtet werden. So scheint die zirkadian variierende Anzahl an Lymphozyten in der Blutbahn, welche in anderen Studien beobachtet wurde (Druzd *et al.*, 2017), nicht mit der Expression der Oberflächenmoleküle CD28 und CD152 auf CD4- und CD8-positiven Lymphozyten zusammenzuhängen.

Die Auswertungen der Expression der Oberflächenmarker CD40 und CD80 auf CD14-positiven Zellen, sowie CD152 auf CD4- und CD8-positiven Zellen konnten aufgrund niedriger Werte nicht für sichere Aussagen herangezogen werden. Beim sog. „gaten“ der Zellen in der Auswertungssoftware handelte es sich hier meist nur um den Unterschied von einer Zelle. Dennoch kann man aus den Ergebnissen ableiten, dass die basale Expression dieser Oberflächenmarker in diesem Versuchsaufbau generell sehr gering ausgefallen ist.

5.3 Zytokine

Die Basalwerte der gemessenen Zytokine zeigten über den Tag hinweg größtenteils nur leichte Schwankungen, lediglich bei IL-6 konnten eindeutig Regelmäßigkeiten der zirkadianen Schwankungen beobachtet werden, welche nicht mit den Spiegeln der Glucocorticoide korrelierten, was den Ergebnissen von (Rijk *et al.*, 1997) entspricht, wo unter physiologischen Konzentrationen von Hydrocortison keine Hemmbarkeit von IL-6 beobachtet wurde. Die Zytokine TNF, IFN- γ , IL-6 und IL-10 konnten besonders gut durch HKLM stimuliert werden, während IL-4 vor allem unter Inkubation mit *C. albicans* stark Anstieg. Wie zu erwarten konnte durch *C. albicans* keine effektive Stimulation der IFN- γ - Sekretion beobachtet werden.

Bezüglich der Stimulierbarkeit und Hemmbarkeit konnten durchaus zirkadiane Schwankungen beobachtet werden.

Interessanterweise bewirkte bei den mit HKLM stimulierten Proben der Einsatz von AM bei einigen Ansätzen eine deutliche Steigerung der IL-4 Sekretion, sowie bei den mit *C. albicans* stimulierten Proben der Einsatz von NE eine erhöhte IL-6- und IL-10-Sekretion.

5.4 Endocannabinoide

Die gemessenen Endocannabinoidspiegel von 2-AG und AEA entsprachen teilweise denen aus bisherigen Studien (Hanlon *et al.*, 2015). Beobachtete Abweichungen könnte man im Sinne der interindividuellen Variabilität interpretieren, da bei allen Probanden stichprobenartig aus dem Alltag heraus gemessen wurde.

Interessanterweise schienen die Messwerte bei den unterschiedlichen Endocannabinoiden innerhalb der einzelnen Probanden ähnliche Tendenzen über den Tagesverlauf zu haben.

Die hier gesammelten Ergebnisse zu den Spiegeln der unterschiedlichen Endocannabinoide im Tagesverlauf ergänzen zwar bisherige Daten, dennoch sollte man weiter an standardisierten Methoden arbeiten und an deutlich mehr Probanden Messungen durchführen, um Referenzbereich festlegen zu können und Verläufe vergleichen zu können.

5.5 Conclusio

Zwar konnte die Laborstudie im Ganzen einige Hinweise liefern, an welchen Stellen man möglicherweise weiter forschen könnte, jedoch bietet die geringe Teilnehmerzahl der Pilotstudie noch kein ausreichendes, repräsentatives Bild.

Außerdem ist zu beachten, dass die Studie nicht im kontrollierten Rahmen in Hinblick auf Umweltfaktoren, Schlafrythmus, Ernährung und Koffeinzufuhr an den vorangegangenen Tagen stattgefunden hat. Bei Folgestudien könnte man dies beachten und eine gewissen Vorlaufzeit mit streng regulierten Tagesrhythmen einhalten, sowie in kürzeren aber dafür häufigeren Intervallen und über die Nacht hinweg Messungen vornehmen, sowie mehrere Tage hintereinander messen um interindividuelle Variabilitäten auszumachen. Interessant wäre es auch, Vergleiche unterschiedlicher Altersgruppen und zwischen männlichen und weiblichen Geschlecht herzustellen, wie es ursprünglich thematisch geplant wurde, jedoch in diesem Rahmen nicht umsetzbar war.

