

Aus dem
Institut für Medizinische Psychologie
der Universität Tübingen

**Der Einfluss des circadianen Systems auf die Anzahl
zirkulierender antigenspezifischer T-Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Leykamm, Verena Ruth Isabella

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Born

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 18.12.2020

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Circadianer Rhythmus.....	2
1.1.1	Organisches und molekulares System	3
1.1.2	Beispiele	5
1.2	Immunsystem.....	5
1.2.1	T-Lymphozyten und ihre Subpopulationen	6
1.2.2	Viren	9
1.3	Circadiane Rhythmen im Immunsystem.....	12
1.3.1	Rolle von Cortisol.....	14
1.4	Hypothesen.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Versuchspersonen	18
2.2	Auswahl der Versuchspersonen	19
2.2.1	HLA-Typisierung	19
2.3	Studiendesign und -ablauf	20
2.4	Datenerhebung	22
2.4.2	pHLA Multimere	22
2.4.2.1	Herstellung biotinylierter pHLA-A*0201 Monomeren	22
2.4.2.2	Herstellung und Einfrieren der pHLA-A*0201 Multimeren	23
2.4.3	Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern	25
2.4.4	Bestimmung der absoluten Zellzahlen mittels Trucount Tubes...	26
2.4.5	Durchflusszytometrie	26
2.4.6	Bestimmung von Cortisol	29
2.5	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Gesamtpopulation CD8 ⁺ T-Zellen.....	31
3.2	Antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellen.....	32

3.3 Subpopulationen antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	37
3.3.1 Prozentuale Verteilung	37
3.3.2 Circadianer Verlauf	38
3.4 Korrelation mit Cortisol	41
4 Diskussion	43
4.1 Unterschiede der antigenspezifischen Gesamtpopulationen	43
4.1.1 Absolute Anzahl	43
4.1.2 Circadianer Verlauf	44
4.2 Unterschiede der antigenspezifischen Subpopulationen	47
4.2.1 Prozentuale Verteilung	47
4.2.2 Circadianer Verlauf	50
4.3 Einflussnahme von Cortisol	53
4.4 Klinische Relevanz und Ausblick	55
5 Zusammenfassung	57
Literaturverzeichnis	58
Erklärung zum Eigenanteil	69
Danksagung	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema über Ablauf des Experiments	20
Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	28
Abbildung 3: Circadianer Verlauf der Gesamtpopulation zirkulierender CD8 ⁺ T-Zellen	32
Abbildung 4: Repräsentatives Beispiel für den circadianen Rhythmus der virusspezifischen CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen.....	33
Abbildung 5: Circadianer Verlauf der absoluten Zellzahlen und prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation zirkulierender influenzaspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	35
Abbildung 6: Circadianer Verlauf der absoluten Zellzahlen und prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation zirkulierender CMV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	36
Abbildung 7: Anteilmäßige Verteilung der Subpopulationen antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	37
Abbildung 8: Circadianer Verlauf der absoluten Zellzahlen für die Subpopulationen zirkulierender virusspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	40
Abbildung 9: Circadiane Veränderung der Cortisolkonzentration	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Subpopulationen CD8 ⁺ T-Zellen anhand von Oberflächenmarkern.....	9
Tabelle 2: Herstellung von pHLA-A*0201 Multimeren	23
Tabelle 3: Zusammensetzung der 3X-Glycerinlösung.....	24
Tabelle 4: Mischung von Multimer und 3X-Glycerinlösung.....	24
Tabelle 5: Antikörper und BSB zur Färbung der Oberflächenmoleküle	25
Tabelle 6: Ergebnisse der ANOVA und der Cosinor-Analysen für die absolute Anzahl zirkulierender antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen und ihre Subpopulationen	31
Tabelle 7: Charakteristika der Subpopulationen.....	39

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
Ag/AgCl-Elektrode	Silber-Silberchlorid-Elektrode
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APC	Allophycocyanin
BMAL1	Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)-like 1
BMI	Body-Mass-Index
BSB	Brilliant Stain Buffer
BV	Brilliant Violet
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD	Cluster of differentiation
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CMIA	Chemilumineszenz-Mikroimmunoessay
CMV	Cytomegalievirus
CRY	CRYPTOCHROM
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
engl.	englisch
EOG	Elektrookulogramm
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Zentrifugalbeschleunigung
HEV	hochendotheliale Venolen
HHV5	Humanes Herpesvirus 5

HLA	Human Leukocyte Antigen (Humanes Leukozyten-Antigen)
HSA	Humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
MHC	Major-Histocompatibility-Complex (Haupthistokompatibilitätsindex)
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PER	PERIOD
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMTs	Photomultiplier Tubes (Photoelektronenvervielfacher)
RHT	retinohypothalamischer Trakt
RNA	Ribonukleinsäure
SCN	suprachiasmatic nucleus (Nucleus suprachiasmaticus)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SSC	Sidescatter (Seitwärtsstreulicht)
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TBS	Tris-buffered saline (Trishydroxymethylaminomethan-gepufferte Salzlösung)

1 Einleitung

Die Anzahl zirkulierender T-Zellen im Blut zeigt einen ausgeprägten circadianen, d.h. annähernd 24-stündigen, Rhythmus, mit maximalen Werten in der Nacht und einem deutlichen Abfall gegen Morgen. T-Zellen lösen eine an das jeweilige Pathogen, das sie erkennen, angepasste, sehr spezifische Antwort aus. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob antigenspezifische T-Zellen, die unterschiedliche Viren mit unterschiedlichen Eigenschaften erkennen, möglicherweise unterschiedliche circadiane Rhythmen aufweisen. Der Fokus lag hierbei auf T-Zellen, die spezifisch das Cytomegalievirus (CMV) erkennen, als Beispiel eines Virus, das eine latent persistierende Infektion auslöst, sowie auf T-Zellen, die das Influenzavirus erkennen, als Beispiel eines Virus, das eine akute Infektion auslöst. Die auf ein Virus spezialisierten T-Zellen stellen keine homogene Zellpopulation dar. Sie können anhand ihrer variierenden Oberflächenmoleküle weiter in Subpopulationen unterteilt werden. Aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften liegt die Vermutung nahe, dass die einzelnen virusspezifischen Subpopulationen ebenfalls einem individuellen circadianen Rhythmus folgen könnten. Wie genau diese Rhythmen entstehen und welche Faktoren sie beeinflussen, ist bislang wenig untersucht. Eine zentrale Rolle scheint das Hormon Cortisol zu spielen. Deshalb beschäftigt sich ein weiterer Aspekt dieser Studie damit, ob ein möglicher Zusammenhang mit Cortisol unterschiedlich für T-Zellpopulationen ausfällt, die auf verschiedene Viren spezialisiert sind.

1.1 Circadianer Rhythmus

Rhythmus bedeutet Wiederholung. Eine Veränderung wiederholt sich in einem vergleichbaren Muster. Dass Prozesse nicht alle zu jeder Zeit stattfinden, sondern in Rhythmen ablaufen, hat verschiedene Vorteile. Zum einen ermöglicht es die optimale Anpassung eines Organismus an sich wiederholende, verändernde Bedingungen in seiner Umgebung (Cuninkova and Brown, 2008) und spart damit Energie. Zum anderen können gegensätzliche Prozesse zeitlich getrennt ablaufen (Cermakian *et al.*, 2013; Scheiermann *et al.*, 2018). Vorgänge, die sich im Körper zyklisch wiederholen, sind beispielsweise Atmung oder Herzschlag, welche jeweils nur wenige Sekunden dauern. Ferner gibt es Rhythmen, die größere Zeiträume einnehmen, darunter der Wechsel der Jahreszeiten. Besonders gut erkennbar sind diese jährlich wiederkehrenden Rhythmen im Tierreich an Brunft- und Paarungszeiten, dem Vogelzug oder Winterruhe bzw. -schlaf. Die Vegetationsperioden der Pflanzen folgen gleichermaßen einem regelmäßigen Zyklus. Doch auch in der Physiologie des Menschen existieren Rhythmen mit einer längeren Periodendauer, beispielsweise der Menstruationszyklus. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass eine Vielzahl physiologischer Vorgänge geprägt sind von Rhythmen oder sich daran anpassen, wobei die Ausprägung rhythmischer Veränderungen über den Tag wohl am stärksten ist (Hastings *et al.*, 2007).

Der circadiane Rhythmus, abgeleitet vom lateinischen *circa* = ungefähr und *dies* = Tag, dauert näherungsweise 24 Stunden. Dies entspricht damit dem Zeitrahmen, in dem sich die Erde einmal um sich selbst dreht. Man könnte annehmen, der circadiane Rhythmus eines Organismus wird nur von den Umweltbedingungen gesteuert. Veränderten sich diese, würde sich der Organismus vollständig anpassen. Es handelt sich dabei jedoch um einen selbstständigen, endogenen Rhythmus. Dieser ist angeboren und bleibt auch dann bestehen, wenn normalerweise wechselnde Umweltbedingungen, wie das Tageslicht und die Umgebungstemperatur, unter experimentellen Bedingungen konstant bleiben. Der freilaufende Rhythmus, der sich dann einstellt, kann in

seiner Länge individuell variieren. Bei den meisten Menschen verlängert er sich auf etwas mehr als 24 Stunden (Aschoff, 1965). Erst durch Synchronisation mit den äußeren Bedingungen, dem sog. Entrainment, wird der endogene Rhythmus auf 24 Stunden angepasst. Dies geschieht über exogene Faktoren, die sog. Zeitgeber, wobei dem Licht für den circadianen Rhythmus die größte Bedeutung zukommt (Bell-Pedersen *et al.*, 2005).

1.1.1 Organisches und molekulares System

Bei Säugetieren ist der Nucleus suprachiasmaticus (engl. suprachiasmatic nucleus, SCN) der Haupttaktgeber des circadianen Rhythmus. Er befindet sich im ventralen Hypothalamus, direkt über der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum). Paarig angelegt, liegt er beidseits des dritten Ventrikels. Er setzt sich zusammen aus einzelnen Neuronen, die mehrere funktionelle Untereinheiten bilden. Jedes Neuron besitzt die Fähigkeit einzeln zu oszillieren, wie in in-vitro Versuchen nachgewiesen werden konnte (Welsh *et al.*, 1995). Erst die enge Kopplung des Zellverbands ermöglicht die Generierung eines robusten circadianen Rhythmus (Welsh *et al.*, 2010). Informationen über sich verändernde Lichtverhältnisse werden von spezifischen photosensitiven Ganglienzellen der Retina aufgenommen und über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) an den SCN weitergeleitet. Sie ermöglichen die Synchronisation des endogenen Rhythmus mit der Umwelt.

Auf molekularer Ebene entsteht der circadiane Rhythmus durch Regulation der Genexpression. In translational-transkriptionellen Rückkopplungsschleifen beeinflussen Proteine die eigene Genexpression. Die Proteinkonzentration schwankt dabei im Tagesverlauf durch periodische Aktivierung und Deaktivierung der Expression. Durch die Verknüpfung mehrerer solcher Schleifen entsteht ein autoregulatorisches System. Zunächst werden die beiden Gene BMAL1 (Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)-like 1) und CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) exprimiert. Die entstandenen Proteine lagern sich im Zytoplasma zu einem Heterodimer BMAL1/CLOCK aneinander. Dieser Proteinkomplex

rezirkuliert in den Zellkern und agiert dort als Transkriptionsfaktor durch die Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Promotor-Elemente (Enhancer-Box). Gleichzeitig werden regulatorische Gene, wie PER (PERIOD) und CRY (CRYPTOCHROM) vermehrt abgelesen. Ab einer gewissen Konzentration im Zytoplasma bilden sie ebenfalls Heterodimere. Diese PER/CRY-Komplexe hemmen im Zellkern die Aktivität von BMAL1/CLOCK. In der Folge dieser negativen Rückkopplung verringern sie die eigene Proteinbiosynthese und die Konzentration von PER und CRY fällt wieder ab. Es entstehen keine weiteren Proteinkomplexe und die Vorhandenen werden nach und nach abgebaut. Der BMAL1/CLOCK-Komplex wird nicht weiter inhibiert und aktiviert wieder die Genexpression (Abruzzese, 2011; Scheiermann *et al.*, 2013).

