# Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

## Zirkadiane Rhythmen in Zellen des erworbenen Immunsystems

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Anton Leutz

Colmar

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Solbach

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stefan Niemann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.07.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Vereinfachtes Modell der zirkadianen Uhr des SCN von Säugern	6
Abbildung 2:	Abbildung eines Laufes der quantitativen PCR	24
Abbildung 3:	Abbildung der Herzfrequenz, der Körperbewegungen und	
	Körperkerntemperatur	29
Abbildung 4:	Abbildung der Hormone Cortisol, Adrenalin, Melatonin, Prolaktin	
	und Wachstumshormon	30
Abbildung 5:	Abbildung der Durchflusszytometrie von separierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.	31
Abbildung 6:	Abbildung der Expressionslevels der vier Referenzgene	32
Abbildung 7:	Expressionslevels der Gene des positiven und negativen Schenkels	33
Abbildung 8:	Expressionslevels der Gene der zusätzlichen	
	Rückkopplungsschleifen	35
Abbildung 9:	Expressionslevels der Gene des positiven und negativen Schenkels	
	unter in vitro-Bedingungen.	36
Abbildung 10:	Expressionslevels der Gene der zusätzlichen	
	Rückkopplungsschleifen unter in vitro-Bedingungen	37
Abbildung 11:	Abbildung der Anzahl der aktivierten CD4 <sup>+</sup> T- Zellen (CD40L <sup>+</sup> ) und	
	der aktivierten CD4 <sup>+</sup> T- Zellen, welche die Zytokine IFN-γ, IL-2,	
	IL-4 und IL-17 produzieren	39
Abbildung 12:	Mittlere Produktion des Aktivierungsmarkers CD40L und mittlere	
	Produktion der Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-17	40
Abbildung 13:	Expressionslevels der Gene CD40L, IFN- $\gamma$ , IL-2 und I $\kappa$ B $\alpha$	42
Abbildung 14:	Expressionslevels der Gene CD40L und IFN-γ unter in vitro-	
	Bedingungen	43

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Verwendete Reagenzien für die Zellisolation	11
Tabelle 2:	Verwendete Reagenzien für die RNA-Isolation	11
Tabelle 3:	Verwendete Reagenzien für die cDNA-Umschreibung	11
Tabelle 4:	Verwendete Reagenzien für die quantitative PCR	11
Tabelle 5:	Für die quantitative PCR verwendete Primer, für die Referenzgene	11
Tabelle 6:	Für die quantitative PCR verwendete Primer, für die Zielgene	12
Tabelle 7:	Verwendete Reagenzien für den Stimulations-Assay	13
Tabelle 8:	Verwendete Reagenzien für die intrazelluläre Färbung	13
Tabelle 9:	Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Färbung	13
Tabelle 10:	Verwendete Antikörper für die FACS Kontrolle	13
Tabelle 11:	Verwendete Reagenzien für die Hormonbestimmung	14
Tabelle 12:	Sonstige Reagenzien	14
Tabelle 13:	Verwendeter Laborbedarf	14
Tabelle 14:	Verwendete Geräte	14
Tabelle 15:	Energiegehalt (Megajoule) der Makronährstoffe der standardisierten	
	Mahlzeiten	18
Tabelle 16:	Reaktionsansatz für die Reverse Transkriptase	21
Tabelle 17:	Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkriptase	21
Tabelle 18:	Reaktionsansatz für die quantitative PCR	22
Tabelle 19:	Reaktionsbedingungen für die quantitative PCR	22
Tabelle 20:	Verwendete Antikörper und Isotypenkontrolle	25
Tabelle 21:	Aus der Wertung genommene Werte.	26

## **Abkürzungsverzeichnis**

ACTH Adrenocorticotrophes Hormon

APC Allophycocyanin

ARNT Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like

ATP Adenosintriphosphat
B2M Beta-2-Microglobulin

Bmal Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

ARNT-like

BMI Body Mass Index

bp Basenpaare

BSA Rinderserumalbumin
C3, C4 Komplementfaktoren

°C Grad Celsius

CCG Clock Controled Gene

CD Cluster of Differentiation

cDNA komplementäre DNA

Clock Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CRH Corticotropin-releasing Hormone

Cry Cryptochrome

Da Dalton

D-Box DNA-Promotor-Elemente

DEC1, 2 Differentiated Embryo Chondrocyte

Dbp D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein

DMSO Dimethylsulfat

DNA Desoxyribonukleinsäure

E-Box DNA-Promotor-Elemente

E4bp4 Adenovirus E4 Promoter Binding Protein 4/NFIL3 Nuclear Factor,

Interleukin 3 regulated

EDTA Ethylendiamintetraacetat
EEG Elektroenzephalogramm

EMG Elektromyogramm

engl. englisch

EOG Elektrookulogramm

FACS Fluorescence Activated Cell Sorting/ Durchflusszytometrie

FASPS Familial Advanced Sleep Phase Syndroms

FBXL3 F-Box/LRR-repeat protein 3

FITC Fluorescinisothiocyanat

FSC Forward Scatter/ Vorwärtsstreulicht

g Erdbeschleunigung

GH Growth Hormon

G6PDH Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HPRT Phosphoribosyl-Transferase

IFN Interferon

Ig Immunglobulin

IκBα Inhibitor of Nuclear Factor κBα

IL Interleukin lat. Lateinisch

LPS Lipopolysaccharid

MACS Magnetic Cell Sorting

MDB Membrane Desalting Buffer

Mesor Midline Estimatin Statistic of Rhythm

MFI Mean Fluorescence Intensity

μl Mikroliter
min Minute/n
ml Milliliter
mM Millimolar
mmol Millimol

mRNA messenger Ribonukleinsäure

NaCl Natriumchlorid

NFκB Nukleärer Faktor kappa B

ng Nanogramm

NK-Zellen Natürliche Killerzellen

Nono Non-POU domain-containing octamer-binding protein (p54nrb)

NPAS2 Neural PAS domain protein 2

p - Value (Probability, engl. für Wahrscheinlichkeit)

PBGD Porphobilinogen Deaminase

PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerase Chain Reaction / Polymerase Kettenreaktion

PE Phycoerithrin

Per Period

PerCP Peridinin-chlorophyll-protein complex

pmol Picomol

PMA Phorbol Myristate Acetat

qPCR Quantitative PCR

REM Rapid Eye Movement

Rev-erbα Orphan Nuclear Receptor NR1D1

RGC Retinale Ganglienzellen

RNA Ribonukleinsäure

Rore Ror response Elements, ROR: RAR related Orphan Receptor

Rorα Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor Alpha

RPE R-Phytoerythrin

RT Raumtemperatur

SCN Suprachiasmatischer Nucleus

sec/sek Sekunde/n

SEM Standard Error of Mean SFB Sonderforschungsbereich

SGMS Spingomyelin Synthase

sin Sinus

SPSS Statistiksoftware, Superior Performing Software System

SSC Sideward Scatter/ Seitwärtsstreulicht

SWS Slow Wave Sleep

Tab. Tabelle

TH-Zellen Helfer-T-Zellen

TNF Tumor Nekrose Faktor
Treg regulatorische T-Zelle
WDR5 WD40 repeat protein 5
X VIVO 15 Serumfreies Zellmedium

ZNS Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis VI

## **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis I		
Abkürzungsverzeichnis	III	
1. Einleitung	1	
1.1 Biologische Rhythmen im Menschen	1	
1.2 Die Bedeutung des Tag-Nacht-Rhythmus	2	
1.3 Zentrale Steuerung zirkadianer Rhythmen.	3	
1.4 Rhythmusverlust und Krankheit.	3	
1.5 Zirkadianer Rhythmus auf molekulargenetischer Ebene	4	
1.6 Synchronisation des Nucleus suprachiasmaticus mit der Umwelt	6	
1.7 Synchronisation der zirkadianen Uhren in peripheren Geweben	7	
1.8 Zirkadiane Rhythmen im Immunsystem	8	
1.8.1 Zirkadiane Rhythmen im erworbenen Immunsystem	9	
1.9 Ziel der Arbeit	10	
2. Material	11	
2.1 Reagenzien für die Bestimmung der Gen-Expression	11	
2.1.1 Für die quantitative PCR verwendete Primer	11	
2.2 Reagenzien für die Bestimmung der Immunfunktion	13	
2.3 Reagenzien für die durchflusszytometrische Reinheitskontrolle der		
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	13	
2.4 Reagenzien für die Hormonbestimmung	14	
2.5 Sonstige Reagenzien.	14	
2.6 Laborbedarf	14	
2.7 Geräte	14	

Inhaltsverzeichnis

3. Methoden	16
3.1 Überblick	16
3.2 Probanden	16
3.2.1 Einschlusskriterien	16
3.3 Versuchsablauf im Schlaflabor	17
3.3.1 Kontrolle der Schlafarchitektur	18
3.3.2 Herzfrequenz, Rumpfbewegungen und Körperkerntemperatur	19
3.4 Hormonbestimmungen	19
3.5 Isolation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	19
3.6 Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression.	20
3.6.1 RNA-Isolation	20
3.6.2 cDNA-Synthese	21
3.6.3 Quantitative PCR	21
3.7 Analyse der CD4 <sup>+</sup> T-Zellfunktion	24
3.7.1 Stimulations-Assay	24
3.7.2 Durchflusszytometrische Analyse	26
3.8 Fehlende und abweichende Werte.	26
3.9 Statistik	27
4. Ergebnisse	28
4.1 Analyse des Schlafes	28
4.1.1 EEG	28
4.1.2 Herzfrequenz, Körperbewegungen und Körperkerntemperatur	28
4.1.3 Hormonbestimmungen	29
4.2 Reinheit der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.	31
4.3 Untersuchung zirkadianer Genexpression	32
4.3.1 Haushaltsgene (Referenzgene)	32
4.3.2 Zirkadiane Oszillation der Uhrengene	33
4.3.3 Autonome Rhythmen im Immunsystem	35
4.4 Tagesabhängige T-Zellfunktionen.	38
4.4.1 Zirkadiane Regulation der Zytokinproduktion	41

Inhaltsverzeichnis VIII

5. Diskussion	44
5.1 Überblick	44
5.2 Parameter der zentralen zirkadianen Regulation.	44
5.2.1 Körperkerntemperatur.	44
5.2.2 Herzfrequenz und Adrenalin.	45
5.2.3 Cortisol und Melatonin.	45
5.2.4 Prolaktin und Wachstumshormon	47
5.2.5 EEG und Körperbewegungen	47
5.3 Expression der Uhrengene unter <i>ex vivo</i> -Bedingungen.	48
5.3.1 Bestimmung der Uhrengene unter <i>in vitro</i> -Bedingungen	52
5.4 Rhythmen in der Immunzellfunktion.	53
5.5 Möglicher Signalweg von der Uhrengensteuerung zur Zytokinsekretion	55
5.6 Dem Verhalten angepasste Rhythmik im Immunsystem	56
5.7 Ausblick und Schlussbetrachtung	58
6. Zusammenfassung	60
7. Literaturverzeichnis	61
8. Anhang	72
8.1 Datentabelle: Einzelspenderanalyse	72
8.2 Ethikvotum.	74
8.3 Danksagung	75
8.4 Publikationen.	76
8.5 Erklärung	76

## 1. Einleitung

## 1.1 Biologische Rhythmen im Menschen

Rhythmus im Biologischen ist das lebendige Abbild der kosmischen Welt. Rhythmus bringt den Zeitverlauf ins Erleben und schlägt die Brücke vom Vergangenen zum Zukünftigen.

Lebensäußerungen unterliegen Rhythmen über Stunden, Monate, Jahre und über die gesamte Lebenszeit, am ausgeprägtesten jedoch über den Tag [76].

Von Rhythmen innerhalb der Entwicklung eines Lebewesens abgesehen, findet man als größten wiederkehrenden Rhythmus den Jahreslauf. Dieser Jahresrhythmus lässt sich in der Vegetation und im Tierreich gut beobachten. Obgleich für den Menschen durch das moderne Leben der Jahresrhythmus an Bedeutung zu verlieren scheint, kann man in der Variation einiger Parameter im menschlichen Organismus diesen Rhythmus doch erkennen. So ist z. B. für Vitamin D und Melatonin eine deutlich gegensätzliche Rhythmik in der Konzentration im Blut über das Jahr zu erkennen, d. h. mit zunehmender Dauer der Sonneneinstrahlung im Sommerhalbjahr steigt der Vitamin D-Spiegel im Serum und die mittlere Melatoninkonzentration verringert sich [8, 36, 37, 82, 119, 174]. Auch im Auftreten von Krankheiten, wie Infektionskrankheiten des respiratorischen Systems und der saisonal-affektiven Störung der Winterdepression, lässt sich ein Jahresrhythmus finden. Dieser Jahresrhythmus lässt sich durch die Mondphasen in den Monatsrhythmus gliedern, der beim Menschen beispielsweise im Ovarialzyklus sichtbar wird. Eine weitere Unterteilung findet man im Wochenrhythmus, welcher vorwiegend kulturell geprägt erscheint [79]. Es konnte allerdings ein von den Wochentagen unabhängiger zirkaseptaner Rhythmus in Manifestation und Rekonvaleszenz einiger Krankheiten beschrieben werden [79, 80, 130]. Rhythmen in der Physiologie und im Krankheitsgeschehen des Menschen zu beobachten, zu beschreiben und in die Therapie einzubeziehen hat in der Medizin eine lange Tradition [63, 84, 144]. Dabei stellt sich der Wechsel von hell/dunkel über 24 Stunden als der bedeutendste der genannten Rhythmen für die Physiologie des Menschen und der meisten anderen Lebewesen dar.

## 1.2 Die Bedeutung des Tag-Nacht-Rhythmus

Der Wechsel von Tag und Nacht hat die Evolution der Lebewesen auf der Erde entscheidend geprägt. Praktisch alle Organismen weisen einen 24-Stunden-Rhythmus in ihrem Verhalten auf [45]. Der Gang der Sonne hinterlässt eine starke Prägung nicht nur im Verhalten, sondern auch auf allen Organisationsebenen bis ins Molekulare. In der Evolution ist es für Lebewesen von großem Vorteil, nicht nur das Verhalten dem Tag-Nacht-Rhythmus anzupassen, sondern die Verhältnisse zu antizipieren. Bei sämtlichen untersuchten Lebewesen konnte man Gene finden, deren Funktion in der Generierung eines etwa 24-Stunden-Rhythmus besteht. Die Bedeutung dieser genetischen Uhr wird unterstrichen durch die extrem gute Konservierung dieser Genregionen während der Evolution [42, 111]. Wiederkehrende etwa 24 Stunden dauernde Rhythmen finden schon lange das Interesse der Wissenschaft. Eine große Bedeutung für die Rhythmusforschung am Menschen hatten Versuche, in denen Probanden über mehrere Wochen unter absoluter Isolation von der Außenwelt lebten. Anhand der aufgezeichneten Daten im Verhalten und Schlaf-Wach-Rhythmus Probanden, wie in den Körperfunktionen der Körperkerntemperatur, konnte im Durchschnitt ein sogenannter "freilaufender Rhythmus" von etwa 25 Stunden beobachtet werden [10]. Dieser freilaufende Rhythmus von etwa einem Tag wurde zirkadianer Rhythmus (von "circa", lat. ungefähr und "dies" lat. der "Tag") genannt. Weitere Versuche konnten zeigen, dass der zirkadiane Rhythmus durch extrinsische Faktoren auf den tatsächlichen Tagesrhythmus synchronisiert wird. Eine Vielzahl von Vorgängen im Verhalten und in Funktionen des Menschen, wie Schlaf-Wach-Rhythmus, Hormonsekretion oder Regelung des Energiebedarfs und der Immunfunktionen, werden durch den zirkadianen Rhythmus beeinflusst [11, 19, 49, 59, 146, 163, 164].

Die Beschreibung einer zirkadianen Rhythmik gelingt näherungsweise durch eine Sinuskurve. Dabei wird eine vollständige Schwingung als Periode bezeichnet, der Mittelwert aller Werte einer Periode dieser Sinuskurve als Mesor und der maximale Ausschlag vom Mesor als Amplitude. Der Zeitpunkt des Maximums wird Scheitelpunkt, der Kurvenbereich um den Scheitelpunkt Akrophase genannt. Der Zeitpunkt des Minimums wird als Nadir und der Kurvenbereich um den Nadir als Bathyphase bezeichnet.

## 1.3 Zentrale Steuerung zirkadianer Rhythmen

Bei Säugetieren konnte im Gehirn eine Region des Hypothalamus beschrieben werden, welche an der zentralen Regulation der verschiedenen Rhythmen maßgeblich beteiligt ist [173]. Diese etwa 800 µm große Region befindet sich unter dem III. Hirnventrikel und über der Kreuzung des Nervus opticus (Chiasma opticum) im ventralen Hypothalamus und wird als Nucleus suprachiasmaticus (Suprachiasmatischer Nukleus, SCN) bezeichnet. Er ist paarig angelegt und lässt sich in mehrere Abschnitte gliedern [115]. Eine beidseitige Zerstörung dieser Region führte beim Hamster zum Verlust der Rhythmik von Aktivität, Nahrungsaufnahme und Hormonsekretion [113]. Es konnte gezeigt werden, dass der SCN an der Regulation zahlreicher Faktoren wie Hormonsekretion, vegetativem Nervensystem und Körpertemperatur beteiligt ist [26, 146].

## 1.4 Rhythmusverlust und Krankheit

Der Mensch hat sich im Laufe der Evolution und unter den Bedingungen der modernen Gesellschaften in zunehmendem Maße von den natürlich vorgegebenen Rhythmen abgekoppelt. Einen Zusammenhang zwischen Abweichungen bei zirkadianen Rhythmen und der Inzidenz von Erkrankungen, insbesondere solcher, welche in zivilisierten Gesellschaften häufiger gefunden werden, wird durch eine zunehmende Zahl an Studien beschrieben.

Die Störung zirkadianer Rhythmen durch Nachtarbeit verursacht nicht nur Schlafmangel [38], sondern auch eine gestörte Hormonausschüttung [76, 167] und ist mit einem erhöhten Brust- und Darmkrebsrisiko verbunden [9]. Empirische und epidemiologische Daten zum metastasierten Kolonkarzinom ermittelten ein fünffach erhöhtes Sterberisiko bei Störung der zirkadianen Rhythmik [9]. Es konnte auch gefunden werden, dass das Adenokarzinom des Pankreas und das Osteosarkom der Maus bei Zerstörung des SCN schneller wachsen [9].

Schon eine geringe Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik kann zur Entwicklung eines metabolischen Syndroms beitragen [142]. Ein Verlust zirkadianer Rhythmen wirkt sich auch negativ auf den Lebermetabolismus aus [76, 146] und korreliert mit dem Auftreten von Steatosis hepatis und Dyslipidämie [152, 159]. Nach Phasenverschiebungen der zirkadianen Uhr konnte ein erhöhter postprandialer Glucose-Spiegel gemessen werden [72] sowie ein Zusammenhang mit Typ 2-Diabetes beschrieben werden [157].

Ein Verlust der zirkadianen Regulation des Blutdrucks mit einem Fehlen der Nachtabsenkung ist mit einem vermehrten Auftreten von Endorganschäden assoziiert [57, 131].

Auch für die Häufigkeitsgipfel im Auftreten von Krankheiten konnten zirkadiane Rhythmen beobachtet werden. So ist das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, am Morgen am größten [4, 132]. Nierenkoliken treten hauptsächlich in der Nacht auf [107]. Sogar für die Tageszeit des natürlich eintretenden Todes konnte ein Zusammenhang zu genetischen Varianten in Uhrengenen beschrieben werden [101].

## 1.5 Zirkadianer Rhythmus auf molekulargenetischer Ebene

Der zirkadiane Rhythmus manifestiert sich auf molekularer Ebene in autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen, deren Aktivität durch deren eigene Proteine reguliert wird. Dabei sind *Bmal1 (Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ARNT-like*; ARNTL: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like*) und *Clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)* transkriptionsaktivierend (positive Elemente der Schleife) und die Gen-Familien *Period (Per1, Per2, Per3)* und *Cryptochrom (Cry1, Cry2)* transkriptionshemmend (negative Elemente der Schleife) [30, 64, 89, 141, 148].

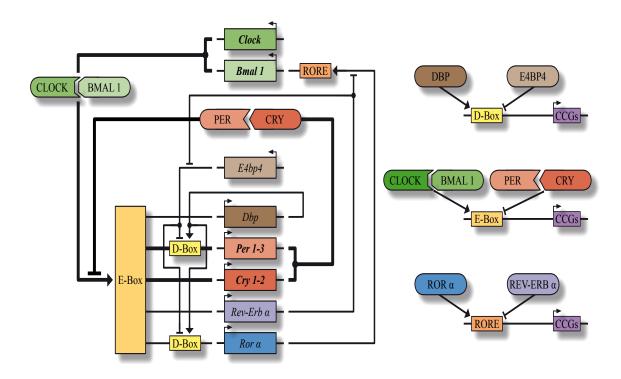
Die Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK binden als Heterodimere an die DNA-Promotor-Elemente (an E-Box-Enhancer-Elemente), welche sich in den *Cry*- und *Per*-Promotorregionen befinden [64]. Nach Transkription und Translation der *Cry*- und *Per*-Gene sammeln sich die Proteine im Zytoplasma und bilden Komplexe, die durch Caseinkinasen phosphoryliert werden. Nach Translokation in den Kern binden die phosphorylierten Komplexe an die Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1, welche selber als Komplex vorliegen [94, 122, 169]. Dies hat zur Folge, dass die Transkriptionsaktivität der Gene *Per* und *Cry* abnimmt und durch Degradation somit auch die mRNA- und Proteinkonzentration dieser Gene. Als Konsequenz wird die Hemmung von CLOCK und BMAL1 geringer bzw. aufgehoben und ein neuer Zyklus kann beginnen [76].

Eine weitere Rückkopplungsschleife ergibt sich durch die Gene *Rorα* (*Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor Alpha*) und *Rev-erbα* (*Orphan Nuclear Receptor NR1D1*), welche wie *Per 1-3* und *Cry1-2* auch unter der Kontrolle der E-Box stehen [133, 145]. Die dazu gehörenden Proteine RORα und REV-ERBα konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle in der Promotorregion von *Bmal1* [70], wobei RORα aktivierend und REV-

ERBα hemmend auf die Transkription von Bmal1 wirkt [133]. Da RORα und REV-ERBα ebenso wie Per und Cry durch den Komplex PER/CRY gehemmt werden, läuft die Transkription von Rev-erb $\alpha$  und  $Ror\alpha$  synchron zu der von Per und Crv. Als zwei weitere Transkriptionsregulatoren sind die Gene Dbp (D Site of Albumin Promoter (Albumin D-Box) binding Protein) und E4bp4 (Nuclear Factor, Interleukin 3 regulated) beschrieben, welche über D-Box-Regulatorsequenzen verfügen und so die Transkription der Gene Per 1-3 und  $Ror\alpha$ fördern bzw. hemmen. Die **Funktion** dieser zusätzlichen Rückkopplungsschleifen besteht in der Stabilisierung der primären Rückkopplungsschleife und in der Weiterleitung des generierten Rhythmus an die zirkadian regulierten Gene. Es wird angenommen, dass die Genprodukte der zusätzlichen Rückkopplungsschleifen, die spezies- und gewebespezifisch in ihrer Phase variieren, Transkriptionsfaktoren der rhythmisch kontrollierten Gene darstellen [25, 76].

Eine Reihe weiterer Gene stabilisieren und regulieren die beschriebenen Rückkopplungsschleifen. Das Gen *Circadian* reguliert über sein Protein die Aktivität von CLOCK/BAML1 [184]. Die Proteine DEC1 und DEC2 werden wie *Per* und *Cry* aktiviert und wirken ebenfalls negativ rückkoppelnd auf die Aktivierung. Die Proteine NONO, WDR5 [27] und FBXL3 sind an der Beeinflussung der Geschwindigkeit bzw. der Periodenlänge der zirkadianen Uhr beteiligt [32, 67, 153].