Gerade im klinischen Alltag könnte dieses Wissen in Zukunft sowohl in der Behandlung von Krankheitsverläufen, als auch in der Krankheitsprävention genutzt werden.

Als Beispiel lassen sich an dieser Stelle Beeinträchtigungen der Immunabwehr durch Schichtdienste nennen (Dengler, Westphalen and Koeppen, 2015; Wright *et al.*, 2015; Baxter and Ray, 2019), sie könnten durch besseres Verständnis der physiologischen Prozesse besser erklärt werden, bzw. eine Argumentationsgrundlage bei der Umsetzung prophylaktischer Maßnahmen bieten.

Auch im Verständnis des Krankheitsbildes der Sepsis, eine Fehlregulierung des Immunsystems mit überschießender, lebensbedrohlicher Reaktion auf Pathogene, bei dem nachwievor eine hohe Sterblichkeit besteht, kann die Optimierung der Behandlung und Entwicklung neuer Ansätze von dem Verständnis der physiologischen Prozesse des Immunsystems und Endocannabinoidsystems und deren Veränderungen im Krankheitszustand profitieren (Tschöp *et al.*, 2010; Feurecker *et al.*, 2018).

6. Referenzen

- Ashman, R. B. (2008) 'Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection', *Frontiers in Bioscience*, pp. 3334–3351. doi: 10.2741/2929.
- Baccam, M. *et al.* (2003) 'CD40-Mediated Transcriptional Regulation of the IL-6 Gene in B Lymphocytes: Involvement of NF- κ B, AP-1, and C/EBP β ', *The Journal of Immunology*, 170(6), pp. 3099–3108. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3099.
- Baxter, M. and Ray, D. W. (2019) 'Circadian rhythms in innate immunity and stress responses', *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/imm.13166.
- BD Biosciences, C. (2015) 'BD Simultest™ IMK-Lymphocyte', (340182).
- Blanca, I. R. *et al.* (2001) 'Human B Cell Activation by Autologous NK Cells Is Regulated by CD40-CD40 Ligand Interaction: Role of Memory B Cells and CD5⁺ B Cells', *The Journal of Immunology*, 167(11), pp. 6132–6139. doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6132.
- Bonam, S. R. *et al.* (2017) 'An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 771–793. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.002.
- Bribiescas, R. G. and Hill, K. R. (2010) 'Circadian variation in salivary testosterone across age classes in ache amerindian males of Paraguay', *American Journal of Human Biology*. Am J Hum Biol, 22(2), pp. 216–220. doi: 10.1002/ajhb.21012.
- Bruno, G. *et al.* (2017) 'The revival of an "old" marker: CD4/CD8 ratio', *AIDS Reviews*. Publicaciones Permanyer, 19(2), pp. 81–88.
- Buchheim, J. I. *et al.* (2018) 'Oxidative burst and Dectin-1-triggered phagocytosis affected by norepinephrine and endocannabinoids: Implications for fungal clearance under stress', *International Immunology*, 30(2), pp. 79–89. doi: 10.1093/intimm/dxy001.
- Caille, V. *et al.* (2004) 'Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock', *Shock*. doi: 10.1097/01.shk.0000143410.63698.57.
- Chan, S. and Debono, M. (2010a) 'Replication of cortisol circadian rhythm : new advances in hydrocortisone replacement therapy', pp. 129–138. doi: 10.1177/2042018810380214.
- Chan, S. and Debono, M. (2010b) 'Review: Replication of cortisol circadian rhythm: New advances in hydrocortisone replacement therapy', *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. SAGE

Publications, pp. 129–138. doi: 10.1177/2042018810380214.

Choukér, A. *et al.* (2005) 'Strenuous physical exercise inhibits granulocyte activation induced by high altitude', pp. 640–647. doi: 10.1152/japplphysiol.00036.2004.

Choukèr, A. (2012) *Stress challenges and immunity in space: From mechanisms to monitoring and preventive strategies*, *Stress Challenges and Immunity in Space: From Mechanisms to Monitoring and Preventive Strategies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-22272-6.

Cibrián, D. and Sánchez-Madrid, F. (2017) 'CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper', *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag, pp. 946–953. doi: 10.1002/eji.201646837.