Man geht inzwischen davon aus, dass nahezu alle menschlichen Zellen einen eigenständigen Rhythmus generieren. Dies konnte unter anderem in Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (Boivin *et al.*, 2003). Der SCN ist demnach nicht der alleinige Taktgeber, sondern dient der übergeordneten Regulation der peripheren molekularen Uhren. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass periphere Organe bei nicht mehr funktionsfähigem SCN ihren eigenen Rhythmus aufrechterhalten, aber nicht mehr synchron sind (Yoo *et al.*, 2004). Der SCN nutzt verschiedene Mechanismen zur Steuerung. Hierzu zählt die Ausschüttung von Hormonen, insbesondere Glukokortikoiden, über die Hypophysen-Nebennieren-Achse, das sympathische Nervensystem, systemische Komponenten, wie die Körpertemperatur, sowie indirekt die Nahrungsaufnahme (Cuninkova and Brown, 2008; Hastings *et al.*, 2003). Am Tiermodell konnte festgestellt werden, dass etwa 10% der Genexpression in Leber und Herz einer circadianen Rhythmik unterliegen (Akhtar *et al.*, 2002; Storch *et al.*, 2002). In anderen Geweben ist von einer ähnlichen Größenordnung auszugehen. Häufig handelt es sich um Schlüsselenzyme in einem Stoffwechselweg. Deren periodische An- und Abschaltung leitet den Rhythmus in andere Bereiche weiter (Hastings *et al.*, 2007).

1.1.2 Beispiele

Die Auswirkung des circadianen Rhythmus zeigt sich am offensichtlichsten im Schlaf-Wach-Rhythmus. Allerdings sind in anderen Parametern, wie Temperatur, Blutdruck und Puls, ebenfalls täglich wiederkehrende Schwankungen messbar. Selbst Wahrnehmungen, wie das Schmerzempfinden, scheinen je nach Tageszeit unterschiedlich ausgeprägt zu sein (Koch and Raschka, 2009). Des Weiteren lassen sich im Auftreten einiger Erkrankungen Häufungen zu bestimmten Tageszeiten erkennen, die auf circadianen Veränderungen beruhen (Scheiermann *et al.*, 2013). So treten kardiovaskuläre Komplikationen vermehrt am Morgen auf (Gupta and Shetty, 2005; Portaluppi and Lemmer, 2007). Nierenkoliken ereignen sich hauptsächlich nachts (Manfredini *et al.*, 2002). Nach Nierentransplantationen in den frühen Morgenstunden zeigten sich häufiger Abstoßungsreaktionen (Knapp *et al.*, 1979). Bei chronischen Erkrankungen treten Symptome ebenfalls gehäuft zu bestimmten Tageszeiten auf. Dies konnte beispielsweise für Heuschnupfen (Nicholson and Bogie, 1973), Asthma (Haus and Smolensky, 1999) und rheumatoide Arthritis (Cutolo, 2012) nachgewiesen werden.

1.2 Immunsystem

Der Körper kommt täglich mit einer großen Anzahl von Krankheitserregern, wie Viren und Bakterien, in Kontakt. Das Immunsystem verhindert deren Eindringen und Ausbreitung. Es setzt sich aus verschiedenen Systemen zusammen, die miteinander in Verbindung stehen. Eine mögliche Einteilung ist die in angeborene und erworbene Anteile. Das angeborene Immunsystem ist bereits ab Geburt vollständig entwickelt. Es stellt die primäre Immunantwort, die schnell und jederzeit verfügbar ist. Unabhängig vom Auslöser erfolgt die Reaktion immer nach dem gleichen Muster, also unspezifisch. Das erworbene Immunsystem hingegen entwickelt sich erst im Verlauf des Lebens. Es wird auch als spezifisch oder adaptiv bezeichnet. Nach dem ersten Kontakt mit einem Erreger entsteht innerhalb mehrerer Tage eine effektivere, speziell auf diesen angepasste Immunantwort. Dieser Teil des Immunsystems bildet ein

Gedächtnis, sodass bei einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger die spezifische Immunabwehr schneller zur Verfügung steht.

Leukozyten sind die Zellen des Immunsystems. Aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickelt sich eine Vielzahl von Zelltypen. Während unter anderem Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zur angeborenen Immunabwehr gehören, sind Lymphozyten Bestandteil des erworbenen Immunsystems. Letztere lassen sich weiter unterteilen in B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten reifen vollständig im Knochenmark. Werden sie aktiviert, differenzieren sie zu Plasmazellen. Als solche produzieren sie Antikörper, diese zirkulieren frei im Blut, um weitere Erreger zu neutralisieren oder für andere Immunzellen zu markieren. Im Folgenden wird näher auf die T-Zellen eingegangen, da sie für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

1.2.1 T-Lymphozyten und ihre Subpopulationen

T-Lymphozyten tragen ihren Namen, weil sie noch als Vorgängerzellen vom Knochenmark in den Thymus einwandern. Dort entwickelt jeder Thymozyt seinen T-Zell-Rezeptor. Dieser membranständige Rezeptor besteht aus zwei Ketten, bei 95% der T-Zellen mit je einer α - und einer β -Kette, bei allen Weiteren mit γ - und δ -Ketten. Die variablen Domänen beider Ketten bilden gemeinsam eine Antigenbindungsstelle. Durch genetische Rekombination ist letztere für jede Zelle einzigartig. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip bilden sie nur zu ihrem spezifischen Antigen eine stabile Bindung. Bei der T-Zell-Reifung erfolgt eine zweifache Selektion, um sicherzustellen, dass ausschließlich Zellen ausreifen, die zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden können. Im ersten Schritt, der positiven Selektion, überleben nur T-Zellen, die ihnen angebotene Antigene mit niedriger Affinität erkennen. Im zweiten Schritt, der negativen Selektion, werden körpereigene Peptide, sog. Autoantigene, präsentiert. Nur Zellen mit ausbleibender Affinität gehen nicht in die Apoptose und wandern als reife, naive T-Zellen in periphere lymphatische Organe.

Anhand ihrer Morphologie lassen sich Lymphozyten nicht unterscheiden. Aus diesem Grund nutzt man die charakteristische Expression zellmembranständiger oder intrazellulärer Proteine zur Einteilung. Sie bestimmen das jeweilige Potential für Stimulation, Zirkulation in lymphatisches Gewebe und Effektorfunktionen (Appay *et al.*, 2008). Die Einteilung der Oberflächenmoleküle, anhand derer die Zellen identifiziert werden, erfolgt für die meisten Moleküle in fortlaufender Nummerierung nach dem „Cluster of Differentiation“ (CD). Deren Nachweis geschieht durch spezifische Antikörper, die jeweils nur ein CD-Antigen binden. Die Anwendung fluoreszierender Antikörper ermöglicht die Differenzierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting, FACS).

Alle T-Lymphozyten tragen CD3 auf der Oberfläche. Sie werden unterteilt in CD4⁺ T-Helferzellen (T_H-Zellen) und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. T_H-Zellen stimulieren die Immunantwort. Hierfür schütten sie Zytokine aus, welche die Migration weiterer Immunzellen in das Gewebe verstärken. Zusätzlich aktivieren T_H-Zellen B-Lymphozyten und Makrophagen. Zytotoxische T-Zellen töten antigenspezifisch, virusinfizierte oder entartete Zellen direkt ab. Die Freisetzung von Perforinen und Granzymen oder die Bindung an den Fas-Rezeptor (CD95) führt über Apoptose zum Zelltod.

Der sog. Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major-Histocompatibility-Complex, MHC) besteht aus mehreren Genen, welche für Proteine codieren, die membrangebundene Moleküle bilden. Das MHC-System des Menschen wird als Humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA) bezeichnet. T-Zellen können ein Pathogen nur dann erkennen, wenn es ihnen als kurzes Peptid im Komplex mit einem MHC-Molekül präsentiert wird. CD4⁺ T-Zellen binden nur an MHC-Klasse-II-Moleküle. Diese werden vorrangig auf antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, exprimiert und tragen phagozytierte Erregerbestandteile. CD8⁺ T-Zellen hingegen erkennen nur Antigene, die ihnen über MHC-Klasse-I-Moleküle angeboten werden. Diese befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen. Die Moleküle dieser Klasse binden endogene Proteine, die in der Zelle selbst produziert werden. Ist eine Zelle von einem Virus infiziert,

nutzt dieser die zellulären Strukturen zur eigenen Vermehrung. In der Zelle werden virusspezifische Proteine synthetisiert und als virale Antigene über MHC-I-Moleküle auf der Zelle repräsentiert. Werden sie von der T-Zelle als Fremdartigen erkannt, wird die Apoptose der entsprechenden Zelle induziert. Für die MHC-Klasse-I stellen im HLA-System des Menschen unter anderem HLA-A, -B und -C die Hauptgene dar.

Die Gruppe der CD8⁺ T-Lymphozyten lässt sich weiter unterteilen in naive Zellen, Effektorzellen, zentrale Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen (Sallusto *et al.*, 1999). Naive Zellen hatten noch keinen Antigenkontakt, sie zirkulieren zwischen Blut und lymphatischem Gewebe. Treffen sie auf ihr spezifisches Antigen, kommt es zur klonalen Vermehrung und die Tochterzellen differenzieren zu Effektorzellen (Mazzocchi *et al.*, 2011b). Diese haben die Fähigkeit zum Ort der Infektion zu migrieren und mit ihrem hohen zytotoxischen Potential ihre Zielzellen zu eliminieren. Nach Abklingen der akuten Infektion sterben die meisten Effektorzellen ab (Romero *et al.*, 2007). Gedächtniszellen hingegen können Jahre ohne Antigenstimulation überleben, um bei erneutem Kontakt mit ihrem Antigen rasch reaktiviert zu werden. Dies kann eine erneute Infektion ganz verhindern oder ihre Schwere abmildern (Hamann *et al.*, 1997; Kaech *et al.*, 2002). Gedächtniszellen können anhand der Expression des Chemokinrezeptors 7 (CCR7) weiter unterteilt werden. Zentrale Gedächtniszellen besitzen, wie naive Zellen, CCR7 auf ihrer Zelloberfläche. Dieser ermöglicht es ihnen aus dem Blut über hochendotheliale Venolen (HEV) in sekundärlymphatische Organe einzuwandern. Diese Fähigkeit wird auch als „Homing“ bezeichnet. Zur Aktivierung benötigen zentrale Gedächtniszellen, wieder analog zu naiven Zellen, die Präsentation ihres Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (Masopust and Schenkel, 2013; Sallusto *et al.*, 2004). Daraufhin stimulieren sie einerseits T_H-Zellen und dendritische Zellen, andererseits produzieren sie Effektorzellen. Effektor-Gedächtniszellen exprimieren, wie Effektorzellen, kein CCR7 und können somit nicht durch sekundäre lymphatische Organe rezirkulieren. Sie befinden sich im peripheren Gewebe, wo sie bei Antigenkontakt Zytokine bilden und eine sofortige Effektorfunktion ausüben (Sallusto *et al.*, 1999).