Weiterhin sind für die Funktion und Halbwertzeit der Transkriptionsfaktoren posttranslationale Vorgänge von Bedeutung [105]. Sie tragen zur Feinregulierung der zirkadianen Uhr bei [168]. Diese diversen Steuermechanismen erlauben eine präzise Regulierung der Periodenlänge der Uhr und somit eine genaue zeitliche Koordination und Abfolge der rhythmisch kontrollierten Prozesse im Körper. Gleichzeitig erlauben sie eine große adaptive Plastizität in der Feinsteuerung bei unterschiedlichen Anforderungen der verschiedenen Organe und Gewebe.



**Abbildung 1:** Vereinfachtes Modell der zirkadianen Uhr des SCN von Säugern, modifiziert nach [76]. Der primäre Oszillator besteht aus der transkriptionalen Aktivierung von *Per-* und *Cry-*Genen durch das CLOCK/BMAL1 Heterodimer über E-Box-Elemente während der Lichtphase. Die nachfolgende Ansammlung von PER/CRY-Protein unterdrückt die transkriptionale Aktivität des CLOCK/BMAL1-Heterodimers und schließt so die Rückkopplungsschleife. Zusätzliche Rückkopplungsschleifen bestehen aus den Rorbindenden Transkriptionsfaktoren RORα und REV-ERBα sowie aus den D-Boxbindenden Transkriptionsfaktoren DBP und E4BP4, welche zur Feinregulation und Stabilität des primären Oszillatorsystems beitragen. In der Promotorregion von zirkadian kontrollierten Genen (CCG, Clock Controled Gene) befinden sich E-Box-, D-Box- und Rore-Bindungsstellen, sodass ein Auslesen der zirkadianen Rhythmik möglich ist.

## 1.6 Synchronisation des Nucleus suprachiasmaticus mit der Umwelt

Wichtigster Synchronisator des SCN ist das Tageslicht bzw. das Fehlen von Licht in der Nacht. Die Synchronisation der zirkadianen Uhr des SCN durch Licht vollzieht sich einerseits über die Stäbchen und Zapfen der Retina [124, 143], andererseits über melanopsinhaltige Ganglienzellen [68, 73, 77, 136, 137]. Diese großen retinalen Ganglienzellen ("large RGC") haben eine direkte Verbindung zum SCN [112].

Das Verbindungsglied von der Retina zum SCN bildet der retinohypothalamische Trakt, [11]. Dieser stimuliert mittels der Transmitter "Glutamat" und "pituitary adenylate cyclase activating polypeptide" Neurone im SCN. Über verschiedene Signalwege kommt es zur Induktion der Expression der Uhrengene *Per1-2* [2, 151]. Es konnte gezeigt werden,

dass sowohl Lichtapplikation während der Nacht als auch Mutationen in Per-Genen die Phasenlage der zirkadianen Uhr im SCN beeinflussen [3]. Licht zum Beginn der Dunkelphase verlängert die Periode im SCN, während Licht zum Ende der Dunkelphase diese verkürzt. Im geringeren Maße gilt dies auch für Licht in der Dämmerungsphase, nicht jedoch für Licht zur Tagesmitte [40]. Je heller das Licht ist, desto stärker wirkt es als Zeitgeber. Ab etwa 100 Lux Tageslicht konnte eine Beeinflussung der Phasenlage des SCN festgestellt werden. Maximale Effekte waren ab 1000 Lux zu beobachten [58]. Gleiches trifft für die Wellenlänge zu - je stärker der Blaulichtanteil, desto deutlicher ist die Beeinflussung des SCN. Die geschlossenen Augenlider filtern fast vollständig den Blaulichtanteil des Umgebungslichtes aus. Auch die Richtung des Lichtes beeinflusst den SCN. Licht, welches vertikal von oben und somit auf die untere Hälfte der Retina scheint, wirkt signifikant stärker auf den SCN als Licht, welches von unten einfällt und so die obere Hälfte der Retina beleuchtet [66, 98]. Ebenso ist die Dauer des Lichteinfalls von Bedeutung. Sie bestimmt ein spezifisches Muster von Phasenlängen im SCN [76, 138], sodass sich lange Sommertage und kurze Wintertage in einem jeweils charakteristischen Muster abbilden. Je länger die Lichtphase ist, desto größer ist die topographische Phasenstreuung im SCN.

Außer Licht gibt es noch weitere Faktoren, die als Zeitgeber für den SCN von Bedeutung sind. Es ist gelungen, Verbindungen vom SCN zu serotonergen Zellen von Raphe-Kernen nachzuweisen [134, 135], über deren Verbindung der SCN durch emotionale Aktivität reguliert wird. Des Weiteren empfängt der SCN auch Signale über den geniculohypothalamischen Trakt, welcher sowohl Informationen über das Tageslicht als auch über den Aktivitätszustand an den SCN weiterleitet [53, 96]. Außerdem konnten verschiedene Hormonrezeptoren im SCN nachgewiesen werden, über welche ebenfalls die Phasenlage des SCN beeinflusst werden kann [33, 127]. Ebenso hat Schlaf Einfluss auf den SCN, indem er stabilisierend auf den Hell-Dunkel-Rhythmus wirkt [178].

## 1.7 Synchronisation der zirkadianen Uhren in peripheren Geweben

Durch die Synchronisation der zirkadianen Uhren in Zellen peripherer Gewebe durch den SCN als "Zentraluhr" wird die Anpassung an Tag und Nacht für alle Körperzellen möglich. Während bei einigen lichtdurchlässigen Organismen die peripheren Uhren direkt vom Licht synchronisiert werden, geschieht dies beim Menschen über Hormone, vegetatives Nervensystem, Körpertemperaturschwankungen und den Wechsel von Ruhe

und Aktivität [26, 53, 146, 148]. Es sind Verbindungen des SCN zur Hypophyse, zu CRH Neuronen und zum vegetativen Nervensystem gefunden worden [14, 53, 83, 113, 114, 160, 163]. Eine Beeinflussung der molekularen Uhren in peripheren Geweben ist für die Hormone Cortisol und Melatonin [12, 65, 156] sowie für den Sympathikus beschrieben [163].

Als ein weiterer wichtiger Synchronisator peripherer Gewebe erwies sich der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme. Nahrungsaufnahme während der Schlaf/Ruhephase kann periphere Uhren in Leber, Niere, Herz und Pankreas vom SCN entkoppeln [50, 146, 147, 163]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Glucose die Expression von *Per1*- und *Per2*-Genen verringert [146], was zu einer Verlängerung der Periode der zirkadianen Uhr führt [76]. Nahrungsrestriktion konnte eine gestörte zirkadiane Rhythmik der Gene *Per2* und *Bmal1* in der Leber von Ratten wieder synchronisieren [146, 163]. Aber auch eine Beziehung der Außentemperatur zur Phasenlage der peripheren Uhren konnte gezeigt werden [26, 146]. Den verschiedenen Befunden ist zu entnehmen, dass die zirkadianen Uhren der peripheren Gewebe unterschiedliche und für sie spezifische Wege der Synchronisation mit dem SCN nutzen.

Die Existenz zirkadianer Uhren ist inzwischen in vielen Zellen nachgewiesen worden, so z. B. in Neuronen, Fibroblasten [11], Hepatozyten, Nieren- und Nebennierenzellen [181] sowie in Zellen von Herz, Lunge, Magen und Milz [180]. Dabei konnten oftmals gewebespezifische Phasenlagen und Variationen in den zirkadian regulierten Uhrengenen gefunden werden. Die meisten der untersuchten Gewebe stammen von nachtaktiven Nagern wie Mäusen und Ratten, für den Menschen liegen nur sehr wenige Daten vor.

Insgesamt konnte man bei 8-10 % der Gene einer Zelle eine zirkadiane Rhythmik in der Expression beobachten. Bei den Proteinen fand man 20 % unter zirkadianer Kontrolle, teilweise in wichtigen Stoffwechselwegen wie Kohlenhydratmetabolismus, Zell-Atmung und -Teilung, Harnstoffzyklus und Detoxifikation [76].

## 1.8 Zirkadiane Rhythmen im Immunsystem

Eine tageszeitlich abhängige Symptomatik bei Immunkrankheiten, wie rheumatoider Arthritis am frühen Morgen [154] oder Asthma zur Nachtzeit [108, 160], ist bekannt. Aber nur wenige Studien untersuchen zu Grunde liegende zirkadiane Rhythmen im Immunsystem des Menschen, und davon beziehen sich die meisten auf die angeborene

Immunität oder auf Zellgemische wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes [5, 6, 16, 88]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind oft uneinheitlich, und sie sind teilweise mit einer nur geringen Zahl an Probanden durchgeführt worden [16].

Schwankungen der Zellzahlen im peripheren Blut über den Tag sind schon länger bekannt. So konnte für die Gesamtzellzahl der Leukozyten im Blut ein Maximum am Abend gemessen werden [1, 22]. Für die Subpopulationen der Leukozyten ergibt sich ein differenziertes Bild. Während neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen ihre Maxima am Tag aufweisen, findet man das Maximum in der Anzahl von B- und T-Lymphozyten in der Mitte der Nacht [22].

Zirkadiane Rhythmen bei natürlichen Killerzellen und Peritonealmakrophagen sind bei Nagern untersucht worden. Bei natürlichen Killerzellen der Ratte konnte man eine zirkadiane Rhythmik in der Anzahl der Zellen und in der Expression von Granzym B und Perforin nachweisen [6-9, 104]. In Peritonealmakrophagen der Maus wurde eine zirkadiane Uhr beschrieben, welche die Immunantwort auf LPS-Stimulation steuert. Durch Mikroarray Analyse wurden zirkadian regulierte Gene gefunden, die im Signalweg der LPS-induzierten Immunantwort bedeutsam sind [78, 88]. Dementsprechend konnte eine tageszeitliche Variation der Sterblichkeit nach LPS-induziertem Schock beobachtet werden [71, 102]. Weitere Uhrengene mit zirkadianer Rhythmik wurden in der Milz und in Lymphknoten der Maus gefunden [88]. Einen Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und zirkadianen Rhythmen verdeutlichen Versuche, welche zeigen, dass Zytokine die Expression von Uhrengenen beeinflussen [7, 39]. Störungen in der zirkadianen Rhythmik wirken sich nachteilig auf die Immunkompetenz aus, wie Daten von "Jetlag"-Experimenten bei Mäusen Für experimentell belegen: Phasenverschiebungen der zirkadianen Uhr wurde ein starker Einfluss auf das angeborene Immunsystem nachgewiesen [38, 102].

## 1.8.1 Zirkadiane Rhythmen im erworbenen Immunsystem

Auch für das erworbene Immunsystem finden sich viele Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Immunfunktion und zirkadianer Rhythmik. Neben der oben erwähnten tageszeitabhängigen klinischen Ausprägung von rheumatoider Arthritis und Asthma wurde bei Nierentransplantationen eine vermehrte Transplantatabstoßung in den frühen Morgenstunden beobachtet [91]. Die tageszeitabhängige Rhythmik der Symptome von rheumatoider Arthritis konnte auf molekularer Ebene spezifiziert werden. Es wurde

eine Assoziation zwischen rheumatoider Arthritis und einer Defizienz des *Cry*-Uhrengens gefunden [75]. Auch in der Antikörperproduktion konnte eine Abhängigkeit von der Tageszeit, an welcher der Antigenkontakt stattgefunden hat, festgestellt werden. Männer, die morgens einmalig gegen Hepatitis A oder Influenza geimpft worden waren, hatten nach einem Monat einen höheren Impftiter im Vergleich zu Männern, bei denen die Impfung am Nachmittag erfolgt war. Für Frauen konnte dieses Ergebnis nicht nachgewiesen werden [128]. Frühere Untersuchungen mit Hepatitis B-Impfstoff ergaben höhere Impftiter bei einer Impfung am Nachmittag im Vergleich zu einer morgendlichen Impfung. [129]. Ob die zirkadiane Immunantwort antigenspezifisch variiert oder durch unterschiedliches Studiendesign beeinflusst wurde, ist unklar.

## 1.9 Ziel der Arbeit

Bei einer ständig wachsenden Zahl an Krankheiten können Verbindungen zu Störungen der zirkadianen Rhythmen gefunden werden. Während erste Forschungsergebnisse für das angeborene Immunsystem einen Zusammenhang bereits zeigen können, liegen für das erworbene Immunsystem bisher kaum Daten vor.

In dieser Arbeit sollte deshalb die zirkadiane Rhythmik im erworbenen Immunsystem an CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten untersucht werden. Durch Quantifizierung der mRNA von Uhrengenen sollte erforscht werden, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine zirkadiane Uhr besitzen, und deren Autonomie sollte analysiert werden.

In einem weiteren Schritt sollte nach Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen über genotypische und phänotypische Analysen untersucht werden, ob die Funktionalität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

## 2. Material

## 2.1 Reagenzien für die Bestimmung der Gen-Expression

## Reagenzien für die Zellisolation

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien für die Zellisolation

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
PBS Puffer	SAFC	Hamburg, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
BSA: Albuminfraktion 5	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Whole Blood CD4 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland

## Reagenzien für die RNA-Isolation

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien für die RNA-Isolation

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Nucleo Spin RNA 2	Macherey Nagel	Düren, Deutschland
ß-Mercaptoethanol		

## Reagenzien für die cDNA-Umschreibung

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien für die cDNA-Umschreibung

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
PCR Nucleotide Mix	Roche	Mannheim, Deutschland
Protector RNase Inhibitor	Roche	Mannheim, Deutschland
Random Primer	Roche	Mannheim, Deutschland
Transcriptor Reverse Transkriptase	Roche	Mannheim, Deutschland

## Reagenzien für die quantitative PCR

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien für die quantitative PCR

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Universal Probe Librarys	Roche	Mannheim, Deutschland
Light Cycler Taq Man Master Kit	Roche	Mannheim, Deutschland

## 2.1.1 Für die quantitative PCR verwendete Primer

Tabelle 5: Für die quantitative PCR verwendete Primer, für die Referenzgene

Gen Name	Primersequenz (5'→3')	Länge (Bp)
PL-B2M-For	TTC TGG CCT GGA GGC TAT C	19
PL-B2M-Rev	TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT TC	23

PL-PBGD-For	CCT GTT TAC CAA GGA GCT TGA	21
PL-PBGD-Rev	GGA GTG AAC AAC CAG GTC CA	20
PL-HPRT-For	TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC	24
PL-HPRT-Rev	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	20
PL-G6PDH-For	GCA AAC AGA GTG AGC CCT TC	20
PL-G6PDH-Rev	GGG CAA AGA AGT CCT CCA G	19

## Tabelle 6: Für die quantitative PCR verwendete Primer, für die Zielgene

Gen Name	Primersequenz (5'→3')	Länge (Bp)
PL-Bmal1-For	GCA GCT CCA CTG ACT ACC ATT	21
PL-Bmal1-Rev	GCA TCT CCT AGT GGG CAT CT	20
DL D2 E2		20
PL-Per2-For2	GGA GTT CAA GGC TAC GGT GA	20
PL-Per2-Rev2	CCA GTG GCC CAC ACA TTT	18
PL-Per1-For2	CCC TAT CTC ACT CTC CTC AGA CA	23
PL-Per1-Rev2	GCT GGG TCA GGG GCT ACT	18
DI D 1 E	TOO ACT TOO TOO ACC TITE O	10
PL-Per3-For	TCC AGT TGG TCC AGC TTT G	19
PL-Per3-Rev	TCC TCA TTT AGT GGG CTC GT	20
PL-Clock-For	GAG AGC GCG AAG GAA ATC T	19
PL-Clock-Rev	GCA GCT TTG CAG GAA CAA GTA	21
PL-E4bp4-For	CCC CTT TCT TTC TCC TCG TC	20
PL-E4bp4-Rev	AGT TGG GCC TCC TTC GTT AT	20
DI Day orbor Ear	AAC TCC CTG GCG CTT ACC	18
PL-Rev-erbα-For		
PL-Rev-erbα-Rev	GAA GCG GAA TTC TCC ATG C	19
PL-IkBα-For	TGT GCC TCT TCT AGC AAT GGA	21
PL-IkBα-Rev	TTC TGG TTT GTT GAG CAG CTT	21
PL-Rorα-For	GCA TTA TTT TCT GCA TTT GTA CTG A	25
PL-Rorα-Rev	TGC AGT TTT TCA ATT TTT ACC TTT TC	26
PL-Cry2-For	CAA CAT GTA GCC CCT CTG GT	20
PL-Cry2-Rev	AAG GGG AAG CGA TCC TTA GT	20
PL-Cry1-For	CTA CTC ACC GCC AGA GCA A	19
PL-Cry1-Rev	GCT ATG CCA TCG TAG AAT TGG	21
PL-CD40L-For	TGT ATC TTC ATA GAA GGT TGG ACA AG	26
PL-CD40L-Rev	CCT CAC AGT TCA GTA AGG ATA AGG A	25
I L CD TOLL TICK		23
PL-IFN-γ-For	GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA G	22
PL-IFN-γ-Rev	TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT	21
•		

PL-IL-2-For	AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG G	22
PL-IL2-Rev	AAG TGA AAG TTT TTG CTT TGA GCT A	25
PL-Dbp-For	CTA AAC CTC CGC TCT CGG TA	20
PL-Dbp-Rev	CGC GGT CCT AAA GAT GGT T	19

## 2.2 Reagenzien für die Bestimmung der Immunfunktion

## Reagenzien für den Stimulations-Assay

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien für den Stimulations-Assay

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
X-VIVO 15	Lonza	Basel, Schweiz
PMA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Golgi Stop (Monensin)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

## Reagenzien für die intrazelluläre Färbung

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien für die intrazelluläre Färbung

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Färbung

Antikörper	Klon	Hersteller	Firmensitz
CD4-PerCP	SK3	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
CD154(40L)-APC	TRAP1	<b>BD</b> Biosciences	Heidelberg, Deutschland
CD154(40L)-PE	89-76	<b>BD</b> Biosciences	Heidelberg, Deutschland
IFN-γ-FITC	45-15	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland
IL-2-PE	N7.48A	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland
IL-4-PE	7A3-3	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland
IL-17-APC	41802	R+D Systems	Minneapolis, USA
IgG1/FITC	DAK-GO1	Dako	Glostrup, Dänemark
IgG2a/RPE	DAK-GO5	Dako	Glostrup, Dänemark
IgG1/RPE	DAK-GO1	Dako	Glostrup, Dänemark
IgG1/APC	MOPC-21	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

## 2.3 Reagenzien für die durchflusszytometrische Reinheitskontrolle der CD4<sup>+</sup>T-Zellen

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die FACS Kontrolle

Antikörper	Klon	Hersteller	Firmensitz
CD4-APC	M-T466	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland
IgG1/APC	MOPC-21	<b>BD</b> Biosciences	Heidelberg, Deutschland

## 2.4 Reagenzien für die Hormonbestimmung

## Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die Hormonbestimmung

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Immulite 1000 System für hGH,		_
Cortisol, Prolaktin	Siemens	Los Angeles, USA
Radioimmunoassay	IBL	Hamburg, Deutschland

## **2.5 Sonstige Reagenzien**

## **Tabelle 12: Sonstige Reagenzien**

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Trypan Blau Stain 0,4%	Invitrogen GmbH	Darmstadt, Deutschland

## 2.6 Laborbedarf

## **Tabelle 13: Verwendeter Laborbedarf**

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipetten Reference und Research	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sarstedtröhrchen 10 und 50ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen 1,4ml	Micronic B.V.	Lelystad, Niederlande
FACS-Röhrchen 5ml	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Heparinröhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

## 2.7 Geräte

## Tabelle 14: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Auto MACS Separator	Miltenyi Biotec	Gladbach, Deutschland
Thermocycler Primus 96 Plus	MWG AG Biotech	München, Deutschland
Light Cycler	Roche	Mannheim, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Heraeus	Langenselbold, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus	Langenselbold, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiostar plus	Zeiss	Jena, Deutschland
Vibrofix VF1 Elektronik	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Magnetrührer Ikamag Reo	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Waage BL 150	Satorius	Göttingen, Deutschland
Sterile Werkbank Antares 72	Steril S.p.a.	Mailand, Italien
Brutschrank IG 150	Jouan	Unterhaching, Deutschland
Kühlschrank Liebherr profi Line	Liebherr	Bulle, Schweiz
Tiefkühlschrank -25 °C Comfort	Liebherr	Bulle, Schweiz
Tiefkühlschrank -80 °C Modell 723	Forma Scientific	Ohio, USA
Actiheart	Neurotechnilogie	Cambridge, England

Temperatursonde YSI Precision Minilogger EEG 24-Kanal-Schreiber Neurofax Immulite Analysegerät HPLC Geräte Yellow Springs Ohio, USA
Mini-Mitter CO Bend, USA
Nihon Kohden Japan
Siemens Medical Los Angeles, USA
Merck-Hitachi Darmstadt, Deutschland

## 3. Methoden

## 3.1 Überblick

Sieben Probanden (Charakterisierung siehe unten) wurde über eine Dauer von 24 Stunden alle drei Stunden Blut abgenommen. Aus dem Blut wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Ein Teil dieser Zellen wurde unmittelbar nach Aufreinigung lysiert, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR die Expression von Uhrengenen bestimmt. Ein anderer Teil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde für sechs Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Diese Zellen wurden anschließend intrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie die intrazelluläre Zytokinkonzentration bestimmt.

Bei drei Probanden wurde zusätzlich die Uhrengenexpression *in vitro* untersucht. Dafür wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen vom ersten 18<sup>00</sup> Uhr-Zeitpunkt bei 37 °C inkubiert und im Drei-Stunden-Intervall Zellen entnommen, lysiert, RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR die Uhrengenexpression gemessen.

Zur objektivierbaren Beurteilung von Schlafdauer und -architektur wurden polysomnographische Aufzeichnungen der Hirnstromaktivität und der Herzaktivität nach den im SFB 654 (Plasticity and Sleep) etablierten Protokollen durchgeführt [90, 139]. Außerdem wurden die Körperkerntemperatur sowie die Spiegel zirkadian regulierter Hormone bestimmt.

## 3.2 Probanden

Im Rahmen einer Schlaf-Studie, die in Zusammenarbeit mit Teilprojekten aus dem Sonderforschungsbereich 654 durchgeführt wurde, wurden in der vorliegenden Arbeit periphere Blutzellen von sieben Probanden untersucht.

## 3.2.1 Einschlusskriterien

- Männer im Alter von 18 bis 30 Jahren
- -BMI von 20 bis 25
- Nichtraucher mindestens seit sechs Wochen
- Kein Drogenkonsum

- Keine Blutentnahmen (>200 ml) in den letzten sechs Wochen
- Keine Nadelangst oder Angst in engen Räumen
- Keine Allergien in den letzten sechs Wochen mit den Symptomen Rhinitis,
   Konjunktivitis, Asthma und keine behandlungsbedürftigen Allergien in den letzten zwei
   Jahren
- Keine Desensibilisierungsbehandlung einer Allergie in den letzten drei Monaten
- Keine akute oder chronische Erkrankung
- Keine regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Keine Schlafstörungen
- Keine Flugreisen mit einer Dauer von > 6 Stunden in den letzten sechs Wochen
- Kein Aufenthalt in den Tropen in den letzten drei Monaten
- Kein Schichtdienst oder Nachtdienst in den letzten sechs Wochen
- Kein Leistungssport, der zu einem Ruhepuls von < 45 bpm führt
- Kein privater oder beruflicher Stress zum Zeitpunkt der Studie
- Keine Teilnahme an anderen Studien in den letzten sechs Wochen, in denen
   Medikamente verabreicht wurden, in denen mehr als 200 ml Blut abgenommen wurde oder in denen Schlafentzug durchgeführt wurde.