Dengler, V., Westphalen, K. and Koeppen, M. (2015) 'Disruption of Circadian Rhythms and Sleep in Critical Illness and its Impact on Innate Immunity Light 480 nm Melanopsin', pp. 3469–3476.

Devane, W. A. *et al.* (1988) 'Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.', *Molecular pharmacology*.

Druzd, D. *et al.* (2017) 'Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses', *Immunity*. Cell Press, 46(1), pp. 120–132. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.011.

Elenkov, I. J. *et al.* (2000) 'The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system', *Pharmacological Reviews*, pp. 595–638.

Esensten, J. H. *et al.* (2016) 'CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy', *Immunity*. Cell Press, pp. 973–988. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.020.

Feuerecker, M. *et al.* (2012) 'A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation', pp. 290–299. doi: 10.1111/cei.12049.

Feuerecker, M. *et al.* (2018) 'Early immune anergy towards recall antigens and mitogens in patients at onset of septic shock', (January), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-19976-w.

Guo, F. *et al.* (2008) 'CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. NIH Public Access, 181(4), pp. 2285–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684917> (Accessed: 4 October 2018).

Hanlon, E. C. *et al.* (2015) 'Circadian rhythm of circulating levels of the endocannabinoid 2 arachidonoylglycerol', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(1), pp. 220–226. doi: 10.1210/jc.2014-3455.

Hirayama, M., Mure, L. S. and Panda, S. (2018) 'ScienceDirect Circadian regulation of energy intake in

mammals', *Current Opinion in Psychology*. Elsevier Ltd, 5, pp. 141–148. doi: 10.1016/j.cophys.2018.11.002.

Hodges, E. L. and Ashpole, N. M. (2019) 'Aging circadian rhythms and cannabinoids', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc, 79, pp. 110–118. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.008.

Hoff, H. *et al.* (2009) 'Surface CD152 (CTLA-4) expression and signaling dictates longevity of CD28null T cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), pp. 5342–51. doi: 10.4049/jimmunol.0801624.

Idriss, H. T. and Naismith, J. H. (2000) 'TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s)', *Microscopy Research and Technique*. John Wiley & Sons, Ltd, 50(3), pp. 184–195. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.

IMD Berlin (no date a) *IMD Institut für medizinische Diagnostik, Labor: HLA-System und Krankheitsassoziationen*. Available at: <https://www.imd-berlin.de/fachinformationen/diagnostikinformationen/hla-system-und-krankheitsassoziationen.html> (Accessed: 15 June 2020).

IMD Berlin (no date b) *IMD Institut für medizinische Diagnostik, Labor: TNF- α -Hemmtest*. Available at: <https://www.imd-berlin.de/fachinformationen/diagnostikinformationen/tnf-a-hemmtest.html> (Accessed: 15 June 2020).

Kapellos, T. S. *et al.* (2019) 'Cannabinoid receptor 2 deficiency exacerbates inflammation and neutrophil recruitment', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. NLM (Medline), 33(5), pp. 6154–6167. doi: 10.1096/fj.201802524R.

Kaufmann, I. *et al.* (2007) 'Psychoneuroendocrine stress response may impair neutrophil function in complex regional pain syndrome', pp. 103–111. doi: 10.1016/j.clim.2007.07.004.

Kaufmann, I. *et al.* (2009) 'Parabolic flight primes cytotoxic capabilities of polymorphonuclear leucocytes in humans', pp. 1–6. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02136.x.

Kaufmann, I. *et al.* (2011) 'Author ' s personal copy Adenosine A2 A receptor modulates the oxidative stress response of primed polymorphonuclear leukocytes after parabolic flight'. doi: 10.1016/j.humimm.2011.03.021.

Kondratova, A. A. and Kondratov, R. V. (2012) 'The circadian clock and pathology of the ageing brain', *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 325–335. doi: 10.1038/nrn3208.

Lukaszewicz, A. C., Faivre, V. and Payen, D. (2010) 'Is monocyte HLA-DR expression monitoring a

useful tool to predict the risk of secondary infection?', *Minerva Anesthesiologica*, 76(9), pp. 737–744.

Man, K. *et al.* (2017) 'Immunity Around the Clock', 354(6315), pp. 999–1003. doi: 10.1126/science.aah4966.Immunity.

Mannino, M. H. *et al.* (2015) 'The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 367(2), pp. 103–107. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009.