Die Zuordnung der CD8⁺ T-Zellen zu ihren Subpopulationen erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand der Expression von CD45RA und CCR7. Tabelle 1 zeigt die in dieser Studie verwendeten Marker zur Diskriminierung der verschiedenen Subpopulationen. CD45 ist eine membranständige Tyrosinphosphatase, die auf den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Auf T-Zellen beeinflusst sie das Aktivierungspotential des T-Zell-Rezeptors. Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen, deren Expression spezifisch für unterschiedliche Zellpopulationen und Differenzierungsstadien ist. Die Isoform CD45RA enthält das Exon A und wird unter anderem auf naiven Zellen und terminal differenzierten Effektorzellen exprimiert. Eine T-Zellaktivierung induziert eine reversible Verschiebung zu CD45RO. Dies ist eine weitere Isoform, die keines der Exons A, B oder C aufweist. CD45RO befindet sich unter anderem auf der Oberfläche von zentralen Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen (van Lier *et al.*, 2003). Zellen, die beide Oberflächenmarker CD45RA und CCR7 exprimieren, werden in dieser Studie aufgrund ihres Phänotyps als naive Zellen bezeichnet, obwohl sie im engeren Sinne nicht naiv sind, weil sie aufgrund der verwendeten Messmethodik zur Detektion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen bereits Kontakt zu ihrem Antigen hatten.

Tabelle 1: Einteilung der Subpopulationen CD8⁺ T-Zellen anhand von Oberflächenmarkern

	<u>antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen</u>			
	<u>naive Zellen</u>	<u>zentrale Gedächtniszellen</u>	<u>Effektor-Gedächtniszellen</u>	<u>Effektorzellen</u>
CD45RA	+	-	-	+
CCR7	+	+	-	-

1.2.2. Viren

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das circadiane System auf antigenspezifische T-Zellen, die Viren mit verschiedenen Eigenschaften erkennen, ausübt, wurden in dieser Studie virusspezifische CD8⁺ T-Zellen für das CMV und das Influenzavirus gemessen. CMV ist ein Paradebeispiel für ein

Virus, das eine latente Infektion auslöst. Da das Immunsystem viele CMV-spezifische Zellen entwickelt, sind diese optimal für eine sensitive Messung von antigenspezifischen T-Zellen im Rahmen einer latenten Infektion geeignet. Influenza hingegen ist eine akute Infektion. Die Anzahl antigenspezifischer Zellen, die nach der akuten Phase übrig bleiben, ist in den meisten Fällen wesentlich geringer. Allerdings ist die Verbreitung einer Influenzainfektion relativ groß, weshalb die Wahrscheinlichkeit recht hoch ist, dass eine CMV-positive Versuchsperson gleichzeitig positiv für das Influenzavirus ist. Aus diesen Gründen haben wir uns in der vorliegenden Arbeit auf diese beiden Viren fokussiert.

Das Influenzavirus gehört zur Gruppe der Orthomyxoviren. Anhand von Antigenen können die drei Gattungen Influenza A, B und C unterschieden werden. Influenza A hat das größte Potential zur Auslösung von Epidemien und ist aufgrund verschiedener Mechanismen hochvariabel. Es wird mittels zweier membranständiger Glykoproteine, von denen verschiedene Isotypen bekannt sind, in weitere Subtypen unterteilt. Das Genom, bestehend aus einzelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA), liegt segmentiert vor. Die Glykoproteine Hämagglutinin und Neuramidase sind auf verschiedenen RNA-Segmenten codiert. Wird ein Wirt gleichzeitig von zwei Virustypen befallen, kann es zum Austausch von RNA-Segmenten kommen. Entsteht hierbei eine neue Kombination der Isotypen, bezeichnet man dies als einen „Antigen-Shift“. Des Weiteren kann durch Punktmutation das Antigenmuster verändert werden, dies wird als „Antigen-Drift“ bezeichnet. Anders als CMV verläuft die Grippeerkrankung akut, das Virus wird vom Immunsystem vollständig eliminiert. Die erworbene Immunität bezieht sich nur auf den spezifischen Subtyp, deshalb kann sich eine Person mehrfach infizieren. Zur Übertragung kommt es durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion. Nach Infektion der zillientragenden Epithelzellen kommt es zur lokalen Infektion des Respirationstraktes. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Beginn mit respiratorischen Krankheitssymptomen, begleitet von Kopfschmerz, Fieber, Gliederschmerzen, Schwächegefühl und Appetitlosigkeit. Schwerwiegende

Verläufe mit insbesondere pulmonalen Komplikationen treten bei Patienten mit herabgesetzter Funktion des Immunsystems auf.

Das CMV, auch bezeichnet als humanes Herpesvirus 5 (HHV5), gehört zur Gruppe der β -Herpesviren. Das Genom besteht aus doppelsträngiger DNA. Als Wirtszellen nutzt das Virus unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, glatte Muskelzellen und Leukozyten (Sinzger *et al.*, 1995; Gerna *et al.*, 2019). Die befallenen Zellen haben intranukleäre Einschlüsse und ein massiv vergrößertes Zytoplasma. Bei der Infektion gesunder, immunkompetenter Personen zeigt das Virus nur eine geringe Virulenz. Der Verlauf ist meistens asymptomatisch, in wenigen Fällen treten leichte, grippeähnliche Symptome auf. Die Verbreitung findet ausschließlich von Mensch zu Mensch statt. Zur Übertragung kommt es bei Kontakt zwischen Schleimhaut und infiziertem Sekret (Speichel, Samenflüssigkeit, Vaginalsekret, Muttermilch), der Transfusion zellhaltiger Blutkomponenten oder der Transplantation von infiziertem Gewebe (Organe, Stammzellen). Die Prävalenz für virusspezifische Antikörper ist populationsabhängig und nimmt mit steigendem Lebensalter zu. In Deutschland liegt sie bei jungen Menschen (15-45 Jahre) ungefähr zwischen 30 und 40% (Enders *et al.*, 2012). Wie alle Herpesviren besitzt CMV die Fähigkeit lebenslang zu persistieren. Das virale Genom verbleibt unter anderem in Endothelzellen und Monozyten (Jarvis and Nelson, 2002). Im Latenzstadium läuft nur eine minimale virale Genexpression ab, während die Virusvermehrung weitestgehend eingestellt ist (Sinclair, 2008). Intermittierend findet eine molekular nachweisbare Reaktivierung statt. Der Wirt scheidet infektiöse Viren aus, erkrankt allerdings bei intaktem Immunsystem selbst nicht. Das Immunsystem kontrolliert den Erreger insbesondere mit einer großen Anzahl virusspezifischer T-Zellen (Dimitrov *et al.*, 2019; Gillespie *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2015). Kritisch ist die Primärinfektion von Frauen während der Schwangerschaft, die das Virus intrauterin auf das Kind übertragen können. Eine kongenitale Infektion kann schwerwiegende Erkrankungen des Neugeborenen mit Spätfolgen, meistens Hörschädigungen, verursachen. Eine weitere Risikogruppe sind Patienten mit einer Schwäche des Immunsystems oder unter immunsuppressiver Therapie. Bei ihnen kann es durch

Primärinfektion oder Reaktivierung zu lebensgefährlichen Erkrankungsverläufen kommen (Baron, 1996).

1.3 Circadiane Rhythmen im Immunsystem

Rhythmen im Immunsystem, die einem circadianen Verlauf folgen, ermöglichen möglicherweise eine antizipatorische zeitliche Organisation von Abwehrmechanismen, die das physiologische Gleichgewicht erhalten (Cermakian *et al.*, 2013; Haus and Smolensky, 1999). Die Immunabwehr hat einen hohen Energiebedarf. Dass sie nicht permanent in gleichem Ausmaß bereitsteht, spart Ressourcen ein. Eine konstant hohe Aktivität immunkompetenter Zellen könnte auch negative Folgen in Form von autoimmunen und allergischen Reaktionen haben (Labrecque and Cermakian, 2015). Die circadiane Rhythmik vieler Immunparameter stellt demnach wahrscheinlich eine Optimierung dar (Martinez-Bakker and Helm, 2015; Scheiermann *et al.*, 2013). Der Organismus passt sich vermutlich daran an, dass während der aktiven Phase mehr Erreger eindringen (Cermakian *et al.*, 2013).

Im Tierexperiment zeigte Edgar *et al.* (2016), dass die Schwere einer Infektion abhängig vom Zeitpunkt der Ansteckung ist. Bei Mäusen, die zu Beginn ihrer aktiven Tageszeit mit dem murinen Herpesvirus 4 infiziert wurden, war die Virusvermehrung wesentlich geringer als am Anfang der Ruhephase. Bei einer natürlichen Infektion ist der genaue Anfangszeitpunkt meist nicht bekannt und im Nachhinein nicht feststellbar. Aus diesem Grund wurden in mehreren Studien Impfungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gegeben, um herauszufinden, ob das Immunsystem je nach Tageszeit auf einen Erreger unterschiedlich reagiert. Langlois *et al.* (1995) konnten nach abendlicher Influenzaimpfung eine stärkere systemische Immunantwort sowie mehr Lokalreaktionen nachweisen. In zwei weiteren Experimenten wurde eine verstärkte Antikörperproduktion nach morgendlicher Impfung gegen Hepatitis A und Influenza nachgewiesen, allerdings nur bei Männern (Phillips *et al.*, 2008). Long *et al.* (2016) zeigten, dass die Antikörperantwort gegen einzelne Subtypen

bei Älteren nach morgendlicher Influenzaimpfung verstärkt ist. Auch wenn die bisherigen Studien kein völlig einheitliches Bild ergeben, konnte belegt werden, dass der Zeitpunkt des Antigenkontakts, neben zahlreichen anderen Faktoren, einen Einfluss auf die Immunantwort hat.

Circadiane Veränderungen in der Plasmakonzentration lassen sich für einige Immunparameter nachweisen, wie beispielsweise Immunzellen und Zytokine. Gleiches gilt für bestimmte Hormone (Haus and Smolensky, 1999). Leukozyten präsentieren unter regulären Schlaf-Wach-Bedingungen einen stabilen circadianen Rhythmus, der sich je nach Zelltyp unterscheidet. Beispielsweise sind NK-Zellen und Granulozyten am Tag in maximaler Konzentration im Blut vorhanden (Ackermann *et al.*, 2012; Born *et al.*, 1997; Dimitrov *et al.*, 2007; Kirsch *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 1997). Misst man hingegen die Gesamtpopulation der Lymphozyten, zeigt sich ein Tiefpunkt morgens und ein abendliches oder nächtliches Maximum (Ackermann *et al.*, 2012; Born *et al.*, 1997; Haus and Smolensky, 1999; Kirsch *et al.*, 2012; Ritchie *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1997).

Dimitrov *et al.* (2009) belegten einen ähnlichen Verlauf für die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen mit maximalen Werten um 2:00 Uhr nachts und minimalen Werten tagsüber um 14:00 Uhr. In einem weiteren Schritt wurden die Subpopulationen getrennt voneinander gemessen. Naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen folgten der gleichen Rhythmik wie die Gesamtpopulation. Effektorzellen hingegen hatten einen entgegengesetzten Verlauf, mit minimalen Werten nachts und einem Anstieg tagsüber. Die Anzahl zirkulierender naiver CD8⁺ T-Zellen schwankte im Tagesverlauf um circa 40% (Dimitrov *et al.*, 2009; Haus and Smolensky, 1999).

Die in bisherigen Studien gemessenen circadianen Verläufe CD8⁺ T-Zellen zeigten teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Mazzocchi *et al.* (2011a) beschreiben für die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen einen morgendlichen Anstieg mit maximalen Konzentrationen um die Mittagszeit. Dies entspricht in der Studie von Dimitrov *et al.* (2009) dem circadianen Rhythmus der Effektorzellen, allerdings nicht der Gesamtpopulation. Beide Studien

unterscheiden sich hinsichtlich des Alters der Versuchspersonen. Diese waren bei Dimitrov *et al.* (2009) im Mittel 25 Jahre alt, bei Mazzoccoli *et al.* (2011a) hingegen 44 Jahre. Ein zweiter Unterschied findet sich in der Präsentation der Daten. Diese werden von Dimitrov *et al.* (2009) als absolute Zellzahlen dargestellt. Mazzoccoli *et al.* (2011a) präsentieren die Ergebnisse hingegen als Prozentwert aller gemessenen Lymphozyten, was die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise erklären könnte.