Durch eine eingehende Anamnese und orientierende Blutanalytik konnten akute und chronische Erkrankungen ausgeschlossen werden. Die Probanden wurden aufgefordert, mindestens sechs Wochen vor Studienbeginn einen regelmäßigen synchronisierten Schlaf-Wach-Rhythmus einzuhalten. Eine Woche vor Studienbeginn wurde eine Adaptationsnacht unter Versuchsbedingungen im Schlaflabor des SFB 654 durchgeführt.

Die Teilnehmer wurden zuvor über das Ziel der Studie informiert und sie gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Lübeck genehmigt (Aktenzeichen: 91-025).

## 3.3 Versuchsablauf im Schlaflabor

Der Versuchsablauf begann um 17<sup>00</sup> Uhr mit dem Legen einer Verweilkanüle in eine oberflächliche Unterarmvene und der Vorbereitung für die Aufzeichnung der Polysomnographie und der Herzfrequenz. Die Verweilkanüle war mit einem langen Perfusorschlauch verbunden, der in einen Nebenraum führte, sodass über diesen Schlauch

Blut abgenommen werden konnte, ohne die Nachtruhe des Probanden zu stören. Um die Durchgängigkeit des Schlauches und der Kanüle zu erhalten, wurde über 24 Stunden 500 ml isotone NaCl-Lösung infundiert. Des Weiteren wurden die Probanden mit einer rektalen Temperatursonde versehen, die eine kontinuierliche Messung der Körperkerntemperatur ermöglichte.

Um 18<sup>00</sup> Uhr begannen die Aufzeichnungen der Herzfrequenz und der Körpertemperatur, zudem wurde die erste Blutentnahme durchgeführt. Weitere Blutentnahmen folgten im Drei-Stunden-Intervall, d. h. um 21<sup>00</sup>, 24<sup>00</sup>, 3<sup>00</sup>, 6<sup>00</sup>, 9<sup>00</sup>, 12<sup>00</sup>, 15<sup>00</sup> und 18<sup>00</sup> Uhr, sodass insgesamt an neun Zeitpunkten Blut verfügbar war. Um 19<sup>30</sup>, 8<sup>30</sup> und 13<sup>30</sup> Uhr erhielten die Probanden standardisierte Mahlzeiten (s. Tab. 15). Um 23<sup>00</sup> Uhr wurde das Licht ausgeschaltet, sodass die Probanden schlafen konnten. Ab 6<sup>30</sup> Uhr wurden die Probanden geweckt.

Tabelle 15: Energiegehalt (Megajoule) der Makronährstoffe der standardisierten Mahlzeiten

	Kohlenhydrate	Fett	Eiweiß
Frühstück	1,9	1,3	0,6
Mittagessen	1,9	1,9	0,7
Abendmahlzeit	0,7	0,5	0,5

## 3.3.1 Kontrolle der Schlafarchitekur

Die Hirnströme wurden zwischen 23<sup>00</sup> und 6<sup>30</sup> Uhr polysomnographisch durch einen 24-Kanal-Schreiber aufgezeichnet. Zusätzlich wurden das Elektromyogramm (EMG), das horizontale und vertikale Elektrookulogramm (EOG) und die Körperbewegungen erfasst. Die Platzierung der Elektroden auf Position C3 und C4 des EEGs erfolgte nach dem internationalen 10:20 System nach Jaspar [90], die EOG- und EMG-Elektroden wurden nach den Ausführungen von Rechtschaffen und Kales [139] positioniert. Die Aufzeichnungen wurden anschließend offline nach den Kriterien von Rechtschaffen und Kales [139] mit dem Programm "SchlafAus", Version 1.5.0.1, durch eine von der Studie unabhängige, erfahrene Person ausgewertet. Zusätzlich wurden der Schlafbeginn, die absolute Schlafdauer und die Gesamtdauer der einzelnen Schlafstadien (wach, Stadium 1, 2, 3, 4 und REM (engl. Rapid Eye Movement) Schlaf) analysiert. Dabei wurde der Tiefschlaf (SWS (engl. Slow Wave Sleep)) den Schlafstadien 3 und 4 zugeteilt. Der Schlafbeginn wurde definiert durch das erstmalige Auftreten der Schlafstadien 1 und 2 und der Abwesenheit von SWS und Rem-Schlaf. Die Auswertung der polysomnographischen

Aufzeichnungen wurde am Institut für Neuroendokrinologie der Universität zu Lübeck durchgeführt.

## 3.3.2 Herzfrequenz, Rumpfbewegungen und Körperkerntemperatur

Die Probanden waren mit einem Sensor ausgestattet, welcher die Herzfrequenz und die Rumpfbewegungen in der Körperlängsachse messen konnte. Die Daten wurden in einminütigen Intervallen gespeichert. Die Körpertemperatur wurde durch eine rektale Sonde über 24 Stunden in 0,5-minütigen Intervallen registriert. Um Daten im Drei-Stunden-Intervall für die statistischen Berechnungen zu erhalten, wurden Daten von einer Stunde um den jeweiligen Messpunkt gemittelt.

## 3.4 Hormonbestimmungen

Aus den Blutproben wurden die Hormone Cortisol, Adrenalin, GH (engl. Growth Hormone, Somatotropin), Prolaktin, und Melatonin bestimmt.

Die Cortisol-, GH- und Prolaktin-Bestimmung erfolgte mittels Immulite- und Immulite 1000-Chemilumineszenz-Immunoassay. Adrenalin wurde mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) im Plasma gemessen. Die Melatonin-Konzentration wurde mit einem kompetitiven Radioimmunoassay bestimmt. Die Analysen wurden im Institut für Klinische Chemie der Universität zu Lübeck durchgeführt.

## 3.5 Isolation von CD4<sup>+</sup>T-Zellen

Die Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS, engl. Magnetic cell separation). Dabei werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen über monoklonale Antikörper mit magnetischen Mikropartikeln markiert. Die Zellsuspension wird anschließend auf eine Trennsäule mit einer Matrix aus Stahlwolle gegeben, welche sich in einem Magnetfeld befindet. Die markierten Zellen werden in der Säule zurückgehalten, nach Ausschaltung des Magnetfeldes können sie dann gewonnen werden.

Pro Proband und Zeitpunkt wurden 2 ml Heparin-Vollblut mit 100µl "Whole Blood CD4 Micro Beads" vermischt und bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert, anschließend mit etwa 10 ml MACS Puffer (Running Buffer: PBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA) gewaschen und abzentrifugiert (445 x g, 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Schnellanlauf und ohne

Bremse). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit der doppelten Menge MACS-Puffer verdünnt.

Zur Reinheitskontrolle wurden von jeder Fraktion der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen 2 x 10<sup>4</sup> Zellen entnommen, ein Teil davon mit CD4<sup>+</sup> Allophycocyanin (APC) markierten monoklonalen Antikörpern und ein anderer Teil zur Isotypen-Kontrolle mit APC Maus IgG1 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

Die eingesetzten Zellzahlen wurden mittels Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

## 3.6 Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression

#### 3.6.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Prinzip der reversiblen Adsorption auf einer Silika-Oberfläche.

Der Lyse-Puffer lysiert die Zellen und inaktiviert die RNAsen. Die RNA wird auf eine Säule gegeben, wo sie an einer Silika-Membran bindet. Kontaminierende DNA wird im Aufreinigungsprozess durch DNAse Verdau entfernt. Nach mehreren Waschschritten mit verschiedenen Puffern zur Entsalzung und Entfernung von Zellbestandteilen (siehe unten) wird die aufgereinigte RNA durch schwach ionische Wechselwirkungen mit RNAse-freiem Wasser eluiert.

 $5 \times 10^5$  der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Lysispuffer (RA1, Guanidiniumthiocyanat +  $\beta$ -Mercaptoethanol 100:1) lysiert. Die Lysate wurden für die spätere RNA-Isolation bei -80 °C eingefroren.

Das aufgetaute Lysat wurde auf einen Nucleo Spin-Filter gegeben, zentrifugiert, mit 350µl 70 % Ethanol vermischt und auf die Nucleo Spin RNA-Säule gesetzt. Nach Zentrifugation (30 sec. 11000 x g, Raumtemperatur) hatte sich die RNA an die Membran gebunden; es wurde dann MDB (Membrane Desalting Buffer) hinzugegeben und erneut zentrifugiert, um die Membran zu entsalzen. Durch Zusatz von 95µl DNase reaction mixture und anschließender 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA verdaut. Es fanden nun die Waschgänge statt, zuerst mit 200µl Waschpuffer RA2, dann mit 600µl Waschpuffer RA3 und zuletzt mit 250µl RA3. Zwischen jedem Waschgang wurde zentrifugiert (30 sec. 11000 x g, Raumtemperatur). Im letzten Schritt wurde die gereinigte RNA durch Zugabe von 40µl RNase-freiem Wasser plus 0,1µl "RNase Inhibitor" eluiert.

## 3.6.2 cDNA-Synthese

cDNA (engl. complementary DNA) wird unter Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase (RNA abhängige DNA Polymerase) aus RNA synthetisiert [41, 69].

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde im Thermocycler durchgeführt. Den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen zeigen Tabelle 16 und Tabelle 17.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Reverse Transkriptase

Reagenzien	Volumen in μl
RNA	5
Wasser (RNAse frei)	6
Reaktions Puffer 5x	4
Denucleotid Mix	2
Random Primer	2
Protector RNAse Inhibitor	0,5
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkriptase

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Prozess
10	25	Annealing
60	50	Elongation
5	85	Denaturierung

## 3.6.3 Quantitative PCR

Die quantitative PCR kann die Menge spezifischer cDNA in einer Probe bestimmen und ermöglicht so nach Umschreibung RNA-Expressionsanalysen. Grundlage bildet eine Polymerase-Kettenreaktion, bei der zusätzlich zu den genspezifischen Primern Sonden verwendet werden, welche mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und mit einem Quencher am 3'-Ende markiert sind. Die Reporter-Fluoreszenzemission wird durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. Das 3'-Ende der Sonde ist durch ein Didesoxynukleotid oder durch eine Phosphatgruppe blockiert, damit es nicht als Primer fungieren kann [81].

Wenn sich die Primer an die cDNA binden, so lagern sich auch die Sonden an den zu bestimmenden cDNA-Abschnitt an. Da die verwendete Taq-Polymerase auch eine 5'-, 3'-Exonukleaseaktivität besitzt, wird die Sonde degradiert und es kommt zur räumlichen

Trennung von Quencher und Reporter, wobei auch die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird. Die steigende Intensität der Reporterfluoreszenz wird gemessen - ihre Zunahme ist proportional zur Zahl der neu gebildeten DNA-Stränge. Ermittelt wird der Zeitpunkt, an dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt; zu diesem Zeitpunkt vermehren sich die DNA-Fragmente exponentiell.

Für jede zu quantifizierende Gen-Sequenz ist es vorab notwendig, durch eine Verdünnungsreihe eine Standardkurve zu erstellen, mit der das erhaltene Ergebnis aus der zu quantifizierenden DNA verglichen wird und so auf die ursprünglich vorhandene DNA-Menge rückgeschlossen werden kann. Das Ergebnis wird mit einer in jedem Lauf mitgeführten Calibrator-DNA abgeglichen. Durch die Standardkurve und die Calibrator-DNA werden die Effizienz des einzelnen PCR-Laufes und die Effizienz der PCR einer Gen-Sequenz korrigiert. Das erhaltene Ergebnis über die Menge an DNA eines bestimmten Genabschnittes (Zielgen) lässt sich ins Verhältnis zu der Menge cDNA eines anderen Gens (Referenzgen) setzen.

Die quantitative PCR wurde mit dem "Taq Man Master Kit" unter Verwendung der "Universal Probe Library" durchgeführt. Den Reaktionsansatz, welcher auf die Kapillaren gegeben wurde und die Reaktionsbedingungen zeigen Tabelle 18 und Tabelle 19.

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die quantitative PCR

Reagenzien	Volumen in μl
Wasser	10,4
Universal Probe Library Probe	0,2
Forward Primer	0,2
Reverse Primer	0,2
Master Mix, 5x konz.	4
cDNA	5

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für die quantitative PCR

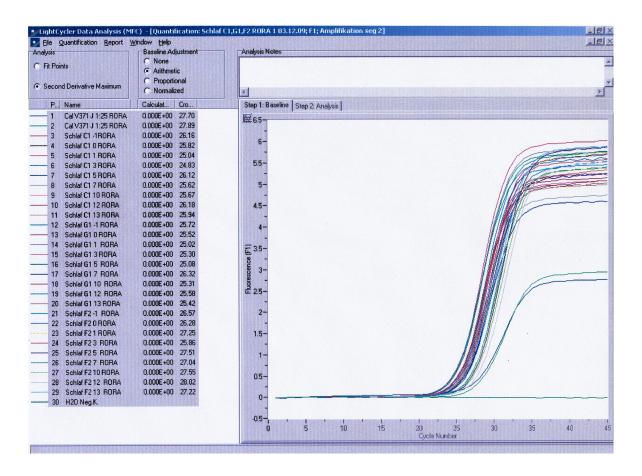
Zyklus	Zeit	Temp. [°C]	Prozess
1	10 min	95	Aufheizen
45	10 s	95	Denaturierung
	30 s	60	Binden der Primer
	1 s	72	Synthese der DNA
1	30 s	40	Abkühlung

Pro Bestimmung wurden drei Einzelläufe bei allen Zeitpunkten eines Probanden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis gesetzt zu vier Referenz-Genen (Housekeeping Gene), welche verschiedenen Stoffwechselwegen entstammen und von

denen angenommen werden kann, dass sie keiner zirkadianen Expressionsänderung unterliegen. Folgende Referenz-Gene wurden verwendet: *Phosphoribosyl-Transferase Gen (HPRT), Porphobilinogen Deaminase (PBGD), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) und Beta-2-Microglobulin (B2M)*. Dazu ins Verhältnis gesetzt wurden folgende Ziel-Gene: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like (Bmall), Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Clock), Period2 (Per2), Period3 (Per3), Cryptochrome1 (Cry1), Cryptochrome2 (Cry2), Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor Alpha (Rora), Orphan Nuclear Receptor NR1D1 (Rev-erbα), Nuclear Factor, Interleukin 3 regulated (E4bp4), D Site of Albumin Promoter (Albumin D-Box) binding Protein (Dbp), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 4 (IL-4), Interferon Gamma (IFN-γ), Inhibitor of Nuclear Factor κΒα (IκΒα) und CD40Ligand (CD154).* 

Die erhaltenen Daten eines Laufes wurden durch ihren Mittelwert geteilt und mit den anderen beiden Läufen gemittelt. Dieses Ergebnis wurde schließlich mit den Ergebnissen der anderen Referenz-Gene gemittelt, sodass man pro Proband und Ziel-Gen eine Kurve erhielt.

Zum ersten Zeitpunkt um 18<sup>00</sup> Uhr wurde von drei der sieben Probanden zusätzlich isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in X-VIVO 15 Kulturmedium aufgenommen, in neun 2ml Eppendorfgefäße je 2x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert. Alle drei Stunden wurde eine Probe entnommen und analog zu den frisch isolierten Zellen für die quantitative PCR weiterverarbeitet. Dieses Vorgehen machte es möglich, das Verhalten der untersuchten Gene außerhalb des Menschen unter *in vitro*-Bedingungen zu untersuchen. Aus diesen Proben wurden die Gene *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per2*, *Per3*, *Rev-erbα*, *Rorα*, *Dbp*, *E4bp4*, *IFN-γ* und *CD40L* analysiert. Als Referenz-Gene wurden *HPRT* und *B2M* verwendet. Das Anliegen dieses *in vitro*-Experimentes war weniger die Charakterisierung eines zirkadianen Rhythmus in Phasenlage und Amplitude, als vielmehr das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines autonomen zirkadianen Rhythmus unter *in vitro*-Bedingungen nachzuweisen. Aus diesem Grund fand eine Beschränkung auf drei Probanden statt, da von einer größeren Anzahl an Probanden, wie bei dem *ex vivo*-Experiment, hier kein zusätzlicher Erkenntnisgewinn zu erwarten war.



**Abbildung 2:** Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Lauf der quantitativen PCR für die mRNA des Gens  $Ror\alpha$  bei einem der Probanden.

## 3.7 Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellfunktion

## 3.7.1 Stimulations-Assay

Zur Messung des frühen Aktivierungsmarkers CD40L und der für T-Zellen charakteristischen Interleukine IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-17 wurden 4 x 10<sup>5</sup> der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Phorbol Myristate Acetat (PMA) und Ionomycin für sechs Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die intrazellulär gebildeten Zytokine für die spätere durchflusszytometrische Analyse gefärbt.

Pro Proband und Zeitpunkt wurden 4 x 10<sup>5</sup> der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in zwei 2ml-Eppendorf-Gefäße gegeben. Nach Abzentrifugation (300 x g, 5 min., RT) und Verwerfen der Überstände wurden die Zellen mit je 200µl X-VIVO15, welches 5ng/ml PMA und 500ng/ml Ionomycin enthielt, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation wurden dem Assay je 2µl GolgiStop (enthält 3 mmol/l Monensin) zugefügt, um den Transport der

neu gebildeten Zytokine vom Golgi-Apparat zu stoppen und so eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu erreichen. Beim ersten Zeitpunkt um 18<sup>00</sup> Uhr wurde je eine Isotypenkontrolle für die Auswertung am Durchflusszytometer und eine Negativkontrolle, welche nicht stimuliert wurde, mitgeführt.

Nach Ende der Inkubation wurden die Eppendorfgefäße zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Zellen mit 200µl MACS-Puffer resuspendiert und unter Verwendung des "Inside Staining Kit" fixiert und intrazellulär gefärbt. Dazu wurde 200µl "Inside Fix" hinzugegeben und die Zellen 20 Minuten unter Abschluss von Licht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, die Überstände verworfen, in 500µl MACS-Puffer aufgenommen und bei 4 °C bis zur weiteren intrazellulären Färbung aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abermals zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellen in 500µl "Inside Perm" aufgenommen, es folgte ein weiterer Zentrifugengang und das Entfernen der Überstände. Die Zellen wurden nun in 90μl "Inside Perm" und 10μl Anti-IFN-γ-Antikörper aufgenommen und für 30 Minuten unter Abschluss von Licht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden den Zellen 1ml "Inside Perm" hinzugefügt, zentrifugiert, Überstände entfernt und in MACS Puffer resuspendiert. Bis zur folgenden durchflusszytometrischen Analyse mussten die Zellen unter Abschluss von Licht bei 4-8 °C aufbewahrt werden. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach dem gleichen Protokoll wurden die Zytokine IL-2, IL-4, IL-17 und der Aktivierungsmarker CD40L gefärbt. Dabei wurden IFN-γ und IL-2 parallel bei den gleichen Zellen gefärbt, IL-4 und IL-17 hingegen separat. Alle Zellen wurden CD40L und CD4-PerCP co-gefärbt. Die CD40L-Färbung diente der Unterscheidung zwischen aktivierten und nicht aktivierten Zellen, die CD4-Färbung diente neben der Reinheitskontrolle der Sicherheit nur CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Auswertung zu berücksichtigen. Die Tabelle 20 zeigt den Farbstoff und die durchgeführten Isotypenkontrollen.

Tabelle 20: Verwendete Antikörper und Isotypenkontrolle

Zytokin, Farbstoff	Isotypenkontrolle, Farbstoff
CD4-PerCP	
CD154(40L)-APC	IgG1/APC
CD154(40L)-PE	IgG1/RPE
IFN- γ-FITC	IgG1/FITC
IL-2-PE	IgG2a/RPE
IL-4-PE	IgG1/RPE
IL-17-APC	IgG1/APC

## 3.7.2 Durchflusszytometrische Analyse

Mit der Durchflusszytometrie (FACS engl.: fluorescence activated cell sorting) lassen sich Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (Zellgröße und Granularität), sowie durch verschiedene Antigene, welche mit einem Fluorophor-tragenden Antikörper angefärbt wurden, unterscheiden. Die an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE), werden mit einem Argon-Laser mit der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Emissionsmaxima beider Fluoreszenzfarbstoffe liegen in unterschiedlichen Wellenbereichen, sodass es möglich ist, beide zugleich zu messen. Die Größe der Zellen kann durch die Lichtstreuung bzw. durch die Verschattung der Photodiode in Vorwärtsrichtung und die Granularität durch die Lichtstreuung in Seitwärtsrichtung erfasst werden.

Anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals wird unterschieden, ob eine Zelle für das gefärbte Merkmal positiv oder negativ ist. Zusätzlich ist es möglich, durch die Funktion GeoMean die mittlere Fluoreszenz einer ausgewählten Zellpopulation zu bestimmen, was der mittleren Fluoreszenz einer Zelle dieser Population entspricht.

Die Analysen wurden mit dem Gerät FACS Calibur von BD Biosciences und der FloJo Software von TreeStar (Ashland, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden in MACS Puffer aufgenommen und am Laserstrahl vorbeigeführt. Pro Proband und Zeitpunkt entstanden so vier Diagramme, je eines von IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-17. CD40L war jeweils co-gefärbt. Aus den unterschiedlichen CD40L-Färbungen wurde für die Einzeldarstellung von CD40L der Mittelwert errechnet.

## 3.8 Fehlende und abweichende Werte

Ein Wert, welcher in der Dreifachbestimmung bei der quantitativen PCR mehr als dreifach von dem Mittelwert der beiden anderen Bestimmungen abwich, wurde als Ausreißer definiert und nicht berücksichtigt. Welche Werte dies betraf, zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21: Aus der Wertung genommene Werte

Proband Nr.	Lauf Nr.	Zeitpunkt	Gen
1	3	$9^{00}$	Ror lpha
2	3	$9^{00}$	PBGD, B2M, G6PDH, HPRT
3	3	$24^{00}$	Per 3
4	3	$12^{00}$	Rev-erb $lpha$
5	3	$12^{00}$	Rorlpha
5	3	$12^{00}$	Rev-erbα, Per 3

III Methoden 27

Bei Proband 4 konnte aufgrund geringer Zellzahlen die Bestimmung von *E4bp4* nicht durchgeführt werden.

Aus technischen Gründen liegen von Proband Nr. 2 für Adrenalin, Melatonin und die Körpertemperatur und von Proband Nr. 5 für die Körperbewegungen und die Herzrate keine Daten vor.

### 3.9 Statistik

Statistische Bewertungen wurden mit SPSS Version 17.0, durchgeführt. Die Daten wurden als Prozent vom Mittelwert dargestellt plus/minus der Standardabweichung mit Ausnahme von Körpertemperatur und Hormonspiegel, bei denen die absoluten Daten plus/minus der Standardabweichung verwendet wurden.

Die Analyse der Zeitreihen auf das Vorliegen einer signifikanten zirkadianen Periodik erfolgte nach der Cosinor-Methode [120]. Die Berechnung basiert auf der linearen Regression einer Sinuskurve mit einer Periode von 24 Stunden und wurde mit dem Programm Circ Wave V 1.4 (Euclock München, Deutschland) durchgeführt. Nach der Methode der kleinsten Quadrate wird eine Cosinusfunktion mit einer Periodendauer von 24 Stunden den Daten einer Messreihe angepasst. Eine zirkadiane Rhythmik kann angenommen und die Nullhypothese verworfen werden, wenn sich die Anpassungsgüte der Sinuskurve im F-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p≤ 0,05 von einer den Daten angepassten Geraden unterscheidet. Die Berechnung der Signifikanz wurde einheitlich mit den Prozenten vom Mittelwert der jeweiligen Messreihe durchgeführt.

Die Berechnung der Akrophase wurde mit dem Programm GraphPad (Prism Software La Jolla, USA) durchgeführt. Den Diagrammen wurde eine Sinuskurve nach der Formel y = Mittelwert aller Werte + Amplitude sin (Frequenz x + Phasenverschiebung) hinzugefügt. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p≤ 0,05 für das Vorliegen einer zirkadianen Periodik angenommen.