Markov, O. V. *et al.* (2016) 'Molecular and cellular mechanisms of antitumor immune response activation by dendritic cells', *Acta Naturae*. Russian Federation Agency for Science and Innovation, pp. 17–30. doi: 10.32607/20758251-2016-8-3-17-30.

Martignoni, A. *et al.* (2008) 'CD4-expressing cells are early mediators of the innate immune system during sepsis', *Shock*, 29(5), pp. 591–597. doi: 10.1097/SHK.0b013e318157f427.

Mechoulam, R. and Gaoni, Y. (1965) 'A Total Synthesis of dl- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish', *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/ja00952a624.

Munroe, M. E. (2009) 'Functional roles for T cell CD40 in infection and autoimmune disease: The role of CD40 in lymphocyte homeostasis', *Seminars in Immunology*, 21(5), pp. 283–288. doi: 10.1016/j.smim.2009.05.008.

Naeim, F. *et al.* (2018) 'Principles of Immunophenotyping', in *Atlas of Hematopathology*. Elsevier, pp. 29–56. doi: 10.1016/b978-0-12-809843-1.00002-4.

Neumann, A. *et al.* (2019) 'Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical Circadian regulation of endocrine systems', *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. Elsevier, 216(September 2018), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.autneu.2018.10.001.

Nolan, A. *et al.* (2009) 'Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis', *PLoS ONE*. Edited by D. Unutmaz, 4(8), p. e6600. doi: 10.1371/journal.pone.0006600.

Oeckinghaus, A. and Ghosh, S. (2009) 'The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(4), pp. 1–14. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.

Oláh, A., Szekanecz, Z. and Bíró, T. (2017) 'Targeting cannabinoid signaling in the immune system: "High"-ly exciting questions, possibilities, and challenges', *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), pp. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2017.01487.

- Orange, J. S. and Ballas, Z. K. (2006) 'Natural killer cells in human health and disease', *Clinical Immunology*, 118(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.clim.2005.10.011.
- Pandey, R. *et al.* (2009) 'Endocannabinoids and immune regulation', *Pharmacol Res.* doi: 10.1016/j.phrs.2009.03.019.
- Parija, S. C. (2012) *Textbook of Microbiology & Immunology*. 2. Edited by S. M. Bhattacharya *et al.* Pudhucherry, India.
- Pilorz, V., Helfrich-Förster, C. and Oster, H. (2018) 'The role of the circadian clock system in physiology', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 470(2), pp. 227–239. doi: 10.1007/s00424-017-2103-y.
- Radulovic, K. *et al.* (2012) 'CD69 Regulates Type I IFN-Induced Tolerogenic Signals to Mucosal CD4 T Cells That Attenuate Their Colitogenic Potential', *The Journal of Immunology*, 188(4), pp. 2001–2013. doi: 10.4049/jimmunol.1100765.
- Repetico Lernkarten (no date) *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse*.
- Rijk, R. D. E. *et al.* (1997) 'Exercise and Circadian Rhythm-Induced Variations in Production in Humans : High Sensitivity of TNF α and Resistance of IL-6', 82(7), pp. 2182–2191.
- Rose-John, S. (2018) 'Interleukin-6 family cytokines', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10(2). doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
- Satoh, A. *et al.* (2002) 'Human Leukocyte Antigen-DR Expression on Peripheral Monocytes as a Predictive Marker of Sepsis During Acute Pancreatitis', *Pancreas*, 25(3), pp. 245–250. doi: 10.1097/00006676-200210000-00006.
- Schmetzer, O. (2009) *BASICS Immunologie*. 1. Edited by D. D. Hennessen *et al.* Oliver Schmetzer.
- Schmidt, R. F., Lang, F. and Heckmann, M. (2010) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. Schmidt, Robert; Lang, Florian; Heckmann, Manfred.
- Shihab, P. K. *et al.* (2015) 'TLR2 and AP-1/NF-kappaB are involved in the regulation of MMP-9 elicited by heat killed *Listeria monocytogenes* in human monocytic THP-1 cells', *Journal of Inflammation (United Kingdom)*. BioMed Central Ltd., 12(1). doi: 10.1186/s12950-015-0077-0.
- Smith, C. M. *et al.* (2004) 'Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity', *Nature Immunology*, 5(11), pp. 1143–1148. doi: 10.1038/ni1129.
- Strewe, C. *et al.* (2015) 'Functional changes in neutrophils and psychoneuroendocrine responses

during 105 days of confinement', (January), pp. 1122–1127. doi: 10.1152/japplphysiol.00755.2014.