1.3.1 Rolle von Cortisol

Cortisol ist ein bedeutsames Steuerelement des SCN. Die Regulation erfolgt durch mehrere gekoppelte hormonelle Regelkreise über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Cuninkova and Brown, 2008). Der SCN initiiert im Hypothalamus die Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), welches im Hypophysenvorderlappen die Produktion des adrenocorticotrophen Hormons (ACTH) stimuliert. ACTH beeinflusst die Hormonsynthese und Freisetzung aus der Nebennierenrinde, unter anderem dem zur Gruppe der Glucocorticoide gehörenden Cortisol aus der Zona fasciculata. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Nebennierenrinde eigene molekulare Uhren besitzen, die ebenfalls Einfluss auf die Hormonausschüttung haben (Oster *et al.*, 2006).

Die Cortisolfreisetzung erfolgt, wie die der übergeordneten Hormone, pulsatil. Stress in psychischer oder körperlicher Variante induziert einen akuten Anstieg. Gleichzeitig zeigt die Plasmakonzentration einen stabilen circadianen Rhythmus mit minimalen nächtlichen Werten und einem Maximum zu Tagesbeginn (Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a; Born *et al.*, 1997; Dimitrov *et al.*, 2009; Dodt *et al.*, 1997; Haus, 2007; Mazzoccoli *et al.*, 2011b; Ritchie *et al.*, 1983; Thomson *et al.*, 1980). Das morgendliche Maximum dient zur Vorbereitung auf die aktive Tagesphase (Dickmeis, 2009). Cortisol interagiert über intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren und Mineralokortikoidrezeptoren mit einer Vielzahl von Regelkreisen des Organismus. Als Hormon, das in Stresssituationen ausgeschüttet wird, wirkt es katabol und bewirkt, unter anderem mit einer

Erhöhung des Glukosespiegels im Plasma, sowie vermehrter Lipolyse, eine schnelle Energiebereitstellung.

Auf das Immunsystem hat Cortisol eine überwiegend suppressive Wirkung. Aus diesem Grund nutzt man Glucocorticoide therapeutisch, um eine überschießende Immunantwort beispielsweise bei allergischen Reaktionen einzudämmen. Gleichzeitig spielt Cortisol allerdings auch eine zentrale Rolle in der täglichen Modulation des Immunsystems. Der circadiane Rhythmus von Leukozyten wird stark durch Cortisol beeinflusst (Lange *et al.*, 2010). Zwischen Glukokortikoidkonzentration und zirkulierender Lymphozytenanzahl im Blut zeigt sich eine negative Korrelation (Dimitrov *et al.*, 2009; Fauci, 1975; Ritchie *et al.*, 1983). Gleiches gilt für die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen (Dimitrov *et al.*, 2009). Nach externer Gabe reduzierte Cortisol die Zellzahlen und erreichte die maximale Wirkung mit einer Verzögerung von drei Stunden (Besedovsky *et al.*, 2014b; Dimitrov *et al.*, 2009). Nach Normalisierung des Cortisolspiegels kommt es zu einem raschen Wiederanstieg der zirkulierenden T-Zellen. Dies spricht mehr für eine Umverteilung als für Einflussnahme auf Zellproliferation und Apoptose (Dimitrov *et al.*, 2009). Die stärkste Wirkung hat Cortisol auf naive T-Zellen und zentrale Gedächtniszellen (Besedovsky *et al.*, 2014b; Dimitrov *et al.*, 2009). Ausgereifte Effektorzellen bleiben hingegen scheinbar unbeeinflusst (Dimitrov *et al.*, 2009). Eine Ursache scheint die unterschiedliche Ausstattung der Subpopulationen mit dem CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zu sein. Cortisol verstärkt dessen Expression und ermöglicht die Migration der Zellen ins Knochenmark (Besedovsky *et al.*, 2014b; Dimitrov *et al.*, 2009; Okutsu *et al.*, 2005). Unter der Gabe von Mifepriston, einem Glukokortikoidrezeptorantagonisten, zeigte sich der morgendliche Anstieg der CXCR4-Expression auf naiven T-Zellen vermindert, bei gleichzeitig ausbleibendem Abfall der zirkulierenden naiven T-Zellen im Blut (Besedovsky *et al.*, 2014a). Es gibt Hinweise darauf, dass Cortisol in seiner Funktion als Stresshormon eine sofortige Immunabwehr durch Effektorzellen unterstützt (Atanackovic *et al.*, 2006). Die Fähigkeit des erworbenen Immunsystems eine spezifische Immunantwort zu entwickeln, ist hingegen unter seinem Einfluss reduziert (Dimitrov *et al.*, 2009).

1.4 Hypothesen

In vorausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen einen stabilen circadianen Rhythmus mit nächtlichen Höchstwerten und einem morgendlichen Abfall aufweist. Bei den Subpopulationen folgten naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen diesem Verhalten. Die terminal differenzierten Effektorzellen verhielten sich gegensätzlich und stiegen im Verlauf des Tages an (Ackermann *et al.*, 2012; Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a; Dimitrov *et al.*, 2009).

Die antigenspezifische Immunantwort CD8⁺ T-Zellen ist speziell an ihr spezifisches Pathogen angepasst. Daher liegt die Vermutung nahe, dass verschiedene antigenspezifische T-Zellen möglicherweise einen unterschiedlichen circadianen Rhythmus aufweisen. Ein zentraler Unterschied zwischen der Infektion durch das Influenzavirus und das CMV besteht darin, dass erstere akut verläuft, während letztere latent persistiert mit gelegentlicher Reaktivierung. Wir haben vermutet, dass bei latenten Infektionen wie CMV die circadiane Rhythmik der antigenspezifischen T-Zellen eine untergeordnete Rolle spielt, während die Bekämpfung einer akut verlaufenden Influenzainfektion, für die im Laufe des Tages ein unterschiedlich hohes Risiko besteht, eine deutliche Rhythmik aufweist.

Bei den virusspezifischen Zellen gibt es Unterschiede im Anteil der Subpopulationen. Die influenzaspezifischen CD8⁺ Zellen enthalten einen großen Anteil weniger differenzierter Zellen. Unter den CMV-spezifischen Zellen konnte dagegen ein größerer Anteil hochdifferenzierter T-Zellen nachgewiesen werden (Appay *et al.*, 2008; He *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2004). Aufgrund dessen haben wir vermutet, dass influenzaspezifische Zellen in ihrem circadianen Verhalten mit dem der Gesamtpopulation an CD8⁺ T-Zellen übereinstimmen (das dem nicht terminal-differenzierter CD8⁺ T-Zellen entspricht), während CMV-spezifische Zellen davon abweichen.

Dimitrov *et al.* (2009) stellten fest, dass die einzelnen Subpopulationen aller CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich von Cortisol beeinflusst werden. Naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen korrelieren negativ mit Cortisol, Effektorzellen hingegen positiv. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, inwiefern der circadiane Rhythmus der verschiedenen Subpopulationen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Cortisol gesteuert wird. Hier haben wir vermutet, dass die Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen, sollte diese entsprechend unserer Hypothese keinen circadianen Rhythmus aufweisen, auch nicht mit Cortisol korreliert, während der Rhythmus influenzaspezifischer T-Zellen mit dem circadianen Verlauf von Cortisol zusammenhängt. Dies würde eine zeitliche Trennung der Immunantwort auf latent persistierende und akut auftretende Infektionen ermöglichen und den Energieverbrauch über den Tag besser verteilen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchspersonen

An der Studie nahmen insgesamt 11 Versuchspersonen teil (5 Frauen und 6 Männer). Das Durchschnittsalter betrug 25,09 Jahre bei einer Standardabweichung von 4,1 und der durchschnittliche Body-Mass-Index (BMI) 22,36 kg/m² bei einer Standardabweichung von 1,6. Die Rekrutierung erfolgte über ein Rundschreiben an Studierende und Beschäftigte der Universität Tübingen. Ausschlusskriterien für eine Studienteilnahme waren akute und chronische Erkrankungen, bekannte Schlafstörungen, Rauchen und regelmäßige Medikamenteneinnahme mit Ausnahme der marktüblichen kombinierten oralen Kontrazeptiva. Im Zeitraum von sechs Wochen vor Beginn des Experiments wurden Schichtarbeit und Reisen mit mehr als sechs Stunden Zeitverschiebung ausgeschlossen. Der Ausschluss akuter und chronischer Erkrankungen erfolgte mittels medizinischer Fragebögen, Anamnese und körperlicher Untersuchung durch medizinische Doktoranden unter ärztlicher Anleitung, sowie Bestimmung relevanter Blutparameter. Es wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen, um von einem physiologischen täglichen Rhythmus ausgehen zu können. Die Versuchspersonen wurden angewiesen einen regelmäßigen Schlaf-Wach-Rhythmus einzuhalten und in den sechs Nächten vor dem Experiment ein Schlaftagebuch zu führen. Des Weiteren sollten sie am Versuchstag nicht tagsüber schlafen, keinen exzessiven Sport betreiben, keinen Alkohol und keine Drogen konsumieren, sowie nach 12:00 Uhr keine koffeinhaltigen Produkte zu sich nehmen. Um einen möglichen Einfluss des sich im weiblichen Zyklus verändernden Hormonspiegels auszuschließen, wurde bei Frauen das Experiment nur zwischen den Zyklustagen drei bis sechs durchgeführt. Die Versuchspersonen nahmen an der Studie freiwillig teil und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Für die Teilnahme erhielten sie eine Aufwandsentschädigung von 270 €. Die Durchführung der Studie wurde durch

die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt (Projektnummer: 642/2013BO2).

2.2 Auswahl der Versuchspersonen

In die Studie konnten nur Versuchspersonen aufgenommen werden, die Träger von HLA-A2 waren und bei denen eine ausreichende Anzahl CMV-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden konnte. Insgesamt wurden 99 Personen getestet. Bei 47 konnten Antikörper in Form von Immunglobulin der Klasse G (IgG) gegen CMV nachgewiesen werden. Der Nachweis von CMV-IgG mittels quantitativen Chemilumineszenz-Mikroimmunoassay (CMIA) wurde vom Institut für medizinische Virologie in Tübingen (Dr. Jürgens) durchgeführt. Darunter waren 28 Personen Träger von HLA-A2 (Bestimmung siehe 2.2.1). Bei diesen wurde die Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen, nach Markierung mit pHLA-A*0201 Multimeren (Herstellung siehe 2.4.2). Bei 16 Personen lag der Anteil dieser Zellen bei über 0,23% aller CD8⁺ T-Zellen und sie konnten in die Studie eingeschlossen werden. Fünf Personen war eine Studienteilnahme aus persönlichen Gründen nicht möglich. Das Experiment konnte daher mit 11 Versuchspersonen durchgeführt werden.