# 4. Ergebnisse

Zirkadiane Rhythmen in der Expression von Uhrengenen und in der Funktion von Zellen wurden bereits in einer Vielzahl von peripheren Organen und im Immunsystem gefunden. Um differenziertere Erkenntnisse über das Immunsystem zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig am Menschen die zirkadianen Rhythmen in der Uhrengenexpression und in der Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen als richtungsgebende Lymphozyten des erworbenen Immunsystems untersucht.

Um natürliche zirkadiane Rhythmen im Immunsystem analysieren zu können, musste sichergestellt werden, dass die Probanden sich in einem physiologischen Schlaf-Wach-Rhythmus befanden, ihre Rhythmen im Hormonhaushalt und im vegetativen Nervensystem synchronisiert verliefen und die Probanden während der Studie einen normalen Schlaf hatten.

#### 4.1 Analyse des Schlafes

#### **4.1.1 EEG**

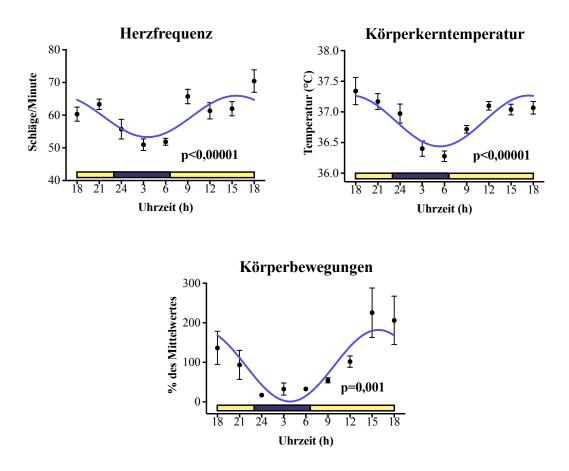
Durch die Befragung der Probanden, die Einschlusskriterien der Studie und die geforderten Schlaf- und Wachzeiten vor Studienbeginn wurde ein unphysiologischer Schlaf-Wachrhythmus ausgeschlossen.

Die Auswertung der EEGs ergab folgende Werte: Gesamtschlafdauer im Mittel 418 ± 8 min., Wachzeit in der Nacht 11 ± 3 min., Schlafstadium I 25 ± 4 min., Schlafstadium II 242 ± 8 min., Slow Wave Sleep (SWS) 67 ± 6min., Rapid Eye Movement (REM) Schlaf 72 ± 6 min. Schlafbeginn war nach 32 ± 8 min., SWS begann nach 24 ± 4 min., und REM Schlaf nach 97 ± 12 min. Eine solche Schlafarchitektur entspricht der eines normalen Schlafes unter Laborbedingungen.

# 4.1.2 Herzfrequenz, Körperbewegungen und Körperkerntemperatur

Zur Beurteilung zentraler zirkadianer Rhythmen sowie der Schlafqualität wurden die Körperkerntemperatur, die Herzfrequenz und die Körperstammbewegungen über 24 Stunden aufgezeichnet.

Während der Nacht  $(24^{00} - 7^{30})$  fanden sich bei den Probanden im Vergleich zum Tag eine geringere Herzfrequenz, eine niedrigere Körperkerntemperatur und geringere Körperbewegungen. Die Herzfrequenz war um  $3^{00}$  Uhr am geringsten, die wenigsten Körperbewegungen fanden sich in der Zeit von  $24^{00}$  Uhr bis  $6^{00}$  Uhr und die niedrigste Körperkerntemperatur konnte in den frühen Morgenstunden gegen  $6^{00}$  Uhr gemessen werden (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt die Herzfrequenz, die Körperkerntemperatur und die Körperbewegungen sieben gesunder Probanden über 24 Stunden unter Schlaflaborbedingungen. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase.

#### 4.1.3 Hormonbestimmungen

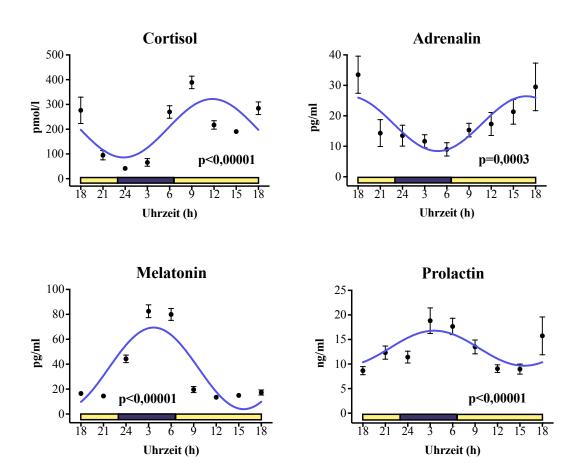
Bei einer Reihe von Hormonen sind zirkadiane Konzentrationsschwankungen beschrieben worden [170]. Die Bestimmung prototypischer Vertreter dieser zirkadian-schwankenden Hormone diente als weitere Kontrolle, um sicherzustellen, dass die Probanden physiologische Rhythmen besaßen.

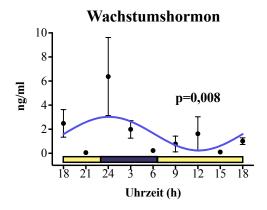
Der niedrigste Cortisolwert fand sich um 24<sup>00</sup> Uhr mit einem charakteristischen Anstieg in den frühen Morgenstunden vor dem Erwachen mit dem höchsten Wert um 9<sup>00</sup> Uhr. Bei Adrenalin fand sich eine Nachtsenke mit dem tiefsten Punkt um 3<sup>00</sup> Uhr als Zeichen eines geringeren Sympathikotonus.

Bei Melatonin zeigte sich ein deutlicher nächtlicher Anstieg mit einem Peak bei  $3^{00}$  Uhr.

Beim Wachstumshormon (GH, growth hormone) fand sich ein Spitzenwert bei  $24^{00}$  und ein Tiefpunkt bei  $6^{00}$  und  $15^{00}$  Uhr.

Bei Prolaktin lag der höchste Wert bei 3<sup>00</sup> und der Tiefpunkt bei 15<sup>00</sup> Uhr (siehe auch die Abbildung 4).

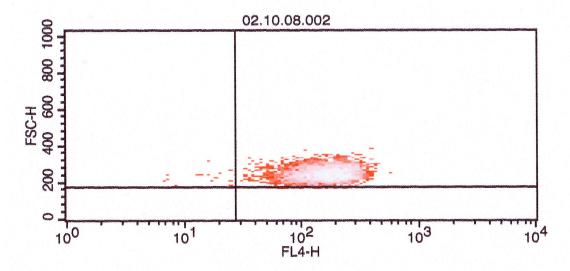




**Abbildung 4:** Die Abbildung zeigt die Hormone Cortisol, Adrenalin, Melatonin, Prolactin und GH von sieben gesunden Probanden über 24 Stunden unter Schlaflaborbedingungen. Die Hormone wurden alle drei Stunden im peripher venösen Blut bestimmt. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase.

# 4.2 Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Von jedem Probanden und jedem Zeitpunkt wurde eine Probe der isolierten  $CD4^+$  T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Reinheit der  $CD4^+$  T-Zellen lag im Mittel bei 95 %  $\pm 0.5$  % (SEM).



**Abbildung 5:** Die Abbildung zeigt die Durchflusszytometrie von separierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche mit Allophycocyanin-Antikörpern markiert wurden. Im gewählten oberen rechten Gate sind 98% der Zellen CD4-positiv. Gegeneinander aufgetragen sind das Vorwärtsstreulicht (FSC-H, Forward Scatter), welches mit der Größe der gemessenen Zellen korreliert und der Logarithmus der Fluoreszenzintensität (FL4-H) des verwendeten CD4 APC-Antikörpers. Prototypische Daten von einem Probanden zum Zeitpunkt 18<sup>00</sup> Uhr.

### 4.3 Untersuchung zirkadianer Genexpression

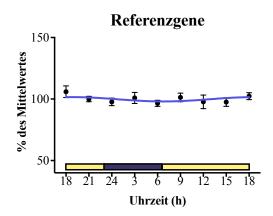
Um die molekulare Uhr in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurden Gene aus dem positiven und negativen Schenkel sowie Gene der zusätzlichen Rückkopplungsschleifen in ihrem Expressionslevel bestimmt.

Dazu wurde den Probanden alle drei Stunden Blut abgenommen, die CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR quantifiziert.

## 4.3.1 Haushaltsgene (Referenzgene)

Um zirkadiane Schwankungen in der Expression einzelner Gene detektieren zu können, ist es notwendig, möglichst konstant exprimierte Referenzgene zu verwenden.

Die vier in der Studie verwendeten Haushaltsgene, welche als Referenz dienten, zeigen zwar in einzelnen Kurven Schwankungen über 24 Stunden, in der Summe gegeneinander aufgetragen bilden sie jedoch annähernd eine Gerade (siehe Abbildung 6). Auch in der statistischen Auswertung ließ sich innerhalb der Referenzgene keine signifikante zirkadiane Rhythmik finden.

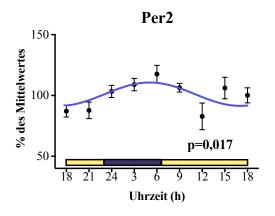


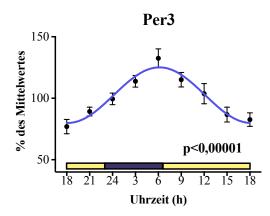
**Abbildung 6:** Die Abbildung zeigt die relative Expression der Referenzgene *HPRT*, *B2M*, *G6PDH* und *PBGD* über 24 Stunden. Bei der Darstellung wurde die Expression von *HPRT*, *B2M*, *G6PDH* auf *PBGD* bezogen. Zur Bestimmung wurde sieben gesunden Probanden unter Schlaflaborbedingungen alle drei Stunden Blut entnommen. Aus dem Blut wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression der dargestellten Gene analysiert. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.

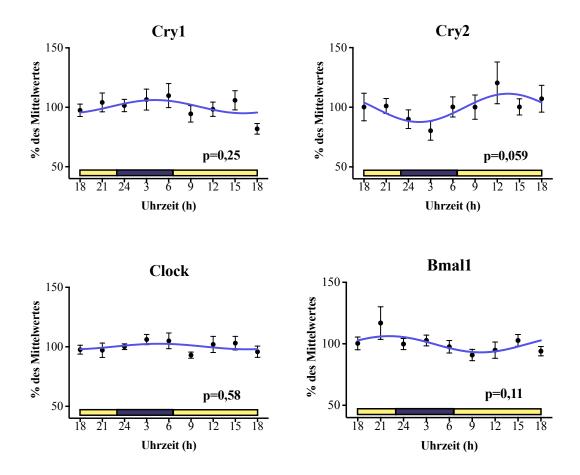
#### 4.3.2 Zirkadiane Oszillation der Uhrengene

Zunächst wurden die Expressionslevel von *Clock* und *Bmal1* der aktivierenden Elemente und *Per2*, *Per3*, *Cry1* und *Cry2* der reprimierenden Elemente des Uhrenmodells untersucht (zur Erläuterung siehe Abbildung 1). In der statistischen Berechnung zeigten sich eine signifikante Rhythmik in den Expressionslevels der Gene *Per2*, *Per3* und der Trend zu einer signifikanten Rhythmik bei *Cry2* (siehe Abbildung 7). Diese Gene entstammen dem negativen Schenkel des Uhrenmodells. Die Gene des positiven Schenkels *Clock* und *Bmal1* zeigten keine signifikante Rhythmik. *Cry1* wies ebenfalls keine signifikante Rhythmik auf.

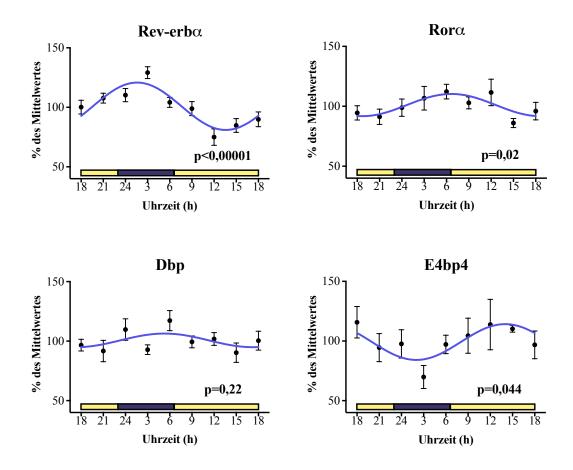
In einem nächsten Schritt wurden die Expressionslevels der Gene der zusätzlichen Rückkopplungsschleifen des Uhrenmodells untersucht. Die zusätzlichen Schleifen stabilisieren die innere Uhr und bilden die Verbindung zu Transkriptionsfaktoren. Es wurden die Expressionslevels der Gene *Rev-erba*, *Rora*, *Dbp* und *E4bp4* gemessen. Eine signifikante Rhythmik konnte bei *Rev-erba*, *Rora* und *E4bp4* festgestellt werden. Für *Dbp* zeigte sich keine signifikante Rhythmik (siehe Abbildung 8).







**Abbildung 7:** Die Abbildung zeigt die relative Expression der sechs Gene des positiven (*Clock* und *Bmal1*) und des negativen Schenkels der molekularen Uhr über 24 Stunden. Als Referenzgene wurden *HPRT*, *B2M*, *G6PDH* und *PBGD* verwendet und gemittelt. Zur Bestimmung wurde sieben gesunden Probanden unter Schlaflaborbedingungen alle drei Stunden Blut entnommen. Aus dem Blut wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression der dargestellten Gene analysiert. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.



**Abbildung 8:** Die Abbildung zeigt die relative Expression der vier Gene der zusätzlichen Rückkopplungsschleifen der molekularen Uhr über 24 Stunden. Als Referenzgene wurden *HPRT*, *B2M*, *G6PDH* und *PBGD* verwendet und gemittelt. Zur Bestimmung wurde sieben gesunden Probanden unter Schlaflaborbedingungen alle drei Stunden Blut entnommen. Aus dem Blut wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, RNA extrahiert in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression der dargestellten Gene analysiert. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.

#### 4.3.3 Autonome Rhythmen im Immunsystem

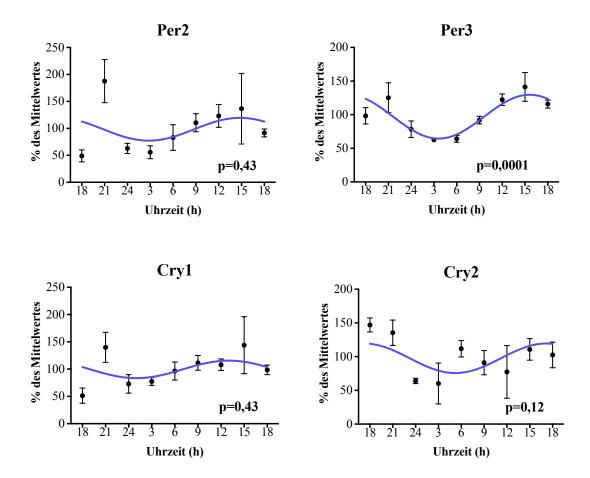
Die Quantifizierung der mRNA von Uhrengenen in frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigt, wie oben dargestellt, bei einigen Genen zirkadiane Rhythmen. Für einige periphere Uhren ist eine mögliche Steuerung durch zentral regulierte Hormone und Metabolite beschrieben [13].

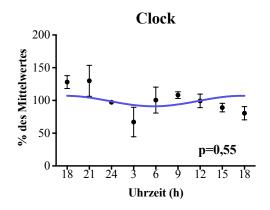
Für die Hormone Adrenalin, Cortisol, Melatonin, GH und Prolaktin fand sich bei den Probanden eine zirkadiane Rhythmik, ebenso in der Herzfrequenz und der

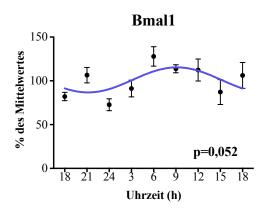
Körpertemperatur. Es wäre denkbar, dass einer dieser Parameter die gefundene Rhythmik in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterhält. Eine ähnliche Steuerung ist für einige Hormone und periphere Gewebe bereits beschrieben [12, 35]. Es sollte nun untersucht werden, ob isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter *in vitro*-Bedingungen in X-VIVO 15 Medium auch eine Rhythmik in ihrer Uhrengenexpression aufweisen.

Um dies untersuchen zu können, wurden von drei Probanden um 18<sup>00</sup> Uhr CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, diese in Medium bei 37 °C inkubiert und alle drei Stunden die Genexpression gemessen.

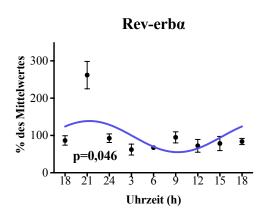
Von dem positiven und negativen Schenkel des Uhrenmodells war das Gen Per3 rhythmisch exprimiert, für Bmal1 zeigte sich ein Trend. Bei den zusätzlichen Rückkopplungsschleifen ergab sich für  $Rev\text{-}erb\alpha$  eine signifikante zirkadiane Rhythmik. Des Weiteren konnte für Cry2 und Dbp eine Spenderabhängige signifikante Rhythmik gefunden werden (siehe Abbildung 9).

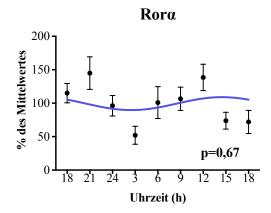


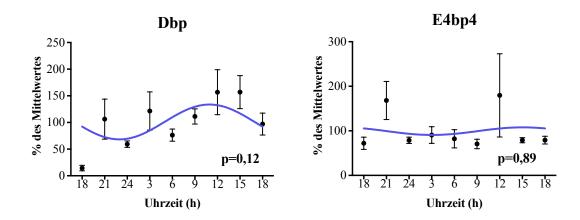




**Abbildung 9:** Die Abbildung zeigt die relative Expression der sechs Gene des positiven und des negativen Schenkels der molekularen Uhr über 24 Stunden unter *in vitro*-Bedingungen. Als Referenzgene wurden *HPRT* und *B2M* verwendet. Zur Bestimmung wurde drei gesunden Probanden um 18<sup>00</sup> Uhr Blut entnommen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, diese in Medium bei 37 °C inkubiert und alle drei Stunden bei einem Teil der Zellen RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Genexpression der dargestellten Gene analysiert. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.







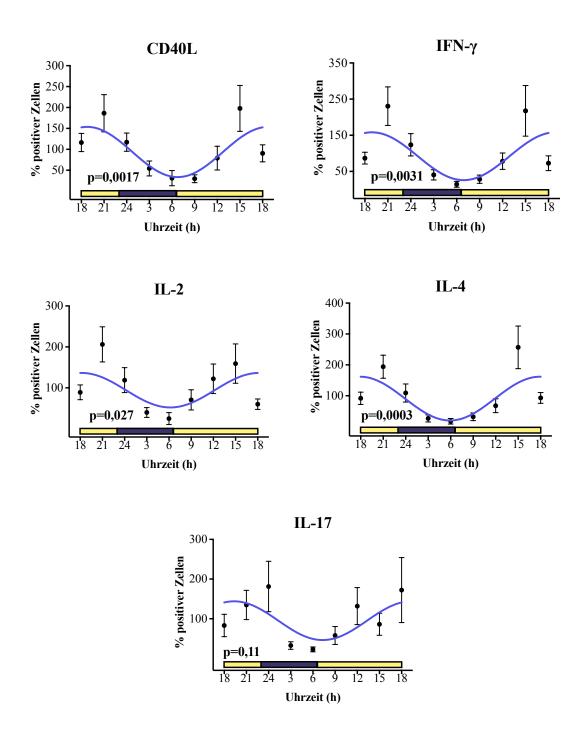
**Abbildung 10:** Die Abbildung zeigt die relative Expression der vier Gene der zusätzlichen Rückkopplungsschleifen der molekularen Uhr über 24 Stunden unter *in vitro*-Bedingungen. Als Referenzgene wurden *HPRT* und *B2M* verwendet. Zur Bestimmung wurde drei gesunden Probanden um 18<sup>00</sup> Uhr Blut entnommen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, diese in Medium bei 37 °C inkubiert und alle drei Stunden bei einem Teil der Zellen RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Genexpression der dargestellten Gene analysiert. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.

#### 4.4 Tagesabhängige T-Zellfunktionen

Eine zirkadiane Rhythmik in der Genexpression von Uhrengenen konnte in CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl bei frisch isolierten Zellen als auch unter *in vitro*-Bedingungen nachgewiesen werden. Es sollte nun untersucht werden, ob die Reaktivität einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle auch einer tageszeitabhängigen Rhythmik unterliegt.

Dazu wurde ein Stimulationsassay durchgeführt. Um hormonelle Einflüsse auszuschließen, wurden die Zellen nicht in Serum, sondern in Medium bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Nach insgesamt sechs Stunden Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-17 und die Expression des Oberflächenmarkers CD40L mittels Immunfluoreszenz visualisiert. Der Oberflächenmarker CD40L ermöglicht es, aktivierte Zellen von nicht aktivierten Zellen zu unterscheiden. Dies war notwendig, um Zellen, welche intrinsisch mehr Zytokine produzierten, unabhängig von der durchgeführten Stimulation erkennen zu können und bei den Zytokinmessungen ausschließen zu können.

Es zeigte sich eine signifikante Rhythmik in der Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die durch die Stimulation aktivierbar waren (CD40L<sup>+</sup>). Ebenso zeigte sich eine signifikante Rhythmik in der Anzahl der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche die Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-17 produzieren (siehe Abbildung 11).

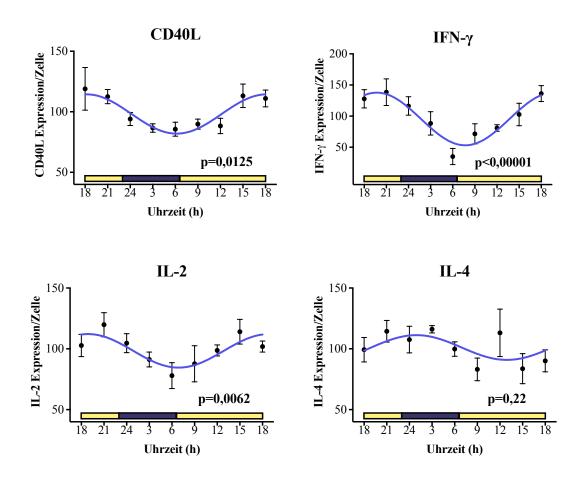


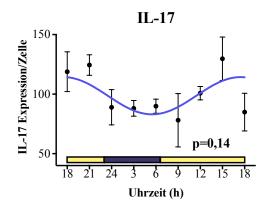
**Abbildung 11:** Die Abbildung zeigt die Anzahl der nach Stimulation aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD40L<sup>+</sup>) und die Anzahl der nach Stimulation aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche die Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-17 produzieren, über 24 Stunden. Zur Bestimmung wurde sieben gesunden Probanden unter Schlaflaborbedingungen alle drei Stunden Blut

entnommen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, in Medium inkubiert, mit PMA/Ionomycin stimuliert, nach sechs Stunden die Zytokine intrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.

Des Weiteren wurden die mittlere Konzentration des Aktivierungsmarkers CD40L<sup>+</sup> einer Zelle und die mittlere Produktion der vier Zytokine einer aktivierten Zelle gemessen. Durch diese Messung ist es möglich, das Ergebnis über die prozentuale Anzahl der stimulierbaren Zellen zu ergänzen durch eine Analyse über das Maß der Reaktion der aktivierten Zellen.