Suttles, J. and Stout, R. D. (2009) 'Macrophage CD40 signaling: A pivotal regulator of disease protection and pathogenesis', *Seminars in Immunology*, 21(5), pp. 257–264. doi: 10.1016/j.smim.2009.05.011.

Tanasescu, R. and Constantinescu, C. S. (2010) 'Immunobiology Cannabinoids and the immune system : An overview', *Immunobiology*. Elsevier, 215(8), pp. 588–597. doi: 10.1016/j.imbio.2009.12.005.

Tintinger, G. R. *et al.* (2001) 'The anti-inflammatory interactions of epinephrine with human neutrophils in vitro are achieved by cyclic AMP-mediated accelerated resequestration of cytosolic calcium', 61, pp. 1319–1328.

Tong, Y. and Tang, J. (2017) 'Candida albicans infection and intestinal immunity', *Microbiological Research*. Elsevier GmbH, pp. 27–35. doi: 10.1016/j.micres.2017.02.002.

Tsang, A. H. *et al.* (2015) 'Endocrine regulation of circadian physiology'. doi: 10.1530/JOE-16-0051.

Tschöp, J. *et al.* (2010) 'The Cannabinoid Receptor 2 is Critical for the Host Response to Sepsis', 183(1), pp. 499–505. doi: 10.4049/jimmunol.0900203.The.

Turcotte, C. *et al.* (2016) 'The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, pp. 4449–4470. doi: 10.1007/s00018-016-2300-4.

Vaughn, L. K. *et al.* (2010) 'THEMED ISSUE : CANNABINOIDS REVIEW Endocannabinoid signalling : has it got rhythm ? Abbreviations ', (March), pp. 530–543. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00790.x.

Venet, F. *et al.* (2007) 'Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock', *Critical Care Medicine*, 35(8), pp. 1910–1917. doi: 10.1097/01.CCM.0000275271.77350.B6.

Verma, N. *et al.* (2017) 'Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations', *Clinical and Experimental Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1–7. doi: 10.1111/cei.12997.

Van Walleghem, M. *et al.* (2017) 'Gravity-Related Immunological Changes in Human Whole Blood Cultured Under Simulated Microgravity Using an *In Vitro* Cytokine Release Assay', *Journal of Interferon & Cytokine Research*. Mary Ann Liebert Inc., 37(12), pp. 531–540. doi: 10.1089/jir.2017.0065.

Weltärztebund (2013) 'WMA Deklaration von Helsinki -Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen', *WMA-Generalversammlung*, 35(53), pp. 1–10. doi: 10.1001/jama.2013.281053.

Wilson, E. *et al.* (1986) 'the Oxidative Burst in Human Neutrophils by Sphingoid Long-chain', pp. 12616–12623.

Winkler, M. S. *et al.* (2017) 'Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF α response: A diagnostic tool for immunosuppression?', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 12(8). doi: 10.1371/journal.pone.0182427.

Wolfert, M. A. and Boons, G. J. (2013) 'Adaptive immune activation: Glycosylation does matter', *Nature Chemical Biology*, pp. 776–784. doi: 10.1038/nchembio.1403.

Wright, K. P. *et al.* (2015) 'Influence of sleep deprivation and circadian misalignment on cortisol, inflammatory markers, and cytokine balance', *Brain, Behavior, and Immunity*. Academic Press Inc., 47, pp. 24–34. doi: 10.1016/j.bbi.2015.01.004.

Yaeger, M. P. *et al.* (2008) 'In Vivo Exposure to High or Low Cortisol Has Biphasic Effects on Inflammatory Response Pathways of Human Monocytes', 107(5), pp. 1–15. doi: 10.1213/ane.0b013e3181875fb0.In.

Zhang, E. E. and Kay, S. A. (2010) 'Clocks not winding down: unravelling circadian networks', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 764–776. doi: 10.1038/nrm2995.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007) 'The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*. Wiley, 81(3), pp. 584–592. doi: 10.1189/jlb.0806510.

Zola, H. (2006) 'Medical applications of leukocyte surface molecules - The CD molecules', in *Molecular Medicine*. The Feinstein Institute for Medical Research, pp. 312–316. doi: 10.2119/2006-00081.Zola.