2.2.1 HLA-Typisierung

Den Versuchspersonen wurde Blut abgenommen, das in eine 2,6 ml-Natrium-Heparin-Monovette überführt wurde. In zwei FACS-Röhrchen wurden jeweils 50 µl heparinisiertes Blut pipettiert. Beiden Röhrchen wurde 1 µl anti-human CD3-PE Antikörper zugegeben, dem zweiten zusätzlich 1 µl Allophycocyanin (APC) anti-human HLA-A2 (beide BioLegend, San Diego, USA). Nach drei Sekunden Vortexen wurden die Proben für zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Lyse der Erythrozyten mit je 450 µl im Verhältnis 1:10 verdünnter FACS Lysing Solution (BD Bioscience, San Jose, USA) folgte eine weitere zehnminütige Inkubation im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Proben für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch kurzes Umkippen der Röhrchen verworfen. Im nächsten Schritt

wurden die Proben zehn Sekunden gevortext und mit jeweils 2 ml FACS Flow (BD Bioscience, San Jose, USA) gewaschen. Die Proben wurden nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Im Anschluss wurde den Proben 200 µl Fixierlösung zugegeben und sie wurden vorläufig bei 4°C gelagert. Gemessen wurden die Proben am Durchflusszytometer. Hierbei wurden die mit CD3-Antikörpern markierten Zellen dargestellt. Sofern die Versuchsperson HLA-A2 Träger war, konnten die in der zweiten Probe zugegebenen HLA-A2-Antikörper binden und wurden ebenfalls von der Messung erfasst.

2.3 Studiendesign und -ablauf

Die Durchführung der Studie fand im Schlaflabor des Instituts für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie in Tübingen statt. Zur Eingewöhnung schliefen die Versuchspersonen eine Nacht im Labor unter kontrollierten Versuchsbedingungen.

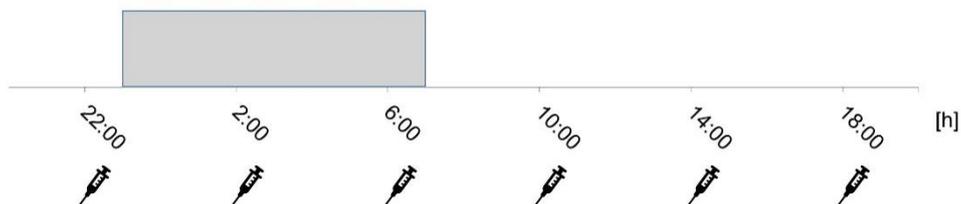


Abbildung 1: Schema über Ablauf des Experiments

Der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Zeitraum, in dem die Versuchspersonen im Bett lagen und schlafen durften. Die Spritzen markieren die Zeitpunkte der Blutabnahmen.

Während des Experiments wurde zu sechs Zeitpunkten im Abstand von vier Stunden Blut abgenommen (siehe Abbildung 1). Hierfür wurde der Versuchsperson eine periphere Venenverweilkanüle (Vasofix Safety 18G, B.Braun, Melsungen, Deutschland) vorwiegend im Bereich der Ellenbeuge gelegt. Die Blutabnahmen an wachen Versuchspersonen erfolgten nach mindestens fünfminütigem, ruhigem Liegen direkt über die Venenverweilkanüle. Für die beiden nächtlichen Blutabnahmen um 2:00 Uhr und 6:00 Uhr wurde ein

Infusionssystem an die Verweilkanüle angeschlossen. Um Blutgerinnung zu vermeiden, wurden durchschnittlich 500 ml 0,9%iger Kochsalzlösung infundiert. Das Blut konnte somit über den Infusionsschlauch aus dem Vorraum abgenommen werden, ohne den Schlaf der Versuchsperson zu beeinträchtigen. Die ersten 7,5 ml Blut wurden jeweils verworfen, um Verdünnungseffekte auszuschließen.

Nach dem Eintreffen im Schlaflabor um circa 20:00 Uhr erhielt die Versuchsperson Instruktionen für das Experiment. Im Anschluss folgte das Legen der Venenverweilkanüle und das Anbringen von Elektroden für das Elektroenzephalogramm (EEG), Elektrookulogramm (EOG), Elektromyogramm (EMG) und Elektrokardiogramm (EKG) zur Schlafableitung. Um 22:00 Uhr fand die erste Blutabnahme statt. Nachdem die Versuchsperson Zeit für persönliche Vorbereitungen hatte, wurde das Infusionssystem angeschlossen und die EEG-Aufzeichnung gestartet. Zur Überprüfung der Elektrodenfunktion wurde ein Test durchgeführt. Um 23:00 Uhr wurde das Licht gelöscht. Um 2:00 Uhr und 6:00 Uhr wurde jeweils Blut abgenommen. Geweckt wurde die Versuchsperson um 7:00 Uhr. Nach dem Wecken wurden die Messelektroden und das Infusionssystem entfernt, die periphere Venenverweilkanüle jedoch für die weiteren Blutentnahmen belassen. Um 8:00 Uhr erhielt die Versuchsperson ein standardisiertes Frühstück. Das Mittagessen um 12:30 Uhr bestand aus einem wechselnden vegetarischen Menü. In den Zeiten zwischen den Blutabnahmen um 10:00 Uhr und 14:00 Uhr hielt sich die Versuchsperson im Schlaflabor auf. Außerdem war es möglich in Begleitung außerhalb des Labors spazieren zu gehen. Jegliche sportliche oder erschöpfende Tätigkeit wurde vermieden. Mindestens eine halbe Stunde vor der nächsten Blutabnahme ging die Versuchsperson einer sitzenden Tätigkeit nach. Nach der letzten Blutabnahme um 18:00 Uhr wurde die Verweilkanüle entfernt und die Versuchsperson entlassen.

2.4 Datenerhebung

In den folgenden Abschnitten werden die bei der Datenerhebung verwendeten Materialien und Hilfsmittel aufgeführt und ihre Anwendung beschrieben.

2.4.2 pHLA Multimere

Um antigenspezifische T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.4.5) detektieren zu können, müssen diese markiert werden. Hierfür wurden Moleküle vom Typ HLA-A2 verwendet, die in ihrer Antigenbindungsstelle virusspezifische Peptide präsentieren. Die methodische Begrenzung auf Träger von HLA-A2 machte eine vorausgehende HLA-Typisierung der Versuchspersonen notwendig (siehe 2.2.1). Die geringe Affinität zwischen einem einzelnen T-Zell-Rezeptor und einem HLA-Molekül ermöglicht keine stabile Bindung. Aus diesem Grund wurden HLA-Multimere verwendet, die durch das gleichzeitige Binden an mehreren T-Zell-Rezeptoren eine stabile Interaktion ermöglichen (Altman *et al.*, 1996).

2.4.2.1 Herstellung biotinylierter pHLA-A*0201 Monomeren

Zur antigenspezifischen Zellstimulation wurden bekannte immundominante CD8⁺ Epitope verwendet: das NLVPMVATV Peptid₍₄₉₅₋₅₀₃₎ aus dem pp65 Protein des CMV und das GILGFVFTL Peptid₍₅₈₋₆₆₎ aus dem Matrixprotein M1 des Influenzavirus. Diese wurden aus viralen Antigenen extrahiert und binden spezifisch an HLA-A2 Rezeptoren. Beide wurden nach bekannten Methoden (Peper and Stevanović, 2015) erzeugt und freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der biotinylierten pHLA-A*0201 Monomere erfolgte durch konventionelle Proteinfaltung, wie von Chandran *et al.* (2016) beschrieben. Die Monomere wurden in Form von Aliquots mit einer Konzentration von 2 mg/ml bei -80°C aufbewahrt.

2.4.2.2 Herstellung und Einfrieren der pHLA-A*0201 Multimeren

Zur Herstellung von fluoreszierenden pHLA-A*0201 Multimeren wurden zunächst die gefrorenen Monomere auf 4°C aufgetaut. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin-PE für CMV und PerCP-Cy5.5 für Influenza (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), in einem molaren Verhältnis von 4 (Streptavidin): 1 (Monomer). Die Zugabe des Konjugates erfolgte im Dunkeln bei 4°C unter ständigem Schwenken. Fortlaufend wurden alle 30 Sekunden Teilportionen von jeweils 10% hinzugegeben, bis die berechnete Gesamtmenge an Streptavidin-PE erreicht war. Im nächsten Schritt wurde 1 mM Biotin (B4501, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 25 µM, um noch freie Bindungsstellen zu blockieren (Chandran *et al.*, 2016). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunkeln und auf Eis erfolgte nach kurzem Vortexen die Lagerung weiterhin im Dunkeln bei 4°C. Die Monomer Stammlösung hatte eine Konzentration von 2000 µg/ml. Die verwendeten Mengen der einzelnen Substanzen werden in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 2: Herstellung von pHLA-A*0201 Multimeren

Konjugate	Volumen Monomer	Volumen Streptavidin	Volumen Biotin 1 mM	Endvolumen	Endkonzentration des Multimers
Strep-PE (CMV)	125 µl	400 µl	13,1 µl	538,1 µl	465 µl/ml
PerCP-Cy5.5 (Influenza)	125 µl	385 µl	12,8 µl	522,9 µl	478 µl/ml

Zum Einfrieren der pHLA-A*0201 Multimere wurde 1ml 3X-Glycerinlösung vorbereitet, bestehend aus humanem Serumalbumin (HSA, Albiomin®, Biotest, Dreieich, Deutschland), Natriumazid (NaN₃), Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Trishydroxymethylaminomethan-gepufferter Salzlösung (engl. Tris-buffered saline, TBS) mit einem pH=8,0 und einer Temperatur von 4°C. Die Herstellung erfolgte wie beschrieben in Hadrup *et al.* (2015). Für die genaue

Zusammensetzung siehe Tabelle 3. Die Verarbeitung wurde auf Eis in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der 3X-Glycerinlösung

Substanzen	Konzentration in der Stammlösung	Hinzugefügtes Volumen	Konzentration in der 3X-Glycerinlösung	Endkonzentration im Tetramer
HSA	20%	75 µl	1,5%	0,5%
NaN ₃	10%	6 µl	0,06%	0,02%
Glycerin	100%	480 mg	48%	16%
TBS	20 mM	439 µl		

Die vorbereitete Lösung wurde in einem molaren Verhältnis von 2 (Multimer): 1 (3X-Glycerinlösung), wie in Tabelle 4 dargestellt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 4: Mischung von Multimer und 3X-Glycerinlösung

Parameter	Tetramer-PE	Tetramer-PerCP-Cy5.5
Volumen Multimer	538 µl	523 µl
Volumen 3X-Glycerin	269 µl	262 µl
Endvolumen	807 µl	785 µl
Endkonzentration Tetramer	310 µl/ml	319 µl/ml
Anzahl/Volumen des Aliquots	67/12 µl	65/12 µl

Vor der Anwendung wurden die Proben mit jeweils 140 µl Lösung bestehend aus Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. Phosphate-buffered saline, PBS) und 0,5% Albumin verdünnt und für 5 Minuten bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen.

2.4.3 Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern

Von jeder Blutabnahme wurden 400 µl heparinisiertes Blut in ein 5 ml FACS-Röhrchen pipettiert und mit jeweils 10 µl der vorbereiteten HLA-A*0201 Multimere CMV/PE und FLU(Influenza)/PerCP-Cy5.5 versetzt. Nach vorsichtigem Schütteln erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten im Dunklen. Im Anschluss wurden 20 µl der vorbereiteten Mischung aus folgenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD3-BV510, CD8-BV605, CD45RA-AF700, CCR7-BV421, CD27-PECy7 und CD28-FITC, (alle BioLegend, San Diego, USA) und Brilliant Stain Buffer (BSB) (BD Horizon™, BD Bioscience, San Jose, USA) hinzugefügt (für Mengenangaben siehe Tabelle 5). CD27-PECy7 und CD28-FITC wurden in der Datenauswertung nicht berücksichtigt. Es folgte eine weitere Inkubation unter gleichen Bedingungen für 15 Minuten. Nach Lyse mit je 4 ml im Verhältnis 1:10 verdünnter FACS Lysing Solution (BD Bioscience, San Jose, USA) folgte eine weitere zehnmünütige Inkubation. Im Anschluss wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch kurzes Umkippen der Röhrchen verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Proben zehn Sekunden gevortext und mit jeweils 2 ml PBS/0,5% Albumin und 0,1% Natriumazid gewaschen. Die Proben wurden nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Im Anschluss wurde den Proben 300 µl Fixierlösung zugegeben. Die vorläufige Lagerung bis zur Messung am Durchflusszytometer erfolgte bei 4°C.