Es zeigte sich für den Aktivierungsgrad und die Produktionsmenge der Zytokine eine ähnliche zirkadiane Rhythmik wie für die Anzahl der aktivierten und zytokinbildenden Zellen. Für die Zytokine IFN-γ, IL-2 und für CD40L war die Rhythmik signifikant (siehe Abbildung 12).





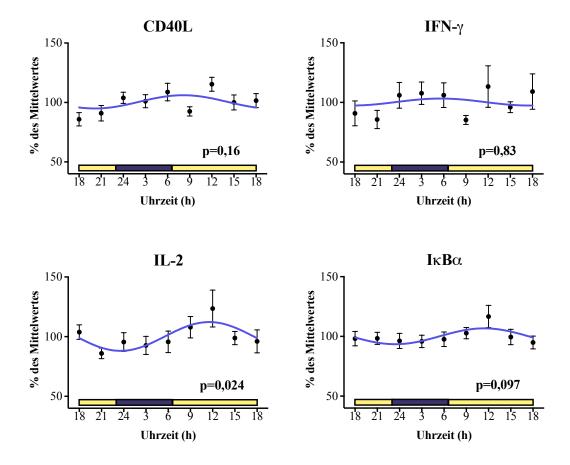
**Abbildung 12:** Die Abbildung zeigt die mittlere Produktion des Aktivierungsmarkers CD40L einer nach Stimulation aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zelle (CD40L<sup>+</sup>) und die mittlere Produktion der Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-17 einer nach Stimulation aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zelle über 24 Stunden. Zur Bestimmung wurde sieben gesunden Probanden unter Schlaflaborbedingungen alle drei Stunden Blut entnommen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, in Medium inkubiert, mit PMA/Ionomycin stimuliert, nach sechs Stunden die Zytokine intrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tag- und Nachtphase. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.

# 4.4.1 Zirkadiane Regulation der Zytokinproduktion

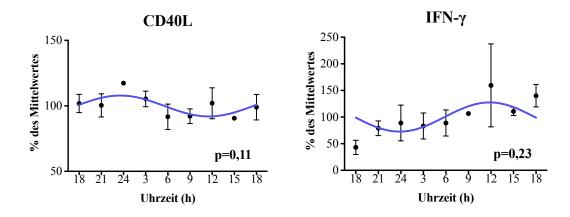
Durch die *in vitro*-Stimulation von isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine deutliche zirkadiane Regulation der Zytokinproduktion nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die Regulation der möglichen Zytokinmenge auf Ebene der mRNA stattfindet, wurde die Genexpression der mRNA von CD40L, IFN-γ, IL-2 und IκBα bei den alle drei Stunden frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zelle mittels qPCR gemessen. Zusätzlich wurden von drei Probanden um 18<sup>00</sup> Uhr CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, diese bei 37 °C inkubiert und alle drei Stunden die Genexpression von CD40L und IFN-γ gemessen. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die Zytokinproduktion auf Ebene der mRNA unter *ex vivo*- und *in vitro*-Bedingungen vergleichen zu können.

Unter *ex vivo*-Bedingungen konnte eine signifikante Rhythmik der mRNA-Expression von IL-2 gefunden werden, für IκBα ergab sich ein Trend zur Signifikanz. Bei der *in vitro*-Bedingung konnte für IFN-γ und für CD40L eine spenderabhängige Signifikanz der Rhythmik gezeigt werden.



**Abbildung 13:** Die Abbildung zeigt die relativen Expressionslevels der Gene CD40L, IFN-γ, IL-2 und IκBα über 24 Stunden. Als Referenzgene wurden *HPRT*, *B2M*, *G6PDH* und *PBGD* verwendet und gemittelt. Zur Bestimmung wurde sieben gesunden Probanden unter Schlaflaborbedingungen alle drei Stunden Blut entnommen. Aus dem Blut wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, RNA extrahiert in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression der dargestellten Gene analysiert. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die gelben und blauen Balken repräsentieren die Tagund Nachtphase. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.



**Abbildung 14:** Die Abbildung zeigt die relativen Expressionslevels der Gene CD40L und IFN-γ über 24 Stunden unter *in vitro*-Bedingungen. Als Referenzgene wurden *HPRT* und *B2M* verwendet. Zur Bestimmung wurde drei gesunden Probanden um 18<sup>00</sup> Uhr Blut entnommen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, diese in Medium bei 37 °C inkubiert und alle drei Stunden bei einem Teil der Zellen RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Genexpression der dargestellten Gene analysiert. Die Signifikanz wurde auf das Vorliegen einer zirkadianen Periodik bezogen. Die Darstellung erfolgt als Prozent vom Mittelwert plus/minus der Standardabweichung.

# 5. Diskussion

#### 5.1 Überblick

Das Wissen über die körpereigenen Uhren auf molekularer Ebene und über die Bedeutung für die Gesundheit hat in den letzten Jahren bedeutend zugenommen. Die normale Physiologie des Menschen ist auf funktionierende Uhren angewiesen [97]. Auch im Immunsystem können Tag-Nacht-Rhythmen beobachtet werden. Für das angeborene Immunsystem sind funktionell relevante zirkadiane Rhythmen beschrieben worden [9, 88]. Die hier vorliegende Arbeit konnte erstmals in Zellen des erworbenen Immunsystems des Menschen eine eigenständige zirkadiane Expression von Uhrengenen und eine zirkadiane Rhythmik in der Zytokinproduktion nachweisen.

# 5.2 Parameter der zentralen zirkadianen Regulation

Zunächst wurden Daten von Parametern der zentralen zirkadianen Regulation bestimmt, um Störungen oder Normvarianten des SCN und seiner efferenten Steuerung weitgehend ausschließen zu können. Die Synchronisation zwischen SCN und Uhren peripherer Gewebe erfolgt über das vegetative Nervensystem und das Endokrinium. Der SCN selber synchronisiert seinen Rhythmus mit Umweltfaktoren wie Hell-Dunkel-Zyklus, Schlaf-Wach-Rhythmus und Nahrungsaufnahme. Da mit komplexen Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren und Steuerebenen zu rechnen ist, reicht es für eine kontrollierte Erforschung peripherer Uhren nicht aus, die genannten Umweltfaktoren zu definieren, sondern es ist auch notwendig, das vegetative Nervensystem und das Endokrinium in charakteristischen Teilen auf eine zirkadiane Rhythmik zu untersuchen.

#### 5.2.1 Körperkerntemperatur

Die Körperkerntemperatur stellt einen leicht zugänglichen und gut dokumentierten Parameter für zentrale zirkadiane Rhythmen dar. Die Phasenlage ist dabei unabhängig von kurzfristiger Änderung der Schlafgewohnheit. Schlafentzug verringert jedoch die Amplitude der Temperaturschwankung [76]. Der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme hat Einfluss auf die Temperaturrhythmik, wobei Nahrungsaufnahme während der Nacht die zirkadiane Rhythmik der Temperaturkurve verschiebt [26]. Die gemessenen Daten

spiegeln eine normale zirkadiane Rhythmik mit regelrechter Nachtabsenkung wieder (siehe Abbildung 3).

# 5.2.2 Herzfrequenz und Adrenalin

Die Variation der Herzfrequenz gibt Hinweise auf die zirkadiane Regulation des vegetativen Nervensystems. Das vegetative Nervensystem ist ein Mittler zwischen SCN und der Expression von Uhrengenen peripherer Gewebe. Durch Stimulation des Sympathikus oder durch Adrenalininjektion konnte die Expression von Uhrengenen in der Leber von Ratten beeinflusst werden [163]. Des Weiteren haben Mäuse mit Mutationen in Uhrengenen eine von der Norm abweichende Variation in Herzrate und Blutdruck [46].

Der Serumspiegel von Adrenalin unterliegt einer zirkadianen Rhythmik, welche Hinweise zur Aktivität des adrenergen Nervensystems gibt. Unter dem vagotonen Einfluss des Parasymphatikus fällt der Spiegel zur Nacht, um am Morgen mit zunehmender Aktivität des Symphatikus anzusteigen, wobei körperliche Aktivität einen modulierenden Einfluss hat. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu Herzfrequenz und Adrenalinkonzentration reflektieren einen nächtlichen Abfall der Symphatikusaktivität mit einem Anstieg am Morgen in einer Ausprägung, wie es für eine physiologische zirkadiane Regulation beschrieben ist [99, 177] (siehe Abbildung 3 und 4). Dies ist insofern entscheidend, da eine Wirkung von Adrenalin auf die Expression von Uhrengenen beschrieben wurde [150]. Eine morgendliche Injektion von Adrenalin in die Mäuseleber erhöhte die Expression von *Per2*, wohingegen eine abendliche Injektion ohne Wirkung blieb. Demzufolge hat Adrenalin auf die Expression von *Per2* in der Leber eine ähnliche Wirkung wie Lichtexposition auf die Expression von *Per Genen* im SCN.

# 5.2.3 Cortisol und Melatonin

Die zirkadian kontrollierten Hormone Cortisol und Melatonin entstammen wichtigen Regelkreisen des zentralen zirkadianen Systems. Die hypothalamisch hypophysäre Nebennierenachse wird vom SCN kontrolliert und damit auch die Kortisolsekretion [114]. Über 24 Stunden findet man in der ersten Nachthälfte um etwa 24 Uhr die niedrigsten und am Morgen die höchsten Werte im Serum. Die Amplitude der Konzentrationsänderungen schwankt dabei um den Faktor 10 [21, 126]. Bei allen Probanden konnte der charakteristische Tiefpunkt zu Beginn der Nacht mit einem Anstieg zum Morgen gefunden

werden. Dabei betrug der Maximalwert im Durchschnitt etwa das 9,3 fache des Minimums (siehe Abbildung 4). Die zirkadiane Rhythmik der Cortisolsekretion ist bei einem funktionierenden SCN stabil, wird in der Amplitude jedoch beeinflusst durch Nahrungsaufnahme, Licht und Schlaf-Wach-Rhythmus. Nahrungsaufnahme führt zu einer Zunahme der Cortisolsekretion [56], diese relative Zunahme unterliegt ebenfalls einer zirkadianen Rhythmik [61]. Tiefschlaf während der ersten Nachthälfte senkt die basalen Cortisolwerte und macht die zirkadiane Rhythmik der Cortisolsekretion unempfindlich gegenüber Störeinflüssen [23]. Ein fehlendes Absinken der Cortisolkonzentration zu Beginn der Nacht weist auf ein Cushingsyndrom hin. Interessanterweise scheinen psychische Faktoren direkt auf die zirkadiane Rhythmik des Cortisols einzuwirken. Probanden, die glaubten, am nächsten Morgen früh aufstehen zu müssen, hatten einen früheren und steileren Cortisolanstieg am Morgen vor dem Erwachen als Probanden, welche in der Gewissheit einschliefen, am nächsten Morgen ausschlafen zu dürfen [24].

Melatonin wird in der Zirbeldrüse synthetisiert und kann die zirkadiane Rhythmik entscheidend beeinflussen [8]. Durch helles Licht wird die Melatoninsekretion unterdrückt, folgerichtig findet man während der Nacht den höchsten Serumspiegel. Ein Einfluss von Melatonin auf das Immunsystem ist beschrieben worden, wobei die Studien jedoch noch kein einheitliches Bild geben [18], jedenfalls konnte bei Immunzellen ein Rezeptor für Melatonin gefunden werden [36, 37]. Es scheint auch eine Verbindung zwischen Melatonin und der Cortisolsekretion zu bestehen. Bei vollständig blinden Personen, deren Melatoninsekretion unabhängig vom Lichteinfluss ist, zeigte eine Studie auch eine abgeschwächte Amplitude der Cortisolsekretion - diese ließ sich durch die abendliche Gabe von 5mg Melatonin normalisieren [60]. Die gemessenen Daten zeigen einen deutlichen Anstieg in der zweiten Nachthälfte verbunden mit einem ebenso starken Abfall der Konzentration beim Erwachen, welcher durch Licht unterstützt wird (siehe Abbildung 4). Entsprechende Kurvenverläufe sind in der Literatur beschrieben worden [170]. In weiteren Studien konnte auch eine Verbindung zur Körpertemperatur gefunden werden. Melatonin ist in der Lage, die Körpertemperatur während des Schlafes zu erniedrigen [29]. Dies ist in Übereinstimmung mit den gemessenen Daten, bei denen das Maximum der Melatoninsekretion zu der Zeit der niedrigsten Körpertemperatur zu finden ist (siehe Abbildung 3 und 4). Melatonin wird nicht nur vom SCN gesteuert, sondern kann wahrscheinlich auch rückkoppelnd auf den SCN wirken. Es ließ sich nachweisen, dass der SCN Melatoninrezeptoren exprimiert, welche pharmakologisch genutzt werden können [96, 127, 172].

Bezüglich der Kurvenverläufe von Cortisol und Melatonin kann von einer normalen zentralen zirkadianen Regulation ausgegangen werden.

### 5.2.4 Prolaktin und Wachstumshormon

Die beiden Hormone Prolaktin und Wachstumshormon (GH) folgen ebenfalls in ihrer Konzentration einem zirkadianen Rhythmus, dieser wird jedoch durch Schlaf bzw. Schlafentzug deutlich moduliert [19].

Vom SCN führen Bahnen zu Gehirnarealen, welche an der Schlaf-Wach-Regulation beteiligt sind, wodurch eine Beeinflussung der Sekretion von den schlafabhängigen Hormonen Prolaktin und Growth Hormone stattfindet [49]. Auch bei den hier gemessenen Werten für Prolaktin und GH finden sich keine Abweichungen zu den für diese Hormone beschriebenen zirkadianen Kurvenverläufen (siehe Abbildung 4).

Körpertemperatur, Die beschriebenen Daten Herzfrequenz über und Hormonkonzentrationen spiegeln in ihrem rhythmischen Verhalten die Regulation verschiedener Bereiche der zentralen Uhr und ihrer Verbindung zur Peripherie. Interessant ist in diesem Zusammenhang das unterschiedliche Adaptationsverhalten der einzelnen Parameter. Durch Jetlag-Studien konnte man feststellen, dass nach dem Überfliegen von sechs Zeitzonen die Herzfrequenz im Durchschnitt zwei bis drei Tage und die Körpertemperatur fünf Tage benötigt, um sich an die neue Phasenlage der zirkadianen Rhythmik zu adaptieren. Für den Plasmacortisolspiegel war sogar eine Dauer von acht Tagen zur Adaptation notwendig. Bemerkenswert war ein großer individueller Unterschied von etwa zwei bis achtzehn Tagen [176].

#### 5.2.5 EEG und Körperbewegungen

Obwohl kurzfristige Schlafstörungen die zirkadiane Uhr eher geringfügig beeinflussen und es wiederholter Störungen wie einer chronischen Schlafrestriktion bedarf, um die innere Uhr zu verstellen [19], wurden in dieser Studie EEG und Körperbewegungen als Kontrollparameter eines normalen Schlafes bestimmt und nur Probanden einbezogen, die eine normale Schlafarchitektur aufwiesen. Hierfür fanden unter anderem die Kriterien nach Rechtschaffen Anwendung [139]. Chronische Schlafstörungen wurden durch gezielte Fragen und den Einschlusskriterien ausgeschlossen. Dies ist auch vor dem Hintergrund von

Bedeutung, dass es Hinweise auf eine Schlafbeeinflussung durch Immunzellen gibt [19, 28, 95].

Die hier gemessenen Parameter der zentralen zirkadianen Regulation (Temperatur, Herzfrequenz, Hormone), sowie EEG und Körperbewegungen verdeutlichen das Vorhandensein physiologischer, zentraler, zirkadianer Rhythmen. Das experimentelle Design ist damit für die Beantwortung der gestellten Fragen geeignet.

### 5.3 Expression der Uhrengene unter ex vivo-Bedingungen

Nach heutiger Ansicht wird der Hauptoszillator der Uhr durch die vier Gene Clock, Bmal1, Per und Cry gebildet, wobei die Proteine CLOCK und BMAL1 die aktivierenden und PER und CRY die reprimierenden Elemente darstellen. Dieser sich selbst unterhaltende Oszillator wird stabilisiert und justiert durch zusätzliche Regelkreise der Gene  $Rev-erb\alpha$ ,  $Ror\alpha$ , Dbp und E4bp4, deren Proteine zusammen mit dem inneren Oszillator auch als Transkriptionsfaktoren für zirkadian regulierte Gene dienen und so das Auslesen der Uhr ermöglichen [76] (siehe Abbildung 1).

In der vorliegenden Arbeit konnten signifikante zirkadiane Rhythmen in der Transkription der Uhrengene Per2, Per3, Rorα, Rev-erbα und E4bp4 gefunden werden. Wobei Per2, Per3 und Rorα das Expressions-Maximum am Morgen erreichen, Rev-erbα in der Nacht und E4bp4 um 12 Stunden verschoben am frühen Nachmittag (siehe Abbildung 7 und 8). Es ist beschrieben worden, dass *Per2* in der Promotorregion neben der D- und E-Box eine CRE-Region (Cyclic AMP Response Element) aufweist, an der durch Licht über verschiedene Signalwege geregelt Transkriptionsfaktoren binden, die zu einer Induktion von Per2 führen. Folgerichtig findet man im SCN auch ein Maximum an Per2 am Beginn bis Mitte der Lichtphase [165, 182]. Bei dem ebenfalls unter der Regulation der E-Box stehenden Gen *Rev-erbα* wurde eine ähnliche Phasenlage wie für *Per2* gefunden. Dies trifft wahrscheinlich auch für die übrigen unter der E-Box-Regulation stehenden Gene zu, sofern sie eine Rhythmik aufweisen [44]. E4bp4 ist als gegenläufig dazu beschrieben worden, mit maximaler Aktivität in der Dunkelphase [179]. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt mangelt es an Studien, in denen sämtliche Uhrengene analysiert worden sind, sodass sich bei der Zusammenschau der vorhandenen Daten das Problem der Vergleichbarkeit von verschiedenen Geweben und Spezies sowie dem jeweiligen Lichtmanagement ergibt. Hinzu kommt, dass die zirkadiane Uhr redundant erscheint und so die Gewebe- oder Organspezifität begünstigt wird. Das Per-Gen bildet eine Familie von mindestens drei

Varianten: Per1, Per2 und Per3. In Bezug auf das Cry-Gen lassen sich Cry1 und Cry2 finden. Einzelne Mitglieder der Familien sowie  $Rev-erb\alpha$  und Clock sind z. T. gewebespezifisch entbehrlich für den zirkadianen Rhythmus [70]. Clock kann im SCN ersetzt werden durch Npas2, nicht jedoch in peripheren Geweben; hier scheint auch Cry und *Per1* notwendig zu sein [76]. Einzelne Mutationen ändern die Periode, bringen aber in den meisten Fällen die zirkadiane Rhythmik nicht zum Erliegen [76]. Jedoch beeinflusst ein Polymorphismus im *Per3* Gen den Schlafcharakter und ist für die individuelle Abendoder Morgenpräferenz verantwortlich [5]. Die überwiegende Mehrzahl der veröffentlichten Studien zu zirkadianer Rhythmik auf molekularer Ebene hat die Daten von nachtaktiven Tieren dargestellt; damit verglichen sind nur eine sehr geringe Zahl an Veröffentlichungen zu tagaktiven Tieren oder dem Menschen verfügbar. Vergleiche der Expressionsmuster von Uhrengenen im SCN von nacht- und tagaktiven Nagern ergaben fast identische Phasenlagen [34, 51, 53, 117, 171]. Die maximale Expression von *Per1*- und *Per2*-Genen wurde jeweils am Beginn der Lichtphase gemessen. Bei nachtaktiven Tieren lässt sich im Muster von Körpertemperaturschwankungen und Cortisolsekrektion eine Verschiebung um etwa 12 Stunden finden, nicht jedoch in der Melatoninsekretion [40]. Eine Anpassung der Phasenlage der peripheren Gewebe an die in die Nacht verschobene Aktivitätsphase ist anzunehmen. In Gehirnarealen außerhalb des SCN konnten Phasenverschiebungen in Uhrengenen um 12 Stunden gegenüber dem SCN bei nachtaktiven Nagern gemessen werden, nicht jedoch bei tagaktiven Nagern [171]. In peripheren Geweben wie Herz, Lunge, Leber, Magen, Milz und Niere von nachtaktiven Tieren zeigt sich bei gewebespezifischen Variationen die maximale Expression von Per2-Genen jeweils am Beginn der Dunkelphase [123, 180]. Ebenso wurde das Maximum von Per2 in mononukleären Zellen der Ratte und Peritonealmakrophagen der Maus am Beginn der Nacht gemessen [6, 78, 121]. Es muss also eine Umschaltung vom SCN auf die Phasen der peripheren Uhren stattfinden. Demgegenüber konnte beim Menschen im Vollblut und in hämatopoetischen Stammzellen das Expressionsmaximum von Per1 und Per2 um 12 Stunden verschoben am Beginn des Tages und somit etwa in Übereinstimmung mit der Phasenlage im SCN gemessen werden [162, 166]. Wegen der eingeschränkten Möglichkeiten der Gewinnung gibt es bisher kaum Daten über die Phasenlage der Uhrengene in humanen peripheren Organen. Verglichen mit den anderen Uhrengenen wurde für Per3 und Rev-erbα der robusteste zirkadiane Rhythmus, d. h. mit großer Amplitude und geringer Varianz im Scheitelpunkt, für Leukozyten des Menschen gefunden [5, 162]. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit für humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen

erhobenen Daten überein. Sowohl die Phasenlage mit einer Akrophase am Beginn der Lichtphase um 6<sup>00</sup> Uhr als auch der robuste zirkadiane Rhythmus konnten für CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestätigt werden. Der Scheitelpunkt von  $Rev-erb\alpha$  wird etwa um  $2^{00}$  Uhr erreicht und somit etwa drei Stunden vor Per3. Verglichen mit Rorα, welches die maximale Expression um 7<sup>00</sup> Uhr erreicht, ergibt sich demzufolge eine Phasenverschiebung von etwa fünf Stunden. Die um drei Stunden früher erreichte Akrophase von Rev-erb $\alpha$  im Verhältnis zu *Per3* ist für periphere Gewebe der Maus beschrieben worden [180]. Für die Phasenlage von Rev-erbα, im Verhältnis zu Rorα findet man in der Literatur Phasenverschiebungen von etwa 12 Stunden bei der Maus [31], allerdings mit großer Variabilität zwischen verschiedenen Geweben [70]. Rev-erb $\alpha$  und Ror $\alpha$  konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle in der Promotorregion von Bmall und aktivieren bzw. unterdrücken die Transkriptionsaktivität. Auf diese Weise können sie die Periodenlänge und Phase der molekularen Uhr mitbestimmen [133]. Einerseits scheint die zirkadiane Rhythmik von  $Rev-erb\alpha$  und  $Ror\alpha$  für eine funktionsfähige Uhr nicht unbedingt notwendig zu sein [133], andererseits konnte man Verbindungen zwischen Variationen der zirkadianen Rhythmik von Rev-erb $\alpha$  und  $Ror\alpha$  und Krankheiten wie immunologische und metabolische Störungen finden [52, 85, 155].