Tabelle 5: Antikörper und BSB zur Färbung der Oberflächenmoleküle

Antikörper	Menge
CD3-BV510	8,75 µl
CD8-BV605	2,1875 µl
CD45RA-AF700	3,5 µl
CCR7-BV421	17,5 µl
CD27-PECy7	8,75 µl
CD28-FITC	8,75 µl
BSB	90,5625 µl

2.4.4 Bestimmung der absoluten Zellzahlen mittels Trucount Tubes

Die absolute Anzahl antigenspezifischer Zellen wurde durch sog. Trucount Tubes bestimmt. Diese enthalten eine bekannte Anzahl fluoreszierender Mikropartikel (Beads), die in der Durchflusszytometrie neben der Anzahl markierter Zellen erfasst werden. Mittels dieser Methode wurde zunächst die Anzahl aller CD8⁺ T-Zellen bestimmt, um dann die gemessenen prozentualen Anteile der antigenspezifischen Subpopulationen in absolute Werte umrechnen zu können.

Parallel zur Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern im FACS-Röhrchen (siehe 2.4.3) wurden je 100 µl heparinisiertes Blut in ein Trucount Tube (BD Trucount™, BD Bioscience, San Jose, USA) pipettiert und mit je 20 µl der Antikörpermischung (siehe Tabelle 5) versetzt, vorsichtig geschüttelt und ebenfalls für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden 900 µl der 1:10 verdünnten FACS Lysing Solution hinzugegeben und nochmals vorsichtig geschüttelt. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Proben bei 4°C gelagert. Auf das Waschen wurde verzichtet, um einen Verlust von Zellen zu vermeiden und eine möglichst exakte Messung der absoluten Zellzahl zu gewährleisten.

2.4.5 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ermöglicht die quantitative Messung von spezifischen Zellmerkmalen, wie Größe, Struktur und mittels Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellbestandteile. Jede Zelle wird einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das monochromatische Licht des Lasers wird gestreut und das dabei entstehende Streulicht und die entstehenden Floreszenzen detektiert. Um die Zellen einzeln messen zu können, wird die Zellsuspension langsam in einen schnelleren Hüllstrom suspendiert. Die laminare Strömung sorgt für eine hydrodynamische Fokussierung der Zellen, die sich hintereinander aufreihen. Die Zellen werden einzeln von einem Laserstrahl erfasst. Dabei entsteht Streulicht in alle Richtungen. Das Ausmaß des Vorwärtsstreulichts (engl.

Forwardscatter, FSC) ist annähernd proportional zur Zellgröße. Ein einstellbarer „Verdunkelungsbalken“ sorgt dafür, dass nur das Streulicht vom Detektor erfasst wird. Das Seitwärtsstreulicht (engl. Sidescatter, SSC) strahlt im rechten Winkel von der Zelle ab und wird beeinflusst von der Granularität, der Anzahl intrazellulärer Vesikel und der Beschaffenheit des Zellkerns. Die antikörpergekoppelten Fluoreszenzmoleküle ermöglichen die zellspezifische Charakterisierung. Sie werden durch den monochromen Laserstrahl angeregt und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Die Verwendung von Fluoreszenzmolekülen mit gleicher Anregungswellenlänge, deren maximales Emissionsspektrum bei unterschiedlichen Wellenlängen liegt, ermöglicht die simultane Messung verschiedener Zellmoleküle (Luttmann *et al.*, 2014).

Zur Erfassung der Emissionswellen werden Photodetektoren verwendet, hierbei handelt es sich um Photodioden und Photoelektronenvervielfacher (engl. Photomultiplier Tubes, PMTs). Jedes optische Signal, das von den Detektoren registriert wird, wird in einen Spannungsimpuls umgewandelt. Die analogen Impulse werden digitalisiert und über eine Software registriert. Für die Messungen wurde das Gerät LSRFortessa (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die erhobenen Daten wurden mit der Software BD FACSDiVA Version 8.0 ausgewertet.

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse werden Diagramme verwendet, in Form von Histogrammen oder zweidimensionalen Dot-Plots. Das sog. „Gating“ entspricht der Definition einer bestimmten Region im Diagramm und ermöglicht den Ausschluss unerwünschter Ereignisse, sowie die isolierte Betrachtung von Teilpopulationen (z.B. von Zellen, die CD8 exprimieren). Die Zielpopulation kann anhand typischer Charakteristika, wie Größe oder Fluoreszenz, ausgewählt werden. Mehrere hintereinandergeschaltete Gates ermöglichen die Darstellung einer Subpopulation. Die Gating-Strategie, mit der die Populationen der CMV- und influenzaspezifischen CD8⁺ T-Zellen identifiziert wurden, ist in Abbildung 2 dargestellt. Die weitere Differenzierung der T-Zellen in ihre Subpopulationen erfolgte mittels spezifischer immunologischer Marker wie unter 1.2.1 beschrieben.

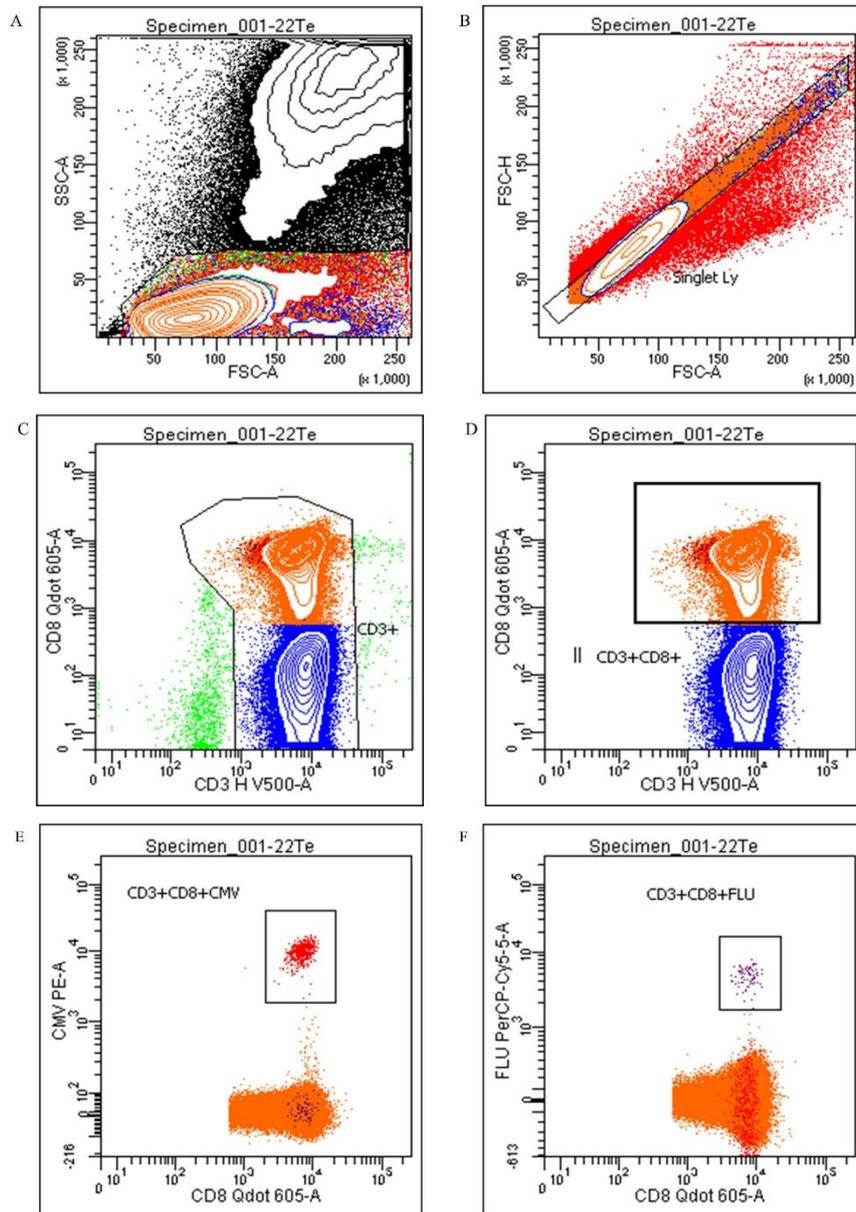


Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Mittels sog. Kontur-Diagrammen (engl. Contour plots) wird die dreidimensionale Verteilung der Zellen angezeigt. Hier ist eine exemplarische Darstellung der Gating-Strategie anhand der Daten einer Versuchsperson dargestellt.

A: Im ersten Schritt wurden die Lymphozyten anhand ihrer Streulichteigenschaften grob selektiert.

B: Im nächsten Schritt wurden Zellclustern und Zelltrümmern anhand des Verhältnisses von Höhe (FSC-H) zu Fläche (FSC-A) ausgeschlossen.

C: Im darauffolgenden Schritt wurden die Fluoreszenzintensitäten der mit CD3-BV510 markierten $CD3^+$ Zellen gegen die mit CD8-BV605 gefärbten $CD8^+$ Zellen dargestellt. Die $CD3^+$ Zellen wurden selektiert.

D: Anschließend erfolgte das Gating derjenigen Zellen, die Marker für CD3 und CD8 auf der Zelloberfläche hatten.

E/F: Im letzten Schritt wurden die mit den HLA-A*0201 Multimeren CMV/PE und FLU(Influenza)/Per-CPCy5.5 gefärbten CD3⁺ und CD8⁺-Zellen differenziert.

2.4.6 Bestimmung von Cortisol

Cortisol wurde für jeden der sechs Blutabnahmezeitpunkte während eines Experiments im Plasma bestimmt. Die Messung erfolgte aus 2,7 ml Lithium-Heparin Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) im Zentrallabor der Universität Tübingen mittels eines Immunoassays (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, USA). Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Variabilität betragen 5,5 nmol/l bzw. < 5,5%.

2.5 Statistische Auswertung

Die absoluten Zahlen für die Anzahl gemessener Zellen, die relativen Anteile an der Gesamtzahl zirkulierender CD8⁺ T-Zellen und die Cortisolkonzentration sind für jeden Messzeitpunkt als Mittelwert plus oder minus Standardfehler (engl. Standard error of the mean, SEM) dargestellt.

Es wurden Varianzanalysen (engl. Analysis of variance, ANOVA) für die absolute Anzahl zirkulierender T-Zellen der einzelnen antigenspezifischen Subpopulationen für den Faktor „Zeit“ berechnet. Dieser Faktor bezog sich auf die sechs Zeitpunkte der Messungen.

Zur Identifikation von signifikanten circadianen Rhythmen wurden mit dem Programm Chronolab® Cosinor-Analysen durchgeführt. Hierfür wird schrittweise mit der Methode der kleinsten Quadrate eine Cosinusfunktion mit einer Periode von 24 Stunden an die gemessenen Daten der Zeitreihen angepasst.

Mittels hierarchischer linearer Regressionsanalysen wurde die Korrelation zwischen dem circadianen Rhythmus der T-Zellen und den zeitlichen Veränderungen der Cortisolkonzentration berechnet. Die verschiedenen T-

Zellpopulationen wurden jeweils als abhängige Variable betrachtet, während die Cortisolkonzentration als Prädiktorvariable diente. Zudem wurde für den Faktor „Versuchsperson“ kontrolliert, um dafür zu korrigieren, dass mehrere Werte pro Versuchsperson in die Analyse eingebracht wurden.

Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen

Für die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen zeigte sich ein deutlich signifikanter circadianer Rhythmus, sowohl in der ANOVA als auch in der Cosinor-Analyse (jeweils $p < 0,001$, Tabelle 6). Die höchste Anzahl zirkulierender T-Zellen wurde um 22:00 Uhr und 2:00 Uhr gemessen. Nach einem starken morgendlichen Abfall um 28% wurden um 10:00 Uhr die niedrigsten Werte erreicht. Bei den folgenden beiden Messungen stieg die Zellzahl wieder an (siehe Abbildung 3).

Tabelle 6: Ergebnisse der ANOVA und der Cosinor-Analysen für die absolute Anzahl zirkulierender antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen und ihre Subpopulationen

ANOVA: Analysis of Variance (Varianzanalyse)

Mesor: Durchschnittswert über 24 Stunden (Zellen/ μ l)

Amplitude: Abweichung der minimalen und maximalen Werte vom Mesor

Acrophase: Uhrzeit des über die Cosinor-Analyse berechneten circadianen Maximums

n.s. steht für nicht signifikant

	<u>ANOVA</u>	<u>Cosinor-Analyse</u>			
	p-Wert	Mesor	Amplitude	Acrophase	p-Wert
CD8 ⁺ T-Zellen/ μ l	< 0,001	560,16 ± 64,18	98,18	00:35 Uhr	< 0,001
influenzaspezifische CD8 ⁺ T-Zellen	< 0,001	1,10 ± 0,32	0,27	00:58 Uhr	0,042
naive Zellen	0,020	0,08 ± 0,02	0,02	22:56 Uhr	0,005
zentrale Gedächtniszellen	0,028	0,08 ± 0,02	0,03	00:13 Uhr	0,053
Effektor-Gedächtniszellen	< 0,001	0,64 ± 0,24	0,15	01:05 Uhr	0,086
Effektorzellen	0,001	0,29 ± 0,08	0,08	01:31 Uhr	0,098
CMV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen	0,183	-	-	-	0,282
naive Zellen	0,569	-	-	-	0,550
zentrale Gedächtniszellen	0,234	-	-	-	0,116
Effektor-Gedächtniszellen	0,227	-	-	-	0,054
Effektorzellen	0,263	-	-	-	0,569

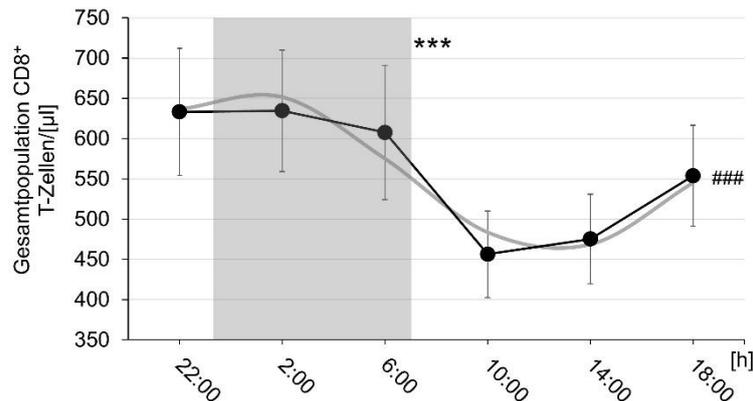


Abbildung 3: Circadianer Verlauf der Gesamtpopulation zirkulierender CD8⁺ T-Zellen

Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl zirkulierender CD8⁺ T-Zellen, dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Unter Schlaflaborbedingungen wurde 11 Versuchspersonen alle vier Stunden peripheren venöses Blut entnommen. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern. Die graue Linie zeigt die angepasste Cosinorkurve. Der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Zeitraum, in dem die Versuchspersonen im Bett lagen und schlafen durften. *** $p < 0,001$ für ANOVA; ### $p < 0,001$ für Cosinor-Analyse.

3.2 Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen

Die beiden untersuchten Gruppen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen unterschieden sich stark in der absoluten Anzahl zirkulierender Zellen. Diese war für influenza-spezifische CD8⁺ T-Zellen wesentlich geringer als für CMV-spezifische T-Zellen. Gleichmaßen war der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation geringer. Abbildung 4 zeigt repräsentativ das Ergebnis der Durchflusszytometrie einer Versuchsperson.

3 Ergebnisse

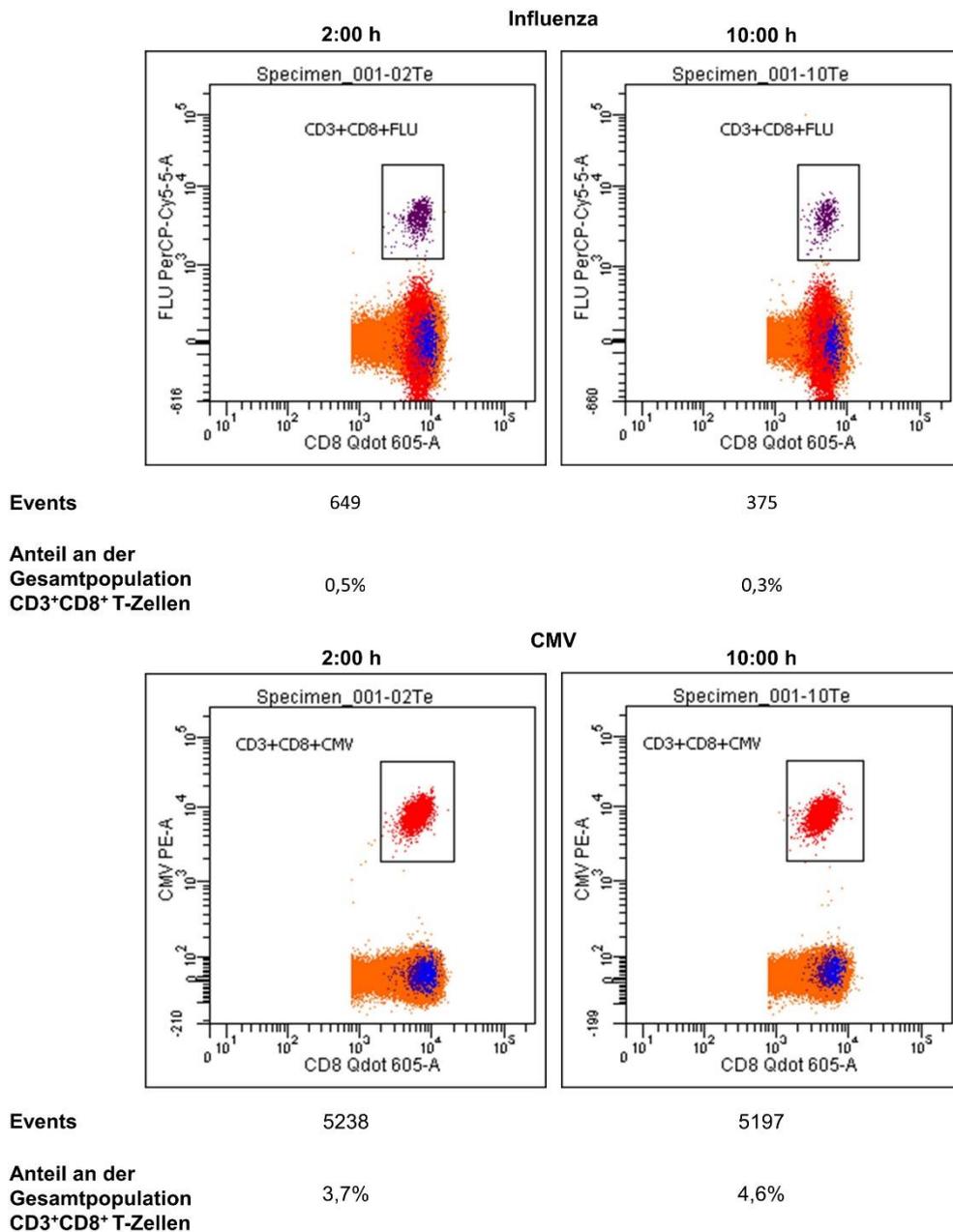


Abbildung 4: Repräsentatives Beispiel für den circadianen Rhythmus der virusspezifischen CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen

Die Abbildung zeigt exemplarisch die in der Durchflusszytometrie gemessenen Werte einer Versuchsperson für CMV- und influenzaspezifische CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen um 2:00 Uhr und 10:00 Uhr. Gegeneinander aufgetragen sind die Fluoreszenzparameter aller Zellen, die mit CD8-BV605 und mit HLA-A*0201 Multimeren CMV/PE oder FLU(Influenza)/Per-CPCy5.5 markiert wurden. Des Weiteren sind die gemessenen Zellzahlen (events) und der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen angegeben. Influenzaspezifische T-Zellen fielen zwischen 2:00 Uhr und 10:00 Uhr sowohl in ihrer absoluten Zellzahl als auch als Anteil an der Gesamtpopulation ab. Die absolute Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen zeigte zwischen 2:00 Uhr und 10:00 Uhr deskriptiv einen leichten Rückgang. Im prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen stiegen CMV-spezifische Zellen deutlich an.

Influenzaspezifische CD8⁺ T-Zellen präsentierten einen signifikanten circadianen Rhythmus (ANOVA: $p < 0,001$, Cosinor-Analyse: $p = 0,042$, siehe Tabelle 6 und Abbildung 5). Dieser folgte dem Rhythmus der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen mit hohen nächtlichen Werten und einem Maximum um 2:00 Uhr. Zum Morgen hin fiel die Anzahl deutlich um 38% ab und erreichte um 10:00 Uhr ihr Minimum, bevor sie im weiteren Verlauf wieder anstieg. Bei Betrachtung des relativen Anteils influenzaspezifischer CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen zeigte sich gleichfalls ein signifikanter circadianer Rhythmus (ANOVA: $p < 0,001$, Cosinor-Analyse: $p = 0,010$). Um 2:00 Uhr wurde mit einem Mittelwert von $0,23\% \pm 0,05\%$ der höchste Anteil gemessen. Dieser fiel zum nächsten Messzeitpunkt ab und erreichte in den beiden folgenden Messungen um 10:00 Uhr ($0,17\% \pm 0,04\%$) und 14:00 Uhr ($0,17\% \pm 0,05\%$) minimale Werte.

Im Gegensatz dazu folgte die absolute Anzahl zirkulierender CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen keinem signifikanten Rhythmus im Tagesverlauf (ANOVA: $p = 0,183$, Cosinor-Analyse: $p = 0,282$, siehe Tabelle 6 und Abbildung 6). Für den prozentualen Anteil der CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ließ sich über die ANOVA kein signifikanter Zeiteffekt nachweisen ($p = 0,137$), allerdings zeigte die Cosinor-Analyse einen signifikanten circadianen Rhythmus an ($p = 0,017$). Dieser wies im Vergleich zur Gesamtpopulation einen umgekehrten Verlauf auf mit dem niedrigsten Anteil von $1,07\% \pm 0,35\%$ um 2:00 Uhr. Im Verlauf stieg der Anteil an und erreichte um 10:00 Uhr und 14:00 Uhr ein Maximum von jeweils $1,41\% \pm 0,40\%$.