Die Ausprägung der Phasenlage von Per2 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist Übereinstimmung mit der Phasenlage, wie sie für Leukozyten des Menschen beschrieben worden ist [5]. Die zu Rev-erbα um 12 Stunden verschobene Phasenlage von E4bp4 geht konform mit der Annahme des Uhrenmodells, dass Rev-erbα die Expression von E4bp4 unterdrückt. In neuerer Zeit ergaben sich Hinweise, dass E4bp4 an einer Reihe von immunologischen Vorgängen regulatorisch beteiligt ist. Über die Verschiebung der Zytokinbalance zu Gunsten von IL-10 und IL-13 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirkt es einer überschießenden Immunfunktion entgegen [116]. Außerdem konnte ein Einfluss durch E4bp4 auf die Entwicklung von natürlichen Killerzellen, CD4<sup>+</sup> T-Zell-Immunantwort und den Klassenwechsel zu IgE bei B-Zellen gefunden werden [106]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass E4bp4 und Dbp auch in der Lage sind, in gegensätzlicher Weise die Periodenlänge der molekularen Uhr zu beeinflussen [179]. Für die Gene Bmall, Clock, Cry1, und Cry2 wurde kein bzw. kein signifikanter zirkadianer Rhythmus in der Expression gefunden (siehe Abbildung 7). Dem Modell der molekularen Uhr zufolge wird die Transkriptionsaktivität von CLOCK/BMAL1 auf Ebene der Proteine durch Interaktion mit PER/CRY geregelt, sodass für eine funktionierende zirkadiane Uhr eine rhythmische Aktivierung von Clock und Bmal1 nicht notwendig erscheint. Die Studienlage ist hier

uneinheitlich und differiert je nach Spezies und Gewebe. Generell scheinen die molekularen Uhren in peripheren Geweben einer großen Variation zu unterliegen. [87, 103, 158, 180, 183]. So konnte ein zirkadianer Rhythmus für *Bmal1* im Lymphknoten und in der Milz der Maus gefunden werden [180]. In hämatopoetischen Stammzellen des Menschen war hingegen kein zirkadianer Rhythmus in der Expression von *Bmal1* nachweisbar [166]. Ein ähnliches Bild ergibt sich für *Clock*. Während in Makrophagen der Maus ein zirkadianer Rhythmus für die Expression von *Clock* gefunden wurde [88], konnte dies für die Expression von *Clock* in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes und in hämatopoetischen Stammzellen des Menschen nicht bestätigt werden [161, 166]. Andere Arbeiten zeigen eine nur sehr geringe Amplitude in der Expression von *Clock* und *Bmal1* im Vollblut des Menschen [162], sodass ein zirkadianer Rhythmus der genannten Gene möglicherweise erst bei einer sehr großen Anzahl an Probanden als signifikant erscheint.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Daten zur Expression von Uhrengenen eine zirkadiane Regulation wichtiger Komponenten der molekularen Uhr in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sodass von einer funktionsfähigen zirkadianen Steuerung ausgegangen werden kann.

Ob diese molekulare Uhr fähig ist, sich autonom zu regulieren, oder permanenter humoraler oder neuronaler Steuerung bedarf, ist hiermit noch unbeantwortet. Auch ein scheinbarer Effekt auf die Expression der Uhrengene durch Verschiebungen innerhalb der Subgruppenverhältnisse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist nicht ausgeschlossen. Zirkadiane Schwankungen in der Zellzahl der Untergruppen der Leukozyten sind bekannt [17, 22, 55]. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in die T1-Helferzelle, die T2-Helferzelle und in die regulatorischen T-Zellen mit weiteren Untergruppen aufteilen, so dass relative Schwankungen der verschiedenen Untergruppen einen Einfluss auf das Ergebnis der Expressionsanalyse haben könnten.

In Leber, Niere, Herz und Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die rhythmische Cortisolsekretion den zirkadialen Rhythmus peripherer Gewebe beeinflusst [12, 13, 121]. Auch Nahrung und Körpertemperatur kommen als Faktoren in Frage [26, 50]. Es wurden andererseits aber auch in Peritonealmakrophagen und in mononukleären Zellen der Ratte autonome zirkadiane Rhythmen gefunden [88].

#### 5.3.1 Bestimmung der Uhrengene unter in vitro-Bedingungen

Um der Frage der Autonomie der zirkadianen Uhr weiter nachzugehen und humorale Faktoren und Verschiebungen der Zellsubgruppen auszuschließen, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter in vitro-Bedingungen gehalten und die Genexpression der Uhrengene bestimmt. Unter diesen Bedingungen konnte für Per3 und Rev-erb $\alpha$  eine signifikante zirkadiane Expression nachgewiesen werden. Diese beiden Gene zeigten auch unter ex vivo-Bedingungen die ausgeprägteste zirkadiane Rhythmik. Für *Bmal1* ergab sich im Gegensatz zu der ex vivo-Bedingung nun ein Trend zu einer zirkadianen Rhythmik, was möglicherweise durch humorale Faktoren oder Subgruppenverschiebungen der Zellen im ex vivo-Experiment verdeckt wurde (siehe Abbildung 9 und 10). Ähnliches wäre auch für die spenderabhängige Rhythmik von Cry2 und Dbp denkbar. Die Phase der Expressionskurve von Per3 und Rev-erbα stellt sich phasenverschoben im Vergleich zu den unter ex vivo-Bedingungen erhaltenen Kurven dar. Es ist gut möglich, dass diese Verschiebung als Folge der Isolation auftritt. Es ist anzunehmen, dass die Isolation wie ein Serumschock auf die Zellen wirkt. Für diesen konnte gezeigt werden, dass er Perl und Per2 induzieren kann und so auf Fibroblasten von Ratten wie Licht auf den SCN wirkt [11]. Rattenfibroblasten, welche mehr als 25 Jahre in Kultur gehalten worden sind, zeigen nach Serumschock eine Synchronisation der zirkadianen Gene vergleichbar der des SCN [11]. Auch für einen Mediumwechsel konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass er zur Synchronisation der zirkadianen Uhr ausreicht [110]. Für einen Serumschock wurde gezeigt, dass nach einer kurzen Induktion die Konzentration von Per2 mRNA abnimmt, um nach etwa 21 Stunden die Akrophase zu erreichen [11]. Dies ist in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gefundenen Daten von Per3. An Fibroblasten der Ratte wurde nachgewiesen, dass nach Erreichen der ersten Akrophase nach Serumschock die Gene Reverb  $\alpha$ , Per2 und Dbp eine zirkadiane Rhythmik aufweisen [11]. Wäre die Beobachtung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen fortgesetzt worden, hätten möglicherweise weitere Gene eine zirkadiane Rhythmik gezeigt, insbesondere da der Zeitpunkt der ersten erreichten Akrophase bei Per2, Per3 und Dbp in dieser Arbeit genau mit den Daten der Expressionsmuster der Uhrengene in den Fibroblasten der Ratte übereinstimmt [11]. Die gefundene signifikante zirkadiane Rhythmik von Per3 und Rev-erbα belegt eine zumindest in wichtigen Teilen autonome Uhr in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Bei SCN-läsionierten Mäusen behalten Zellen peripherer Gewebe ihre zirkadiane Rhythmik, desynchronisieren jedoch in der Phase zueinander [158, 183]. So kann angenommen werden, dass ähnliche Verhältnisse auch für humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen gelten: Es existiert somit in wesentlichen Teilen eine autonome zirkadiane Uhr, welche lediglich der Synchronisation humoraler oder neuronaler Faktoren bedarf.

# 5.4 Rhythmen in der Immunzellfunktion

Zur Bestimmung der Rhythmik in der Zytokinproduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden über 24 Stunden die jeweils frisch isolierten Zellen im serumfreien Medium inkubiert und stimuliert, um Einflüsse durch Serumfaktoren und Hormone auszuschließen. Durch die anschließende intrazelluläre Färbung war es möglich, auf sensitive Weise eine sehr frühe Immunantwort jeder einzelnen Zelle zu bestimmen. Die Co-Färbung mit CD40L diente dem Ausschluss intrinsisch aktivierter Zellen. Ein signifikanter zirkadianer Rhythmus konnte für IFN-γ und IL-2, sowohl für die relative Anzahl der jeweils positiven Zellen als auch für die Stärke der Zytokinproduktion der einzelnen Zelle, gefunden werden. Für IL-4 konnte nur für die relative Anzahl der IL-4-positiven Zellen eine signifikante zirkadiane Rhythmik festgestellt werden. Für die Aktivierbarkeit der Zellen (CD40L positiv) ergaben sich wiederum sowohl für die relative Anzahl als auch für die Stärke der Aktivierbarkeit signifikante zirkadiane Rhythmen. Mit einem Maximalwert um 1800 Uhr und einem Minimalwert etwa 12 Stunden später um 6<sup>00</sup> Uhr waren die Phasenlagen aller gemessenen Kurven ähnlich (siehe Abbildung 11 und 12). Im Vergleich zu bereits publizierten Daten [17, 18] erscheinen die Maximal- und Minimalwerte jeweils drei bis sechs Stunden früher. Diese unterschiedliche Phasenlage könnte damit erklärt werden, dass in den erwähnten Studien die Zytokinkonzentration in den Überständen bestimmt worden ist, in welchen die Zytokine vermutlich später ihr Maximum erreichen. Des Weiteren sind jeweils unterschiedliche Stimulanzien, Stimulationszeitpunkte und verschiedene Zellgemische verwendet worden. Interessanterweise erreichen die klinischen Beschwerden von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis ihr Maximum mit einer Verzögerung von etwa 12 Stunden gegenüber den intrazellulär gemessenen Werten [15, 47]. Wahrscheinlich bedarf es dieser Latenz von der Bildung der Zytokine bis zur klinischen Ausprägung der Symptome. Für IL-17 konnte in Übereinstimmung mit publizierten Daten [18] kein zirkadianer Rhythmus nachgewiesen werden. Bei Analyse der Daten der einzelnen Spender ergab sich jedoch für die relative Anzahl der IL-17-positiven

Zellen bei drei der sieben Probanden ein signifikanter zirkadianer Rhythmus, sodass möglicherweise bei einer größeren Anzahl an Probanden die Daten für IL-17 insgesamt einen signifikanten zirkadianen Rhythmus gezeigt hätten.

Ähnlich wie bei der zirkadianen Regulation der Uhrengene in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen stellt sich bei der beschriebenen zirkadian abhängigen Immunfunktion die Frage nach der Autonomie der Steuerung: Ob es eine Verbindung zwischen der zirkadianen Uhrengenexpression und der zirkadian regulierten Immunfunktion gibt oder ob für die zirkadiane Immunfunktion extrazelluläre Faktoren verantwortlich sind. Die beschriebenen zirkadian regulierten Hormone Cortisol, Prolaktin und Melatonin könnten durch eine Vorprägung vor der Isolation der Zellen an der zirkadianen Rhythmik beteiligt sein. Ein Einfluss von Cortisol, Melatonin wie auch der Körpertemperatur auf das Immunsystem ist bekannt [8, 86]. Andererseits konnten Versuche an adrenalektomierten Mäusen zeigen, dass der Cortisolrhythmus nicht notwendig für die zirkadiane Rhythmik der Immunfunktion in Makrophagen der Maus ist [88]. Für humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Cortisol die IL-2- und IL-10- Sekretion der Zellen reduziert, die Sekretion von IFN-y jedoch nicht beeinflusst. Prolaktin zeigte einen verstärkenden Effekt auf die IL-10-Sekretion und einen dämpfenden Effekt bei der IL-2-Antwort, die Konzentration von IFN-γ blieb ebenfalls unverändert. Für Melatonin konnte kein Einfluss auf die Zytokinsekretion gemessen werden [18].

Die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen lassen sich, je nach ihrer dominierenden Zytokinproduktion, in TH1-, TH2- und TH17-Zellen unterteilen. Die zirkadian abhängig gemessenen Zytokine IL-2 und IFN-y sind Bestandteil der TH1-Immunantwort [118]. Für die IFN-γ-, IL-2- und TNFα- abhängige Immunantwort in T-Helferzellen konnte eine zirkadiane Beeinflussung durch natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) nachgewiesen werden [18, 43]. Die nTreg-Zellen zeigen selbst eine zirkadiane Schwankung in ihrer Aktivität mit einem Anstieg am Nachmittag bis zu einem Maximum zu Beginn der Nacht [18]. Diese Phasenlage stimmt etwa überein mit der in dieser Arbeit gemessenen Zunahme der Zytokinsekretion. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die nTreg-Zellen die TH1-Zytokine der T-Helferzellen sowie deren Proliferation vermindern. Sie sind dann am aktivsten, wenn die Reaktionsbereitschaft der T-Helferzellen ebenfalls am größten ist [17, 18]. Es ist demzufolge anzunehmen, dass in einer nTreg-freien CD4<sup>+</sup>T-Zellpopulation eine zirkadiane Rhythmik in der Immunantwort noch ausgeprägter zu finden wäre und den nTreg-Zellen nicht die Funktion der Generierung des zirkadianen Rhythmus zukommt.

Eine weitere Möglichkeit der Ursache der zirkadianen Immunantwort könnte in sich ändernden Verhältnissen der TH1- und TH2 CD4<sup>+</sup>-Zellen liegen. In den Daten zeigt sich tatsächlich eine zirkadiane Schwankung in der Anzahl der IL-4-produzierenden Zellen. IL-4 kann als ein Zytokin der TH2-abhängigen Immunantwort gesehen werden. Allerdings schwingt die zirkadiane IL-4-Sekretion in gleicher Phase zu den anderen gemessenen Zytokinen, sodass aus diesen Daten nicht von einer zirkadianen Verschiebung im Verhältnis der TH1- zu TH2-Zellen ausgegangen werden kann. In der Literatur finden sich Hinweise, die eine Steuerung von Immunfunktionen abhängig von peripheren Uhren wahrscheinlich erscheinen lassen. In natürlichen Killerzellen der Ratte wird die Expression von Granzym B und Perforin durch die Inhibition der Uhrengene Per2 und Bmall beeinflusst [7]. Der gefundene Maximalwert von IL-4 liegt drei bis vier Stunden hinter der gemessenen Akrophase des Uhrengens E4bp4. E4bp4 ist als Regulator von IL-4 beschrieben worden (48). Die hier durchgeführten Messungen der mRNA-Konzentration von IFN-γ und CD40L unter in vitro-Bedingungen über 24 Stunden zeigten spenderabhängig einen Trend zur zirkadianen Konzentrationsänderung der mRNA, wobei eine Vielzahl an Möglichkeiten der zirkadian durch Uhrengene posttranskriptionalen Modifikation denkbar ist (siehe Abbildung 14). Ein in der Zwischenzeit durchgeführtes Experiment an isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter in vitro-Bedingungen zeigt ebenfalls eine zirkadiane Rhythmik der CD40L-Expression und der IFN-γ Sekretion, was die These einer intrinsischen Uhrengenregulation weiter stützt [20]. Eine umgekehrte Abhängigkeit vom Zytokin zur Uhrengenexpression interessanterweise auch gefunden worden. Es konnte nachgewiesen werden, dass IFN-y in der Lage ist, auf den SCN zu wirken, indem es die zentrale Uhrengenexpression beeinflusst [88, 95]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der SCN IFN-γ-Rezeptoren exprimiert [7].

# 5.5 Möglicher Signalweg von der Uhrengensteuerung zur Zytokinsekretion

Der Frage nachgehend, auf welcher Ebene der Regulation eine angenommene Uhrengensteuerung der Zytokine die zirkadiane Rhythmik der Immunfunktion steuert, wurde über 24 Stunden die mRNA-Konzentration von IL-2, IFN-γ, CD40L und IkBα in je frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Es zeigte sich nur für die mRNA-Konzentration von IL-2 eine signifikante zirkadiane Rhythmik, deren Maximum um 12<sup>00</sup> Uhr und damit am Beginn der ansteigenden Kurve der gemessenen IL-2-Sekretion liegt (siehe Abbildung

13). Eine Ursache der fehlenden zirkadianen Rhythmik der mRNA der übrigen Zytokine könnte sein, dass die Messung an unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorgenommen wurde, während für die intrazelluläre Zytokinbestimmung stimulierte Zellen verwendet worden sind. Möglicherweise zeigt nur die Zytokinproduktion nach Stimulation einen zirkadianen Rhythmus und nicht auch schon die basale Produktion der Zytokine. Andererseits ist es, wie bereits erwähnt, wahrscheinlich, dass die Regulation der Zytokinsekretion auf verschiedenen Ebenen stattfindet. Bei globaler Untersuchung von mRNA und Proteinen in Fibroblasten der Maus waren 40 % der Proteinmenge durch Regulation der mRNA erklärbar, aber als wichtigstes Element der Steuerung der Proteinkonzentrationen zeigte sich die Regulation der Translation [149]. Durch verschiedene Halbwertszeiten der Produkte auf Ebene der mRNA oder der Proteine ist eine unterschiedliche Steuerbarkeit von Proteinkonzentrationen möglich [149]. Für Makrophagen der Maus konnte gezeigt werden, dass die TNFα-Immunantwort nach LPS-Stimulation einer zirkadianen Rhythmik folgt. Durch Mikroarray Expressionsanalyse konnte man auf allen Ebenen des Signalweges zirkadiane Schwankungen der mRNA-Konzentration finden: bei der Transkription, der Homodimerisation, der Rezeptorbindung, der Signalproteine und dem Proteinprozessing. Insgesamt fand man 1400 Gene in Makrophagen unter zirkadianer Kontrolle [88]. Unterschiede in der TNFα-Regulation waren dabei zum Teil abhängig von der Zellinie und deren Entwicklungsstadium [86]. Ferner konnten regulatorische Verbindungen zwischen  $IkB\alpha$ , NF-κB,  $Ror\alpha$  und einem Regulator der Aktivität von NF-κB - SGMS2 (Sphingomyelin Synthase) - gefunden werden [20, 52, 88, 93].

#### 5.6 Dem Verhalten angepasste Rhythmik im Immunsystem

Während die Uhrengene im SCN von der Lichtphase bestimmt werden, richten sich die Phasen der Uhrengene peripherer Gewebe und der physiologischen Körperfunktionen wie Körpertemperatur, Immunfunktion, Zellzahlschwankungen und der meisten zirkadianen Hormone sinnvollerweise nach der Aktivitätsphase - sie sind also bei nachtaktiven Tieren um etwa 12 Stunden verschoben [34, 51, 117, 125, 140]. Bezogen auf das Immunsystem beim Menschen findet man in der Zellzahl der Leukozyten bei den verschiedenen Untergruppen Höchstwerte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Eine maximale Anzahl von Zellen am Tag kann man bei neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen finden, maximale Werte in der Nacht findet man hingegen bei Monozyten, B-Lymphozyten, T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen [22]. Für die Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen findet

man ebenso eine Zunahme über den Tag [7-9, 19, 78]. Während des Tages, wenn die Wahrscheinlichkeit für das Immunsystem am größten ist, mit eindringenden Antigenen in Kontakt zu kommen, zeigt sich in Teilen des angeborenen Immunsystems eine besonders hohe Aktivität. Im erworbenen Immunsystem ist die größte Aktivität am Abend und während der Nacht zu finden. Andererseits ist aus der Klinik von Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis bekannt, dass die stärksten Gelenkbeschwerden am frühen Morgen beobachtet werden, zu einer Zeit, in der das erworbene Immunsystem eigentlich seine Aktivität schon wieder reduziert hat. Eine Erklärung könnte sein, dass die klinischen Beschwerden mit Verzögerung zu der maximalen Aktivität des Immunsystems auftreten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass bei diesen Krankheiten eine Verschiebung in wichtigen Immunrhythmen stattgefunden hat. Tatsächlich konnte man bei Patienten mit rheumatoider Arthritis Verschiebungen in zirkadianen Rhythmen beobachten [15, 47, 48, 74]. Auf molekularer Ebene wurde eine verringerte Expression von E-Box- abhängigen zirkadian kontrollierten Genen durch TNFα gefunden [39]. Es wird vermutet, dass hohe Spiegel von Prolaktin und GH und niedrige Spiegel von Cortisol am Beginn der Nacht, wie es bei normalem Schlaf physiologisch ist, die TH1-Zytokinantwort fördern [9, 54]. Gleichzeitig ist aber auch bekannt, dass Schlaf die Aktivität natürlicher Treg-Zellen fördert und so einer überschießenden TH1-Immunlage entgegen wirkt [17]. Bei Asthma bronchiale, welches oft mit erhöhten IgE-Spiegeln einhergeht und mit einer vermehrten TH2-Zytokinantwort in Verbindung gebracht wird, finden sich die stärksten Beschwerden in der Nacht oder in den frühen Morgenstunden. Inwieweit die TH1- und die TH2-Immunantwort phasenverschoben oder synchron ihre Maxima aufweisen, lässt sich hieraus nicht sicher ableiten.

Mit großer Wahrscheinlichkeit wird man auch bei den verschiedenen Funktionen des erworbenen Immunsystems maximale Aktivitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten finden können.

Der evolutionäre Vorteil rhythmischer Aktivitäten im Immunsystem könnte darin bestehen, Zeiten starker Antigenkonfrontation antizipieren zu können unter Umgehung einer permanenten Hyperaktivität. Dadurch würde zugleich Energie gespart und die Gefahr autoaggressiver Gewebeschäden reduziert werden. Die zumindest teilweise Verlagerung der zirkadianen Steuerung von zentral zu autonomen peripheren Uhren mag darin begründet liegen, eine individuelle Phasenlage zu den aktuell im lokalen Gewebe vorherrschenden Bedingungen zu ermöglichen. Dieser regulatorische Vorteil könnte beim

Auftreten dauerhafter unphysiologischer Verhältnisse in Geweben gleichzeitig aber auch die Gefahr der Desynchronisation peripherer Uhren mit sich bringen.

# 5.7 Ausblick und Schlussbetrachtung

Geht der zirkadiane Rhythmus partiell verloren oder ist er noch nicht ausgereift, treten an dessen Stelle oftmals Rhythmen kürzerer Dauer, sog. ultradiane Rhythmen, [46], so wie es für Neugeborene und für alte Menschen typisch ist, bei denen sich kurze Aktivitäts- und Ruhephasen abwechseln [175]. Die Phase des Lebensanfanges und -endes ist somit von einem Aufnehmen bzw. Verlassen des zirkadianen Rhythmus gekennzeichnet. Ob dies auch bei der Immundefizienz in dieser Zeit eine Rolle spielt, wäre untersuchenswert.

In Zukunft wird weitere Forschung auf molekularer Ebene notwendig sein, um die zirkadiane Uhr in Ausprägung und Phasenlage in sämtlichen Zellen und Zelluntergruppen des Immunsystems sowie deren Verhältnis zueinander und zur zentralen Regulation des SCN zu charakterisieren. Eine andere Aufgabe wird die weitere Untersuchung der Signalwege und Steuerelemente von der Uhrengensteuerung bis zur Immunantwort darstellen; hierbei könnten Mikroarray-Analysen und Knockdown-Versuche mittels siRNA hilfreich sein. Des Weiteren wird die Analyse der Variationen in der Steuerung und Phasenlage der zirkadianen Uhren bei Erkrankungen des Immunsystems von Bedeutung sein, sowohl für das grundlegende Verständnis der molekularen Zusammenhänge als auch für die Anwendbarkeit in der Klinik.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse zur zirkadianen Rhythmik könnte es im Klinikalltag an Bedeutung gewinnen, die Zeitpunkte der Medikamentengabe im Sinne einer stärkeren Wirkung auf das Immunsystem oder eines geringeren Nebenwirkungsprofils z. B. bei Impfungen, Immunsuppression und Management autoimmunologisch getriggerter Beschwerden auf den jeweiligen Rhythmus der zugrunde liegenden Pathologie abzustimmen. Aber auch für Medikamente, welche die Metabolik und das kardiovaskuläre System beeinflussen, sollten physiologische Rhythmen stärker in die Therapie einbezogen werden. Für Chemotherapeutika konnte gezeigt werden, dass die Effektivität bei reduzierter Toxizität mit der Tageszeit varriiert [100] und dass die Zellteilungsaktivität auch unter zirkadianer Kontrolle steht [62, 92, 109]. Das Ausnutzen und Beeinflussen von zirkadianen Rhythmen bei Krankheiten wird aller Voraussicht nach an Bedeutung gewinnen. Möglicherweise wird auch Aspekten des Lebensstils, wie ein

regelmäßiger Schlaf-Wach-Rhythmus, feste Essenszeiten, der Wechsel von Aktivität und Ruhe sowie der bewusste Umgang mit Licht ein anderer Stellenwert eingeräumt.

Die Rhythmusforschung kann so zu einer neuen Form von Dynamik im medizinischen Blick verhelfen, Krankheiten nicht statisch zu betrachten. Vielleicht wird Rhythmusverlust im Immunsystem mit verlorener Immunkompetenz korrelierbar werden und die Ursache einer Vielzahl von Krankheiten in Störungen von Rhythmen des Immunsystems zu finden sein.

Diese Arbeit gibt erstmals Einblicke in die zirkadiane Rhythmik des erworbenen Immunsystems auf Ebene der Uhrengene in CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Menschen und der Immunantwort durch intrazelluläre Zytokinbestimmung. Sie wird hoffentlich auch dazu verhelfen, Immunzellen wegen ihrer guten Erreichbarkeit als Modell zur Erforschung humaner peripherer Uhren zu etablieren und so zum generellen Verständnis zirkadianer Uhrenmechanismen beim Menschen beitragen.

# 6. Zusammenfassung

Wiederkehrende Umweltfaktoren zu antizipieren, ist von entscheidendem Vorteil für alle Lebewesen. Die größte Bedeutung hat der Wechsel von Tag und Nacht. Zur Vorausnahme der Verhältnisse dient eine molekulare Uhr, welche durch autoregulatorische Aktivitäten von Genen einen zirkadianen Rhythmus generiert. Durch zunehmende Erkenntnisse über zirkadiane Uhren werden Verbindungen zwischen Störungen der zirkadianen Rhythmik und einer Vielzahl von Krankheiten deutlich. Während für das angeborene Immunsystem zirkadiane Rhythmen auf Ebene der Uhrengene beschrieben wurden, liegen für das erworbene Immunsystem bisher keine vergleichbaren Daten vor.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung von zirkadianen Rhythmen in Zellen des erworbenen Immunsystems auf genetischer- und funktioneller Ebene. Dazu wurden zunächst aus dem peripheren Blut von sieben männlichen Probanden über 24 Stunden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten isoliert und die mRNA von Genen der zirkadianen Uhr quantifiziert. In den Zellen konnten im Vergleich zu den housekeeping-Genen ausgeprägte zirkadiane Rhythmen der Uhrengene Per2, Per3, Rev-erbα, Rorα und E4bp4 gemessen werden. Um die Autonomie dieser zirkadianen Uhr zu untersuchen, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter in vitro-Bedingungen gehalten und die Quantifizierung wiederholt, dabei wurden ebenfalls signifikante zirkadiane Rhythmen der Gene *Per3* und *Rev-erbα* gefunden. Zur Erforschung der T-Zell-Funktionen wurden die über 24 Stunden isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert und intrazellulär die Zytokinkonzentration bestimmt. Ähnlich wie bei der Uhrengen-Expression konnte auch für die Zytokine IFN-γ, IL-2, IL-4 und dem Aktivierungsmarker CD40L ein deutlicher zirkadianer Rhythmus der Zytokinaktivität mit einem Maximum um  $18^{00}\,\mathrm{Uhr}$  und einem Minimum um 6<sup>00</sup> Uhr gemessen werden. Zur weiteren Erforschung des Funktionszusammenhangs zwischen den Uhrengenen und T-Zell-Funktionen wurde die mRNA der genannten Zytokine quantifiziert. Hierbei konnte für IL-2, nicht jedoch für IFN-7 und CD40L eine Steuerung der Zytokinproduktion auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit konnte so erstmalig zeigen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Menschen eine zirkadiane Uhr besitzen und diese autonom oszilliert. Des Weiteren war es möglich nachzuweisen, dass die funktionelle Immunantwort der CD4<sup>+</sup> T-Zellen einer zirkadianen Rhythmik folgt. Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die zirkadiane Rhythmik des Immunsystems können nun helfen, systemische Immunerkrankungen, wie z. B. Asthma oder rheumatoide Arthritis, in ihrer Dynamik zu verstehen und die Erarbeitung einer besseren, den Rhythmus integrierenden Therapie zu ermöglichen.

# 7. Literaturverzeichnis

- 1. Abo, T., T. Kawate, K. Itoh, and K. Kumagai, *Studies on the bioperiodicity of the immune response*. *I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood*. J Immunol, 1981. 126(4): p. 1360-3.
- 2. Albrecht, U., Z.S. Sun, G. Eichele, and C.C. Lee, *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light.* Cell, 1997. 91(7): p. 1055-64.
- 3. Albrecht, U., B. Zheng, D. Larkin, Z.S. Sun, and C.C. Lee, *MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock.* J Biol Rhythms, 2001. 16(2): p. 100-4.
- 4. Andrews, T.C., T. Fenton, N. Toyosaki, S.P. Glasser, P.M. Young, G. MacCallum, R.S. Gibson, T.L. Shook, and P.H. Stone, *Subsets of ambulatory myocardial ischemia based on heart rate activity. Circadian distribution and response to anti-ischemic medication. The Angina and Silent Ischemia Study Group (ASIS).* Circulation, 1993. 88(1): p. 92-100.
- 5. Archer, S.N., A.U. Viola, V. Kyriakopoulou, M. von Schantz, and D.J. Dijk, *Interindividual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1*, *PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes*. Sleep, 2008. 31(5): p. 608-17.
- 6. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells.* J Immunol, 2005. 174(12): p. 7618-24.
- 7. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function*. Brain Behav Immun, 2006. 20(5): p. 469-76.
- 8. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *The circadian gene mPer2 regulates the daily rhythm of IFN-gamma*. J Interferon Cytokine Res, 2006. 26(9): p. 645-9.
- 9. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Are circadian rhythms the code of hypothalamic-immune communication? Insights from natural killer cells.* Neurochem Res, 2008. 33(4): p. 708-18.
- 10. Aschoff, J. and R. Wever, *Human circadian rhythms: a multioscillatory system*. Fed Proc, 1976. 35(12): p. 236-32.
- 11. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells.* Cell, 1998. 93(6): p. 929-37.
- 12. Balsalobre, A., S.A. Brown, L. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H.M. Reichardt, G. Schutz, and U. Schibler, *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. 289(5488): p. 2344-7.
- 13. Balsalobre, A., L. Marcacci, and U. Schibler, *Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts*. Curr Biol, 2000. 10(20): p. 1291-4.
- 14. Bartness, T.J., C.K. Song, and G.E. Demas, *SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms*. J Biol Rhythms, 2001. 16(3): p. 196-204.
- 15. Bellamy, N., R.B. Sothern, J. Campbell, and W.W. Buchanan, *Circadian rhythm in pain, stiffness, and manual dexterity in rheumatoid arthritis: relation between discomfort and disability.* Ann Rheum Dis, 1991. 50(4): p. 243-8.
- 16. Boivin, D.B., F.O. James, A. Wu, P.F. Cho-Park, H. Xiong, and Z.S. Sun, *Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells*. Blood, 2003. 102(12): p. 4143-5.

17. Bollinger, T., A. Bollinger, L. Skrum, S. Dimitrov, T. Lange, and W. Solbach, *Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells*. Clin Exp Immunol, 2009. 155(2): p. 231-8.

- 18. Bollinger, T., A. Bollinger, J. Naujoks, T. Lange, and W. Solbach, *The influence of regulatory T cells and diurnal hormone rhythms on T helper cell activity.* Immunology, 2010. 131(4): p. 488-500.
- 19. Bollinger, T., A. Bollinger, H. Oster, and W. Solbach, *Sleep, immunity, and circadian clocks: a mechanistic model.* Gerontology, 2010. 56(6): p. 574-80.
- 20. Bollinger, T., A. Leutz, A. Leliavski, L. Skrum, J. Kovac, L. Bonacina, C. Benedict, T. Lange, J. Westermann, H. Oster, and W. Solbach, *Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells*. PLoS One, 2011. 6(12): p. e29801.
- 21. Born, J., W. Kern, K. Bieber, G. Fehm-Wolfsdorf, M. Schiebe, and H.L. Fehm, *Night-time plasma cortisol secretion is associated with specific sleep stages*. Biol Psychiatry, 1986. 21(14): p. 1415-24.
- 22. Born, J., T. Lange, K. Hansen, M. Molle, and H.L. Fehm, *Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells.* J Immunol, 1997. 158(9): p. 4454-64.
- 23. Born, J. and H.L. Fehm, *Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: a coordinating role for the limbic hippocampal system.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1998. 106(3): p. 153-63.
- 24. Born, J., K. Hansen, L. Marshall, M. Molle, and H.L. Fehm, *Timing the end of nocturnal sleep*. Nature, 1999. 397(6714): p. 29-30.
- 25. Bozek, K., A. Relogio, S.M. Kielbasa, M. Heine, C. Dame, A. Kramer, and H. Herzel, *Regulation of clock-controlled genes in mammals*. PLoS One, 2009. 4(3): p. e4882.
- 26. Brown, S.A., G. Zumbrunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner, and U. Schibler, *Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks*. Curr Biol, 2002. 12(18): p. 1574-83.
- 27. Brown, S.A., J. Ripperger, S. Kadener, F. Fleury-Olela, F. Vilbois, M. Rosbash, and U. Schibler, *PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator*. Science, 2005. 308(5722): p. 693-6.
- 28. Bryant, P.A., J. Trinder, and N. Curtis, *Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system?* Nat Rev Immunol, 2004. 4(6): p. 457-67.
- 29. Bubenik, G.A. and S.J. Konturek, *Melatonin and aging: prospects for human treatment.* J Physiol Pharmacol, 2011. 62(1): p. 13-9.
- 30. Bunger, M.K., L.D. Wilsbacher, S.M. Moran, C. Clendenin, L.A. Radcliffe, J.B. Hogenesch, M.C. Simon, J.S. Takahashi, and C.A. Bradfield, *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. Cell, 2000. 103(7): p. 1009-17.
- 31. Burris, T.P., *Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock.* Mol Endocrinol, 2008. 22(7): p. 1509-20.
- 32. Busino, L., F. Bassermann, A. Maiolica, C. Lee, P.M. Nolan, S.I. Godinho, G.F. Draetta, and M. Pagano, *SCFFbxl3 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins*. Science, 2007. 316(5826): p. 900-4.
- 33. Butler, M.P., I.N. Karatsoreos, J. LeSauter, and R. Silver, *Dose-dependent effects of androgens on the circadian timing system and its response to light.* Endocrinology, 2012. 153(5): p. 2344-52.

34. Caldelas, I., V.J. Poirel, B. Sicard, P. Pevet, and E. Challet, *Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal Arvicanthis ansorgei*. Neuroscience, 2003. 116(2): p. 583-91.

- 35. Carr, D.J. and J.E. Blalock, *A molecular basis for intersystem communication between the immune and neuroendocrine systems*. Int Rev Immunol, 1989. 4(3): p. 213-28.
- 36. Carrillo-Vico, A., A. Garcia-Perganeda, L. Naji, J.R. Calvo, M.P. Romero, and J.M. Guerrero, *Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system*. Cell Mol Life Sci, 2003. 60(10): p. 2272-8.
- 37. Carrillo-Vico, A., J.R. Calvo, P. Abreu, P.J. Lardone, S. Garcia-Maurino, R.J. Reiter, and J.M. Guerrero, *Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance.* FASEB J, 2004. 18(3): p. 537-9.
- 38. Castanon-Cervantes, O., M. Wu, J.C. Ehlen, K. Paul, K.L. Gamble, R.L. Johnson, R.C. Besing, M. Menaker, A.T. Gewirtz, and A.J. Davidson, *Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption*. J Immunol, 2010. 185(10): p. 5796-805.
- 39. Cavadini, G., S. Petrzilka, P. Kohler, C. Jud, I. Tobler, T. Birchler, and A. Fontana, *TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(31): p. 12843-8.
- 40. Challet, E., *Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals.* Endocrinology, 2007. 148(12): p. 5648-55.
- 41. Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, and W.J. Rutter, *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. Biochemistry, 1979. 18(24): p. 5294-9.
- 42. Claridge-Chang, A., H. Wijnen, F. Naef, C. Boothroyd, N. Rajewsky, and M.W. Young, *Circadian regulation of gene expression systems in the Drosophila head.* Neuron, 2001. 32(4): p. 657-71.
- 43. Cosmi, L., F. Liotta, R. Angeli, B. Mazzinghi, V. Santarlasci, R. Manetti, L. Lasagni, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, F. Annunziato, and S. Romagnani, *Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines*. Blood, 2004. 103(8): p. 3117-21.
- 44. Crumbley, C., Y. Wang, D.J. Kojetin, and T.P. Burris, *Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERBalpha/RORalpha target gene.* J Biol Chem, 2010. 285(46): p. 35386-92.
- 45. Cuninkova, L. and S.A. Brown, *Peripheral circadian oscillators: interesting mechanisms and powerful tools*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1129: p. 358-70.
- 46. Curtis, A.M., Y. Cheng, S. Kapoor, D. Reilly, T.S. Price, and G.A. Fitzgerald, *Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(9): p. 3450-5.
- 47. Cutolo, M. and A.T. Masi, *Circadian rhythms and arthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2005. 31(1): p. 115-29, ix-x.
- 48. Cutolo, M., *Chronobiology and the treatment of rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. 24(3): p. 312-8.
- 49. Czeisler, C.A. and E.B. Klerman, *Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans*. Recent Prog Horm Res, 1999. 54: p. 97-130; discussion 130-2.
- 50. Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler, *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues*

from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. Genes Dev, 2000. 14(23): p. 2950-61.

64

- 51. Dardente, H., P. Klosen, I. Caldelas, P. Pevet, and M. Masson-Pevet, *Phenotype of Per1- and Per2-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent (Arvicanthis ansorgei): comparison with a nocturnal species, the rat.* Cell Tissue Res, 2002. 310(1): p. 85-92.
- 52. Delerive, P., D. Monte, G. Dubois, F. Trottein, J. Fruchart-Najib, J. Mariani, J.C. Fruchart, and B. Staels, *The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response*. EMBO Rep, 2001. 2(1): p. 42-8.
- 53. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system:* organization and coordination of central and peripheral clocks. Annu Rev Physiol, 2010. 72: p. 517-49.
- 54. Dimitrov, S., T. Lange, H.L. Fehm, and J. Born, *A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human T-cell production of cytokines*. Brain Behav Immun, 2004. 18(4): p. 368-74.
- 55. Dimitrov, S., C. Benedict, D. Heutling, J. Westermann, J. Born, and T. Lange, *Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets*. Blood, 2009. 113(21): p. 5134-43.
- 56. Dodt, C., K. Hansen, D. Uthgenannt, J. Born, and H.L. Fehm, *Cholinergic potentiation of the meal-related rise in ACTH and cortisol concentrations in men.* Exp Clin Endocrinol, 1994. 102(6): p. 460-6.
- 57. Dolan, E., A. Stanton, L. Thijs, K. Hinedi, N. Atkins, S. McClory, E. Den Hond, P. McCormack, J.A. Staessen, and E. O'Brien, *Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: the Dublin outcome study.* Hypertension, 2005. 46(1): p. 156-61.
- 58. Duffy, J.F. and C.A. Czeisler, *Effect of Light on Human Circadian Physiology*. Sleep Med Clin, 2009. 4(2): p. 165-177.
- 59. Dunlap, J.C., Molecular bases for circadian clocks. Cell, 1999. 96(2): p. 271-90.
- 60. Fischer, S., R. Smolnik, M. Herms, J. Born, and H.L. Fehm, *Melatonin acutely improves the neuroendocrine architecture of sleep in blind individuals*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(11): p. 5315-20.
- 61. Follenius, M., G. Brandenberger, and B. Hietter, *Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. 55(4): p. 757-61.
- 62. Fu, L., H. Pelicano, J. Liu, P. Huang, and C. Lee, *The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo*. Cell, 2002. 111(1): p. 41-50.
- 63. Garcia-Ballester, L., *On the origin of the "six non-natural things" in Galen.* Sudhoffs Arch Z Wissenschaftsgesch Beih, 1993(32): p. 105-15.
- 64. Gekakis, N., D. Staknis, H.B. Nguyen, F.C. Davis, L.D. Wilsbacher, D.P. King, J.S. Takahashi, and C.J. Weitz, *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. 280(5369): p. 1564-9.
- 65. Gillette, M.U. and J.W. Mitchell, *Signaling in the suprachiasmatic nucleus:* selectively responsive and integrative. Cell Tissue Res, 2002. 309(1): p. 99-107.
- 66. Glickman, G., J.P. Hanifin, M.D. Rollag, J. Wang, H. Cooper, and G.C. Brainard, *Inferior retinal light exposure is more effective than superior retinal exposure in suppressing melatonin in humans.* J Biol Rhythms, 2003. 18(1): p. 71-9.
- 67. Godinho, S.I., E.S. Maywood, L. Shaw, V. Tucci, A.R. Barnard, L. Busino, M. Pagano, R. Kendall, M.M. Quwailid, M.R. Romero, J. O'Neill, J.E. Chesham, D. Brooker, Z. Lalanne, M.H. Hastings, and P.M. Nolan, *The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period.* Science, 2007. 316(5826): p. 897-900.

68. Gooley, J.J., J. Lu, T.C. Chou, T.E. Scammell, and C.B. Saper, *Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract*. Nat Neurosci, 2001. 4(12): p. 1165.

- 69. Gubler, U. and B.J. Hoffman, *A simple and very efficient method for generating cDNA libraries*. Gene, 1983. 25(2-3): p. 263-9.
- 70. Guillaumond, F., H. Dardente, V. Giguere, and N. Cermakian, *Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors*. J Biol Rhythms, 2005. 20(5): p. 391-403.
- 71. Halberg, F., E.A. Johnson, B.W. Brown, and J.J. Bittner, *Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay*. Proc Soc Exp Biol Med, 1960. 103: p. 142-4.
- 72. Hampton, S.M., L.M. Morgan, N. Lawrence, T. Anastasiadou, F. Norris, S. Deacon, D. Ribeiro, and J. Arendt, *Postprandial hormone and metabolic responses in simulated shift work.* J Endocrinol, 1996. 151(2): p. 259-67.
- 73. Hannibal, J., P. Hindersson, S.M. Knudsen, B. Georg, and J. Fahrenkrug, *The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract.* J Neurosci, 2002. 22(1): p. RC191.
- 74. Harkness, J.A., M.B. Richter, G.S. Panayi, K. Van de Pette, A. Unger, R. Pownall, and M. Geddawi, *Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. 284(6315): p. 551-4.
- 75. Hashiramoto, A., T. Yamane, K. Tsumiyama, K. Yoshida, K. Komai, H. Yamada, F. Yamazaki, M. Doi, H. Okamura, and S. Shiozawa, *Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha*. J Immunol, 2010. 184(3): p. 1560-5.
- 76. Hastings, M., J.S. O'Neill, and E.S. Maywood, *Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms*. J Endocrinol, 2007. 195(2): p. 187-98.
- 77. Hattar, S., H.W. Liao, M. Takao, D.M. Berson, and K.W. Yau, *Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity.* Science, 2002. 295(5557): p. 1065-70.
- 78. Hayashi, M., S. Shimba, and M. Tezuka, *Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages*. Biol Pharm Bull, 2007. 30(4): p. 621-6.
- 79. Hildebrandt, G., *Reactive modifications of the autonomous time structure in the human organism.* J Physiol Pharmacol, 1991. 42(1): p. 5-27.
- 80. Hildebrandt, G., *Reactive modifications of the autonomous time structure of biological functions in man.* Ann Ist Super Sanita, 1993. 29(4): p. 545-57.
- 81. Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand, *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(16): p. 7276-80.
- 82. Hypponen, E. and C. Power, *Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y:* nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. Am J Clin Nutr, 2007. 85(3): p. 860-8.
- 83. Ibata, Y., H. Okamura, M. Tanaka, Y. Tamada, S. Hayashi, N. Iijima, T. Matsuda, K. Munekawa, T. Takamatsu, Y. Hisa, Y. Shigeyoshi, and F. Amaya, *Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus*. Front Neuroendocrinol, 1999. 20(3): p. 241-68.
- 84. Jarcho, S., *Galen's six non-naturals: a bibliographic note and translation*. Bull Hist Med, 1970. 44(4): p. 372-7.
- 85. Jetten, A.M., S. Kurebayashi, and E. Ueda, *The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. 69: p. 205-47.

86. Joyce, D.A., G. Gimblett, and J.H. Steer, *Targets of glucocorticoid action on TNF-alpha release by macrophages*. Inflamm Res, 2001. 50(7): p. 337-40.

- 87. Kashiwada, M., S.L. Cassel, J.D. Colgan, and P.B. Rothman, *NFIL3/E4BP4* controls type 2 T helper cell cytokine expression. EMBO J, 2011. 30(10): p. 2071-82.
- 88. Keller, M., J. Mazuch, U. Abraham, G.D. Eom, E.D. Herzog, H.D. Volk, A. Kramer, and B. Maier, *A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(50): p. 21407-12.
- 89. King, D.P., Y. Zhao, A.M. Sangoram, L.D. Wilsbacher, M. Tanaka, M.P. Antoch, T.D. Steeves, M.H. Vitaterna, J.M. Kornhauser, P.L. Lowrey, F.W. Turek, and J.S. Takahashi, *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. Cell, 1997. 89(4): p. 641-53.
- 90. Klem, G.H., H.O. Luders, H.H. Jasper, and C. Elger, *The ten-twenty electrode system of the International Federation. The International Federation of Clinical Neurophysiology.* Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl, 1999. 52: p. 3-6.
- 91. Knapp, M.S., J.R. Cove-Smith, R. Dugdale, N. Mackenzie, and R. Pownall, *Possible effect of time on renal allograft rejection.* Br Med J, 1979. 1(6156): p. 75-7
- 92. Kowalska, E., J.A. Ripperger, D.C. Hoegger, P. Bruegger, T. Buch, T. Birchler, A. Mueller, U. Albrecht, C. Contaldo, and S.A. Brown, *Feature Article: NONO couples the circadian clock to the cell cycle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012.
- 93. Krappmann, D., E. Wegener, Y. Sunami, M. Esen, A. Thiel, B. Mordmuller, and C. Scheidereit, *The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1*. Mol Cell Biol, 2004. 24(14): p. 6488-500.
- 94. Kume, K., M.J. Zylka, S. Sriram, L.P. Shearman, D.R. Weaver, X. Jin, E.S. Maywood, M.H. Hastings, and S.M. Reppert, *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. Cell, 1999. 98(2): p. 193-205.
- 95. Kwak, Y., G.B. Lundkvist, J. Brask, A. Davidson, M. Menaker, K. Kristensson, and G.D. Block, *Interferon-gamma alters electrical activity and clock gene expression in suprachiasmatic nucleus neurons*. J Biol Rhythms, 2008. 23(2): p. 150-9.
- 96. Lall, G.S., L.A. Atkinson, S.A. Corlett, P.J. Broadbridge, and D.R. Bonsall, *Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review.* J Neural Transm, 2012.
- 97. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(39): p. 15172-7.
- 98. Lasko, T.A., D.F. Kripke, and J.A. Elliot, *Melatonin suppression by illumination of upper and lower visual fields*. J Biol Rhythms, 1999. 14(2): p. 122-5.
- 99. Lemmer, B., *Importance of circadian rhythms for regulation of the cardiovascular system--studies in animal and man.* Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2006. 1: p. 168-70.
- 100. Levi, F., R. Zidani, S. Brienza, L. Dogliotti, B. Perpoint, M. Rotarski, Y. Letourneau, J.F. Llory, P. Chollet, A. Le Rol, and C. Focan, A multicenter evaluation of intensified, ambulatory, chronomodulated chemotherapy with oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin as initial treatment of patients with metastatic colorectal carcinoma. International Organization for Cancer Chronotherapy. Cancer, 1999. 85(12): p. 2532-40.

101. Lim, A.S., A.M. Chang, J.M. Shulman, T. Raj, L.B. Chibnik, S.W. Cain, K. Rothamel, C. Benoist, A.J. Myers, C.A. Czeisler, A.S. Buchman, D.A. Bennett, J.F. Duffy, C.B. Saper, and P.L. De Jager, *A common polymorphism near PER1 and the timing of human behavioral rhythms*. Ann Neurol, 2012. 72(3): p. 324-34.

- 102. Liu, J., G. Malkani, X. Shi, M. Meyer, S. Cunningham-Runddles, X. Ma, and Z.S. Sun, *The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock.* Infect Immun, 2006. 74(8): p. 4750-6.
- 103. Liu, S., Y. Cai, R.B. Sothern, Y. Guan, and P. Chan, *Chronobiological analysis of circadian patterns in transcription of seven key clock genes in six peripheral tissues in mice*. Chronobiol Int, 2007. 24(5): p. 793-820.
- 104. Logan, R.W., A. Arjona, and D.K. Sarkar, *Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function*. Brain Behav Immun, 2011. 25(1): p. 101-9.
- 105. Lowrey, P.L., K. Shimomura, M.P. Antoch, S. Yamazaki, P.D. Zemenides, M.R. Ralph, M. Menaker, and J.S. Takahashi, *Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau.* Science, 2000. 288(5465): p. 483-92.
- 106. Male, V., I. Nisoli, D.M. Gascoyne, and H.J. Brady, *E4BP4: an unexpected player in the immune response*. Trends Immunol, 2012. 33(2): p. 98-102.
- 107. Manfredini, R., M. Gallerani, O. Cecilia, B. Boari, C. Fersini, and F. Portaluppi, *Circadian pattern in occurrence of renal colic in an emergency department:* analysis of patients' notes. BMJ, 2002. 324(7340): p. 767.
- 108. Martin, R.J., L.C. Cicutto, H.R. Smith, R.D. Ballard, and S.J. Szefler, *Airways inflammation in nocturnal asthma*. Am Rev Respir Dis, 1991. 143(2): p. 351-7.
- 109. Matsuo, T., S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda, and H. Okamura, *Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo*. Science, 2003. 302(5643): p. 255-9.
- 110. Maywood, E.S., J. O'Neill, G.K. Wong, A.B. Reddy, and M.H. Hastings, *Circadian timing in health and disease*. Prog Brain Res, 2006. 153: p. 253-69.
- 111. McDonald, M.J. and M. Rosbash, *Microarray analysis and organization of circadian gene expression in Drosophila*. Cell, 2001. 107(5): p. 567-78.
- 112. Menaker, M., *Circadian rhythms. Circadian photoreception.* Science, 2003. 299(5604): p. 213-4.
- 113. Meyer-Bernstein, E.L., A.E. Jetton, S.I. Matsumoto, J.F. Markuns, M.N. Lehman, and E.L. Bittman, *Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters*. Endocrinology, 1999. 140(1): p. 207-18.
- 114. Moore, R.Y. and V.B. Eichler, *Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.* Brain Res, 1972. 42(1): p. 201-6.
- 115. Moore, R.Y., J.C. Speh, and R.K. Leak, *Suprachiasmatic nucleus organization*. Cell Tissue Res, 2002. 309(1): p. 89-98.
- 116. Motomura, Y., H. Kitamura, A. Hijikata, Y. Matsunaga, K. Matsumoto, H. Inoue, K. Atarashi, S. Hori, H. Watarai, J. Zhu, M. Taniguchi, and M. Kubo, *The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2011. 12(5): p. 450-9.
- 117. Mrosovsky, N., K. Edelstein, M.H. Hastings, and E.S. Maywood, *Cycle of period gene expression in a diurnal mammal (Spermophilus tridecemlineatus):*implications for nonphotic phase shifting. J Biol Rhythms, 2001. 16(5): p. 471-8.
- 118. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie*. 2009 (7. Auflage): p. 455.

119. Nelson, R.J. and D.L. Drazen, *Melatonin mediates seasonal changes in immune function*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 917: p. 404-15.

- 120. Nelson, W., Y.L. Tong, J.K. Lee, and F. Halberg, *Methods for cosinor-rhythmometry*. Chronobiologia, 1979. 6(4): p. 305-23.
- 121. Oishi, K., K. Sakamoto, T. Okada, T. Nagase, and N. Ishida, *Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues.* Neurosci Lett, 1998. 256(2): p. 117-9.
- 122. Okamura, H., S. Miyake, Y. Sumi, S. Yamaguchi, A. Yasui, M. Muijtjens, J.H. Hoeijmakers, and G.T. van der Horst, *Photic induction of mPer1 and mPer2 in crydeficient mice lacking a biological clock*. Science, 1999. 286(5449): p. 2531-4.
- 123. Oster, H., S. Damerow, S. Kiessling, V. Jakubcakova, D. Abraham, J. Tian, M.W. Hoffmann, and G. Eichele, *The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock.* Cell Metab, 2006. 4(2): p. 163-73.
- 124. Panda, S., T.K. Sato, A.M. Castrucci, M.D. Rollag, W.J. DeGrip, J.B. Hogenesch, I. Provencio, and S.A. Kay, *Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting.* Science, 2002. 298(5601): p. 2213-6.
- 125. Pando, M.P. and P. Sassone-Corsi, *Signaling to the mammalian circadian clocks:* in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. Sci STKE, 2001. 2001(107): p. re16.
- 126. Papanicolaou, D.A., J.A. Yanovski, G.B. Cutler, Jr., G.P. Chrousos, and L.K. Nieman, *A single midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(4): p. 1163-7.
- 127. Pevet, P. and E. Challet, *Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network.* J Physiol Paris, 2011. 105(4-6): p. 170-82.
- 128. Phillips, A.C., S. Gallagher, D. Carroll, and M. Drayson, *Preliminary evidence that morning vaccination is associated with an enhanced antibody response in men*. Psychophysiology, 2008. 45(4): p. 663-6.
- 129. Poellmann, L. and B. Poellmann, *Tagesrhythmische Unterschiede bei der Antikörperbildung nach Hepatitis-B-Schutzimpfung*. In: Hoffmann, F; Stoessel, U eds. Arbeitsmedizin im Gesundheitsdienst. Stuttgart: Gentner Verlag, 1988: p. 83-87.
- 130. Pollmann, L. and G. Hildebrandt, *Circadian profiles and circaseptan periodicity in the frequency of administration of analytic drugs after oral surgery*. Funct Neurol, 1987. 2(2): p. 231-7.
- 131. Portaluppi, F., L. Montanari, M. Massari, V. Di Chiara, and M. Capanna, *Loss of nocturnal decline of blood pressure in hypertension due to chronic renal failure*. Am J Hypertens, 1991. 4(1 Pt 1): p. 20-6.
- 132. Portaluppi, F. and B. Lemmer, *Chronobiology and chronotherapy of ischemic heart disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. 59(9-10): p. 952-65.
- 133. Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht, and U. Schibler, *The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator*. Cell, 2002. 110(2): p. 251-60.
- 134. Prosser, R.A., H.C. Heller, and J.D. Miller, Serotonergic phase shifts of the mammalian circadian clock: effects of tetrodotoxin and high Mg2+. Brain Res, 1992. 573(2): p. 336-40.
- 135. Prosser, R.A., R.R. Dean, D.M. Edgar, H.C. Heller, and J.D. Miller, *Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists.* J Biol Rhythms, 1993. 8(1): p. 1-16.

136. Provencio, I., G. Jiang, W.J. De Grip, W.P. Hayes, and M.D. Rollag, *Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(1): p. 340-5.

- 137. Provencio, I., I.R. Rodriguez, G. Jiang, W.P. Hayes, E.F. Moreira, and M.D. Rollag, *A novel human opsin in the inner retina*. J Neurosci, 2000. 20(2): p. 600-5.
- 138. Quintero, J.E., S.J. Kuhlman, and D.G. McMahon, *The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light.* J Neurosci, 2003. 23(22): p. 8070-6.
- 139. Rechtschaffen A, K.A., A Manual of Standardized Terminology and Scoring System for Sleep of Human Subjects, in National Institutes of Health. Washington DC: United States Government Printing Office 1968.
- 140. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. Annu Rev Physiol, 2001. 63: p. 647-76.
- 141. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. Nature, 2002. 418(6901): p. 935-41.
- 142. Rosmond, R., M.F. Dallman, and P. Bjorntorp, *Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(6): p. 1853-9.
- 143. Ruby, N.F., T.J. Brennan, X. Xie, V. Cao, P. Franken, H.C. Heller, and B.F. O'Hara, *Role of melanopsin in circadian responses to light.* Science, 2002. 298(5601): p. 2211-3.
- 144. Samuels, N., *Chronotherapy in traditional Chinese medicine*. Am J Chin Med, 2000. 28(3-4): p. 419-23.
- 145. Sato, T.K., S. Panda, L.J. Miraglia, T.M. Reyes, R.D. Rudic, P. McNamara, K.A. Naik, G.A. FitzGerald, S.A. Kay, and J.B. Hogenesch, *A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock*. Neuron, 2004. 43(4): p. 527-37.
- 146. Schibler, U. and P. Sassone-Corsi, *A web of circadian pacemakers*. Cell, 2002. 111(7): p. 919-22.
- 147. Schibler, U., J. Ripperger, and S.A. Brown, *Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food.* J Biol Rhythms, 2003. 18(3): p. 250-60.
- 148. Schibler, U., Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. Prog Brain Res, 2006. 153: p. 271-82.
- 149. Schwanhausser, B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, and M. Selbach, *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. 473(7347): p. 337-42.
- 150. Shibata, S., *Neural regulation of the hepatic circadian rhythm*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. 280(1): p. 901-9.
- 151. Shigeyoshi, Y., K. Taguchi, S. Yamamoto, S. Takekida, L. Yan, H. Tei, T. Moriya, S. Shibata, J.J. Loros, J.C. Dunlap, and H. Okamura, *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript.* Cell, 1997. 91(7): p. 1043-53.
- 152. Shimba, S., T. Ogawa, S. Hitosugi, Y. Ichihashi, Y. Nakadaira, M. Kobayashi, M. Tezuka, Y. Kosuge, K. Ishige, Y. Ito, K. Komiyama, Y. Okamatsu-Ogura, K. Kimura, and M. Saito, *Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation.* PLoS One, 2011. 6(9): p. e25231.
- 153. Siepka, S.M., S.H. Yoo, J. Park, W. Song, V. Kumar, Y. Hu, C. Lee, and J.S. Takahashi, *Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression*. Cell, 2007. 129(5): p. 1011-23.

154. Sierakowski, S. and M. Cutolo, *Morning symptoms in rheumatoid arthritis: a defining characteristic and marker of active disease.* Scand J Rheumatol Suppl, 2011. 125: p. 1-5.

- 155. Solt, L.A., D.J. Kojetin, and T.P. Burris, *The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis*. Future Med Chem, 2011. 3(5): p. 623-38.
- 156. Stehle, J., J. Vanecek, and L. Vollrath, *Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study.* J Neural Transm, 1989. 78(2): p. 173-7.
- 157. Stenvers, D.J., C.F. Jonkers, E. Fliers, P.H. Bisschop, and A. Kalsbeek, *Nutrition and the circadian timing system*. Prog Brain Res, 2012. 199: p. 359-76.
- 158. Sujino, M., K.H. Masumoto, S. Yamaguchi, G.T. van der Horst, H. Okamura, and S.T. Inouye, *Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice*. Curr Biol, 2003. 13(8): p. 664-8.
- 159. Sun, Z., D. Feng, L.J. Everett, A. Bugge, and M.A. Lazar, *Circadian epigenomic remodeling and hepatic lipogenesis: lessons from HDAC3*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. 76: p. 49-55.
- 160. Sutherland, E.R., *Nocturnal asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 116(6): p. 1179-86; quiz 1187.
- 161. Takata, M., N. Burioka, S. Ohdo, H. Takane, H. Terazono, M. Miyata, T. Sako, H. Suyama, Y. Fukuoka, K. Tomita, and E. Shimizu, *Daily expression of mRNAs for the mammalian Clock genes Per2 and clock in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells.* Jpn J Pharmacol, 2002. 90(3): p. 263-9.
- Takimoto, M., A. Hamada, A. Tomoda, S. Ohdo, T. Ohmura, H. Sakato, J. Kawatani, T. Jodoi, H. Nakagawa, H. Terazono, S. Koyanagi, S. Higuchi, M. Kimura, H. Tukikawa, S. Irie, H. Saito, and T. Miike, *Daily expression of clock genes in whole blood cells in healthy subjects and a patient with circadian rhythm sleep disorder*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. 289(5): p. R1273-9.
- 163. Terazono, H., T. Mutoh, S. Yamaguchi, M. Kobayashi, M. Akiyama, R. Udo, S. Ohdo, H. Okamura, and S. Shibata, *Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(11): p. 6795-800.
- 164. Toh, K.L., C.R. Jones, Y. He, E.J. Eide, W.A. Hinz, D.M. Virshup, L.J. Ptacek, and Y.H. Fu, *An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome.* Science, 2001. 291(5506): p. 1040-3.
- 165. Travnickova-Bendova, Z., N. Cermakian, S.M. Reppert, and P. Sassone-Corsi, *Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(11): p. 7728-33.
- 166. Tsinkalovsky, O., R. Smaaland, B. Rosenlund, R.B. Sothern, A. Hirt, S. Steine, A. Badiee, J.F. Abrahamsen, H.G. Eiken, and O.D. Laerum, *Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells.* J Biol Rhythms, 2007. 22(2): p. 140-50.
- 167. Van Cauter, E., U. Holmback, K. Knutson, R. Leproult, A. Miller, A. Nedeltcheva, S. Pannain, P. Penev, E. Tasali, and K. Spiegel, *Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function*. Horm Res, 2007. 67 Suppl 1: p. 2-9.
- 168. Vanselow, K., J.T. Vanselow, P.O. Westermark, S. Reischl, B. Maier, T. Korte, A. Herrmann, H. Herzel, A. Schlosser, and A. Kramer, *Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)*. Genes Dev, 2006. 20(19): p. 2660-72.

169. Vitaterna, M.H., C.P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E.M. Fruechte, K. Hitomi, R.J. Thresher, T. Ishikawa, J. Miyazaki, J.S. Takahashi, and A. Sancar, *Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(21): p. 12114-9.

- 170. von Treuer, K., T.R. Norman, and S.M. Armstrong, *Overnight human plasma melatonin, cortisol, prolactin, TSH, under conditions of normal sleep, sleep deprivation, and sleep recovery.* J Pineal Res, 1996. 20(1): p. 7-14.
- 171. Vosko, A.M., M.H. Hagenauer, D.L. Hummer, and T.M. Lee, *Period gene expression in the diurnal degu (Octodon degus) differs from the nocturnal laboratory rat (Rattus norvegicus)*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. 296(2): p. R353-61.
- 172. Weaver, D.R., J.H. Stehle, E.G. Stopa, and S.M. Reppert, *Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. 76(2): p. 295-301.
- 173. Weaver, D.R., *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective.* J Biol Rhythms, 1998. 13(2): p. 100-12.
- 174. Wehr, T.A., *Melatonin and seasonal rhythms*. J Biol Rhythms, 1997. 12(6): p. 518-27
- 175. Wever, R.A., *Characteristics of circadian rhythms in human functions*. J Neural Transm Suppl, 1986. 21: p. 323-73.
- 176. Winget, C.M., C.W. DeRoshia, and D.C. Holley, *Circadian rhythms and athletic performance*. Med Sci Sports Exerc, 1985. 17(5): p. 498-516.
- 177. Wisser, H. and H. Breuer, *Circadian changes of clinical chemical and endocrinological parameters*. J Clin Chem Clin Biochem, 1981. 19(6): p. 323-37.
- 178. Wright, K.P., Jr., R.J. Hughes, R.E. Kronauer, D.J. Dijk, and C.A. Czeisler, *Intrinsic near-24-h pacemaker period determines limits of circadian entrainment to a weak synchronizer in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(24): p. 14027-32.
- 179. Yamajuku, D., Y. Shibata, M. Kitazawa, T. Katakura, H. Urata, T. Kojima, S. Takayasu, O. Nakata, and S. Hashimoto, *Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator*. FEBS Lett, 2011. 585(14): p. 2217-22.
- 180. Yamamoto, T., Y. Nakahata, H. Soma, M. Akashi, T. Mamine, and T. Takumi, *Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues*. BMC Mol Biol, 2004. 5: p. 18.
- 181. Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G.D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker, and H. Tei, *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats.* Science, 2000. 288(5466): p. 682-5.
- 182. Yokota, S., M. Yamamoto, T. Moriya, M. Akiyama, K. Fukunaga, E. Miyamoto, and S. Shibata, *Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogenactivated protein kinase in light-induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster.* J Neurochem, 2001. 77(2): p. 618-27.
- 183. Yoo, S.H., S. Yamazaki, P.L. Lowrey, K. Shimomura, C.H. Ko, E.D. Buhr, S.M. Siepka, H.K. Hong, W.J. Oh, O.J. Yoo, M. Menaker, and J.S. Takahashi, *PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(15): p. 5339-46.
- 184. Zhao, W.N., N. Malinin, F.C. Yang, D. Staknis, N. Gekakis, B. Maier, S. Reischl, A. Kramer, and C.J. Weitz, *CIPC is a mammalian circadian clock protein without invertebrate homologues*. Nat Cell Biol, 2007. 9(3): p. 268-75.

## 8. Anhang

### **8.1 Datentabelle: Einzelspenderanalyse**

# Statistische Berechnung der Amplitude und Akrophase von allen Parametern und Einzelspenderanalyse

		Akro-		Einzel-	Einzel-
	p-Wert	phase (in h)	Amplitude	spender-	spender-
				analyse	analyse
T 7-1161-4:				(p<0.1)	(p<0.05)
T-Zellfunktion	0.0017	10.51	57.27	2/7	2/7
CD40L (%)	0.0017	18:51	57.37	2/7	2/7
CD40L (MFI)	0.0125	18:31	25.03	4/7	2/7
IFN-γ+ CD40L+ (%)	0.0031	19:05	65.25	3/7	3/7
IFN-γ (MFI)	<0.00001	19:54	43.82	5/7	3/7
IL-2 (%)	0.027	18:05	43.01	3/7	2/7
IL-2 (MFI)	0.0062	18:12	15.63	1/7	0/7
IL-4 (%)	0.0003	18:15	67.71	3/7	2/7
IL-4 (MFI)	0.22	16:40	12.52	2/7	2/7
IL-17 (%)	0.11	19:19	44.71	3/7	3/7
IL-17 (MFI)	0.14	19:02	15.51	0/7	0/7
<i>ex vivo</i> Uhrengene					
Bmal1 (mRNA)	0.1116	22:07	6.59	2/7	2/7
CD40L (mRNA)	0.16	08:07	5.59	2/7	1/7
Clock (mRNA)	0.58	04:41	2.32	0/7	0/7
Cry1 (mRNA)	0.25	04:09	5.57	2/7	1/7
Cry2 (mRNA)	0.059	13:28	11.86	2/7	1/7
Dbp (mRNA)	0.22	05:17	5.72	1/7	1/7
E4bp4 (mRNA)	0.044	14:00	17.98	1/7	0/7
IFN-γ (mRNA)	0.83	05:35	2.92	1/7	1/7
IL-2 (mRNA)	0.024	11:32	12.05	1/7	1/7
IκBα (mRNA)	0.097	11:24	6.62	1/7	0/7
Per2 (mRNA)	0.017	05:03	9.59	2/7	1/7
Per3 (mRNA)	< 0.00001	06:08	22.59	6/7	5/7
Rev-erbα (mRNA)	< 0.00001	01:35	19.91	5/7	5/7
Rorα (mRNA)	0.02	06:39	9.27	1/7	1/7
in vitro Uhrengene					
Bmall (mRNA)	0.0515	09:08	14.3	0/3	0/3
CD40L (mRNA)	0.11	23:33	7.97	1/3	1/3
Clock (mRNA)	0.55	17:43	8.01	0/3	0/3
Cryl (mRNA)	0.43	13:00	16.04	0/3	0/3
Cry2 (mRNA)	0.12	17:13	21.91	1/3	1/3

Dbp (mRNA)	0.12	10:57	32.73	1/3	0/3
E4bp4 (mRNA)	0.89	15:03	8.49	0/3	0/3
IFN-γ (mRNA)	0.23	11:49	27.44	1/3	0/3
Per2 (mRNA)	0.43	14:48	21.13	0/3	0/3
Per3 (mRNA)	0.0001	15:37	32.76	3/3	2/3
Rev-erbα (mRNA)	0.046	21:17	41.74	0/3	0/3
Rora (mRNA)	0.67	14:29	9.62	0/3	0/3
Hormone,					
Temperatur und					
Herzrate					
Adrenalin	0.0003	16:46	42.8	3/7	3/7
Körperkerntemperatur	< 0.00001	17:23	1.12	6/7	6/7
Cortisol	< 0.00001	11:45	58.47	4/7	4/7
Herzrate	< 0.00001	15:33	10.46	4/7	2/7
Melatonin	< 0.00001	03:40	96.92	7/7	7/7
Prolaktin	< 0.00001	03:40	27.56	5/7	3/7

#### 8.2 Ethikvotum



#### Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn

Prof. Dr. Jan Born

Institut für Neuroendokrinologie

im Hause

Bearbeiter:

Frau Erdmann

Telefon: Fax: (0451) 500-(0451) 5004639 3026

email:

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Datum:

05.03.2008

Aktenzeichen:

en:

nachrichtlich:

Frau Anja Ottbein, Sekretariat des Inst. für Neuroendokrinologie

( immer angeben ! ) 91-025

Ihr Antrag – behandelt in der Sitzung der Ethik-Kommission am 08. Juli 1991 Antragsteller: Herr Prof. Born (vormals Herr Prof. Fehm) Titel: Aufdeckung der Wechselbeziehungen zwischen Immunsystem und Schlaf

Sehr geehrter Herr Prof. Born,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. L. Wessel Stelly. Vorsitzender

#### 8.3 Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchführen zu können möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Solbach sehr herzlich bedanken. Stets stand er mir mit fachkundigem Rat zur Verfügung auch in der Phase des Schreibens dieser Arbeit erfuhr ich eine große Hilfsbereitschaft und intensive Betreuung.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Thomas Bollinger für die Einführung in das Thema und der großen Hilfe bei der Planung der Versuche und der Auswertung der erhobenen Daten.

Eine große Unterstützung im Labor erfuhr ich durch Frau Ludmila Skrum, die mich in die Methoden einwies und mir, insbesondere bei der RNA-Quantifizierung, tatkräftig zur Seite stand, dafür mein besonderer Dank.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene möchte ich für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein Dank geht auch an das Institut für Neuroendokrinologie für die Zusammenarbeit im Schlaflabor und dem Institut für Klinische Chemie für die Durchführung der Hormonanalysen.

Meinen Eltern, Freunden und Kommilitonen, insbesondere Alexander, Constanze, Corinna, Jan, Natali und René möchte ich für die Unterstützung, die ich erfahren durfte herzlich danken.

8.4 Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht worden in:

Bollinger, T., A. Leutz, A. Leliavski, L. Skrum, J. Kovac, L. Bonacina, C. Benedict, T.

Lange, J. Westermann, H. Oster, and W. Solbach, Circadian clocks in mouse and human

CD4+ T cells. PLoS One, 2011. 6(12): p. e29801.

8.5 Erklärung

Anton Leutz

Elsässerstr. 29

23564 Lübeck

Tel.: 0451/797178

E-Mail: antonleutz@gmx.de

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine

anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Sämtliche wörtlich

oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich mit einer Quellenangabe gekennzeichnet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation erstmalig einreiche und an keinem

Promotionsverfahren bisher teilgenommen habe. Die Dissertation wurde am Institut für

Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck durchgeführt und

wurde von Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach betreut.

Lübeck, Januar 2013

Anton Leutz