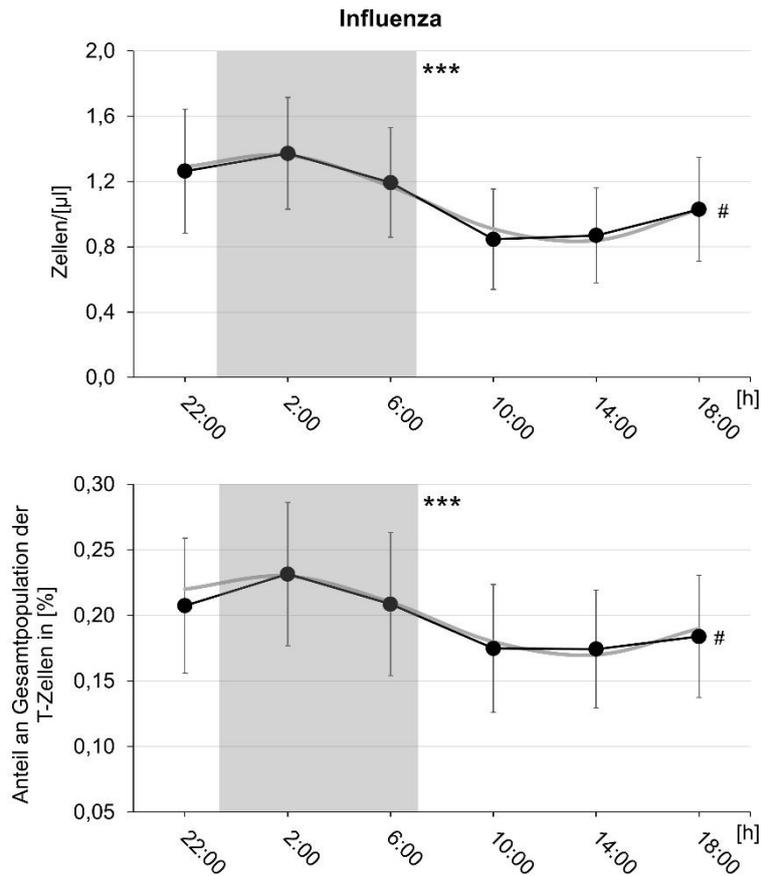


Abbildung 5: Circadianer Verlauf der absoluten Zellzahlen und prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation zirkulierender influenzaspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Mittelwert ± SEM für Gesamtzahl (oben) und prozentualen Anteil (unten) influenzaspezifischer CD8⁺ T-Zellen (n = 8). Die grauen Linien zeigen die angepassten Cosinorkurven. Der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Zeitraum, in dem die Versuchspersonen im Bett lagen und schlafen durften. *** p < 0,001 für ANOVA; # p < 0,05 für Cosinor-Analysen.

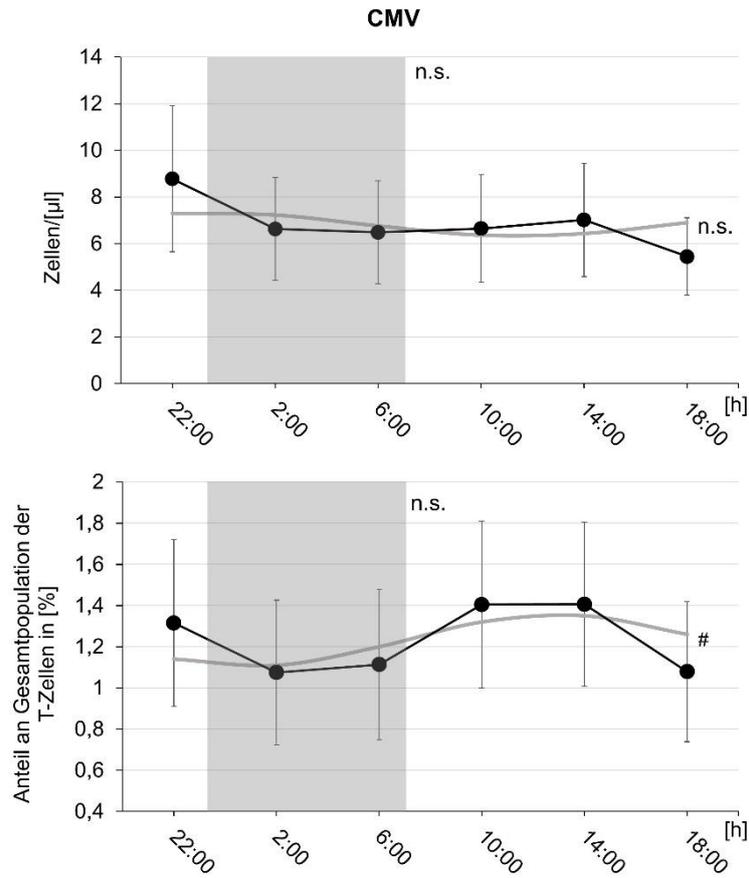


Abbildung 6: Circadianer Verlauf der absoluten Zellzahlen und prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation zirkulierender CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Mittelwert \pm SEM für Gesamtzahl (oben) und prozentualen Anteil (unten) CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (n = 11). Die grauen Linien zeigen die angepassten Cosinorkurven. Der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Zeitraum, in dem die Versuchspersonen im Bett lagen und schlafen durften. # p < 0,05 für Cosinor-Analysen; n.s.: nicht signifikant.

3.3 Subpopulationen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

3.3.1 Prozentuale Verteilung

CD8⁺ T-Zellen wurden anhand von Oberflächenmarkern (siehe Tabelle 1) weiter unterteilt in naive Zellen (CD45RA⁺, CCR7⁺), zentrale Gedächtniszellen (CD45RA⁻, CCR7⁺), Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻, CCR7⁻) und Effektorzellen (CD45RA⁺, CCR7⁻). Für die beiden untersuchten Gruppen virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen fanden sich Unterschiede im Anteil der einzelnen Subpopulationen. Die anteilmäßige Verteilung blieb in beiden virusspezifischen Zellgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant, weshalb hier exemplarisch die Werte für 14:00 Uhr präsentiert werden (siehe Abbildung 7).

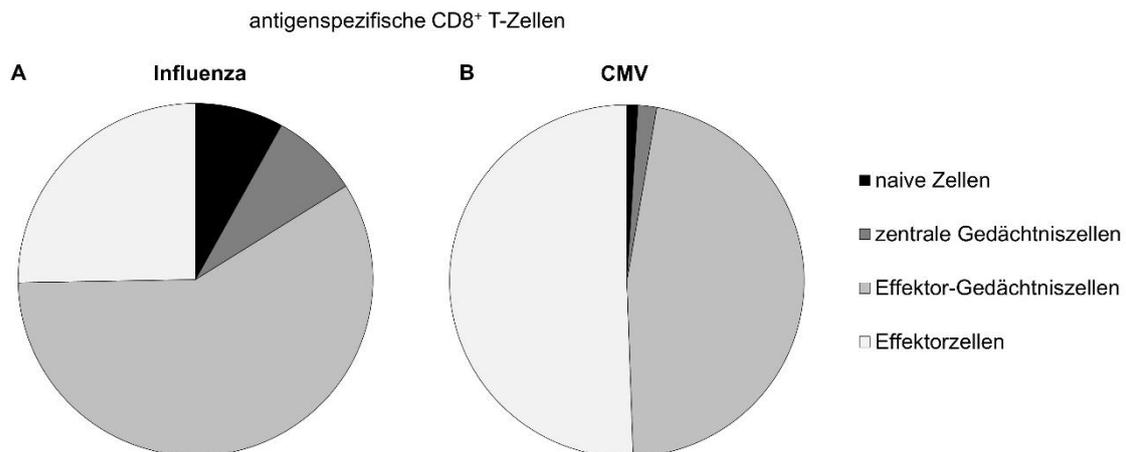


Abbildung 7: Anteilmäßige Verteilung der Subpopulationen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Die Kreisdiagramme zeigen den durchschnittlichen Anteil von naiven Zellen (CD45RA⁺, CCR7⁺), zentralen Gedächtniszellen (CD45RA⁻, CCR7⁺), Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻, CCR7⁻) und Effektorzellen (CD45RA⁺, CCR7⁻) für influenzaspezifische (A, n = 8) und CMV-spezifische (B, n = 11) CD8⁺ T-Zellen. Die Messung der Anzahl virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen erfolgte mittels Tetramer-Färbung. Präsentiert werden hier exemplarisch die Werte für 14:00 Uhr (im Tagesverlauf traten keine starken Variationen in der anteilmäßigen Verteilung auf).

Unter den influenzaspezifischen CD8⁺ T-Zellen bildeten Effektor-Gedächtniszellen mit 59% den größten Anteil. Mit 25% waren ein Viertel der

Zellen Effektorzellen. Jeweils 8% entfielen auf zentrale Gedächtniszellen und naive Zellen.

Eine andere Verteilung ergab sich für die CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Hier hatten Effektorzellen mit 50% und Effektor-Gedächtniszellen mit 47% die größten Anteile. Zentrale Gedächtniszellen waren mit 2%, genauso wie naive Zellen mit 1%, nur in geringem Maße vorhanden.

3.3.2 Circadianer Verlauf

Naive influenzaspezifische CD8⁺ T-Zellen zeigten einen deutlich signifikanten Rhythmus, sowohl in der ANOVA als auch mittels Cosinor-Analyse (siehe Tabelle 6 und Abbildung 8). Für die drei weiteren Subpopulationen konnten mittels ANOVA ebenfalls signifikante Rhythmen über die Zeit nachgewiesen werden, während in den Cosinor-Analysen ein statistischer Trend erkennbar war (Tabelle 6, Abbildung, 8).

Alle influenzaspezifischen Subpopulationen wiesen dabei einen ähnlichen Verlauf auf, mit den höchsten gemessenen Werten abends beziehungsweise nachts. Maximale Werte wurden für naive Zellen und zentrale Gedächtniszellen um 22:00 Uhr gemessen, für Effektor-Gedächtniszellen und Effektorzellen um 2:00 Uhr. Im weiteren Verlauf fielen die Zellzahlen ab und erreichten bei allen vier Subpopulationen um 10:00 Uhr und 14:00 Uhr die niedrigsten Werte. Tabelle 7 zeigt den prozentualen Abfall der Anzahl zirkulierender Zellen. Den stärksten Abfall zeigten zentrale Gedächtniszellen mit 55%, etwas geringer für Effektorzellen mit 44% und naiven Zellen mit 40%. Die geringste Abnahme in der Anzahl zirkulierender CD8⁺ T-Zellen demonstrierten Effektor-Gedächtniszellen mit 34%. Für naive Zellen und zentrale Gedächtniszellen stieg die Anzahl bereits bei der darauffolgenden Messung wieder an, während sie für Effektor-Gedächtniszellen und Effektorzellen noch konstant auf dem niedrigsten Wert blieb und erst ab 18:00 Uhr wieder anstieg (Abbildung 8).

Für alle vier Subpopulationen CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ließen sich mittels ANOVA keine signifikanten Veränderungen über die Zeit nachweisen.

Damit folgen sie dem bereits berichteten Ergebnis aller CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Die Ergebnisse der Cosinor-Analysen zeigten für die einzelnen Subpopulationen ebenfalls keine signifikanten circadianen Veränderungen. Für Effektor-Gedächtniszellen wurde allerdings ein statistischer Trend ($p = 0,054$, siehe Tabelle 6) gefunden.

Bezogen auf die relativen Anteile konnte mittels Cosinor-Analysen für keine Subpopulation der CMV- und influenzaspezifischen CD8⁺ T-Zellen ein signifikanter circadianer Rhythmus nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Charakteristika der Subpopulationen

n.s. steht für nicht signifikant; für die Regressionen (Korrelation mit Cortisol) ist der standardisierte Betakoeffizient angegeben; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

		<u>antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen</u>			
		naive Zellen	zentrale Gedächtniszellen	Effektor-Gedächtniszellen	Effektorzellen
Abfall von maximaler zu minimaler Zellzahl	Influenza	40%	55%	35%	44%
	CMV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Korrelation mit Cortisol	Influenza	-0,249**	-0,334**	-0,174***	-0,248***
	CMV	n. s	n.s.	n.s.	n.s.

3 Ergebnisse

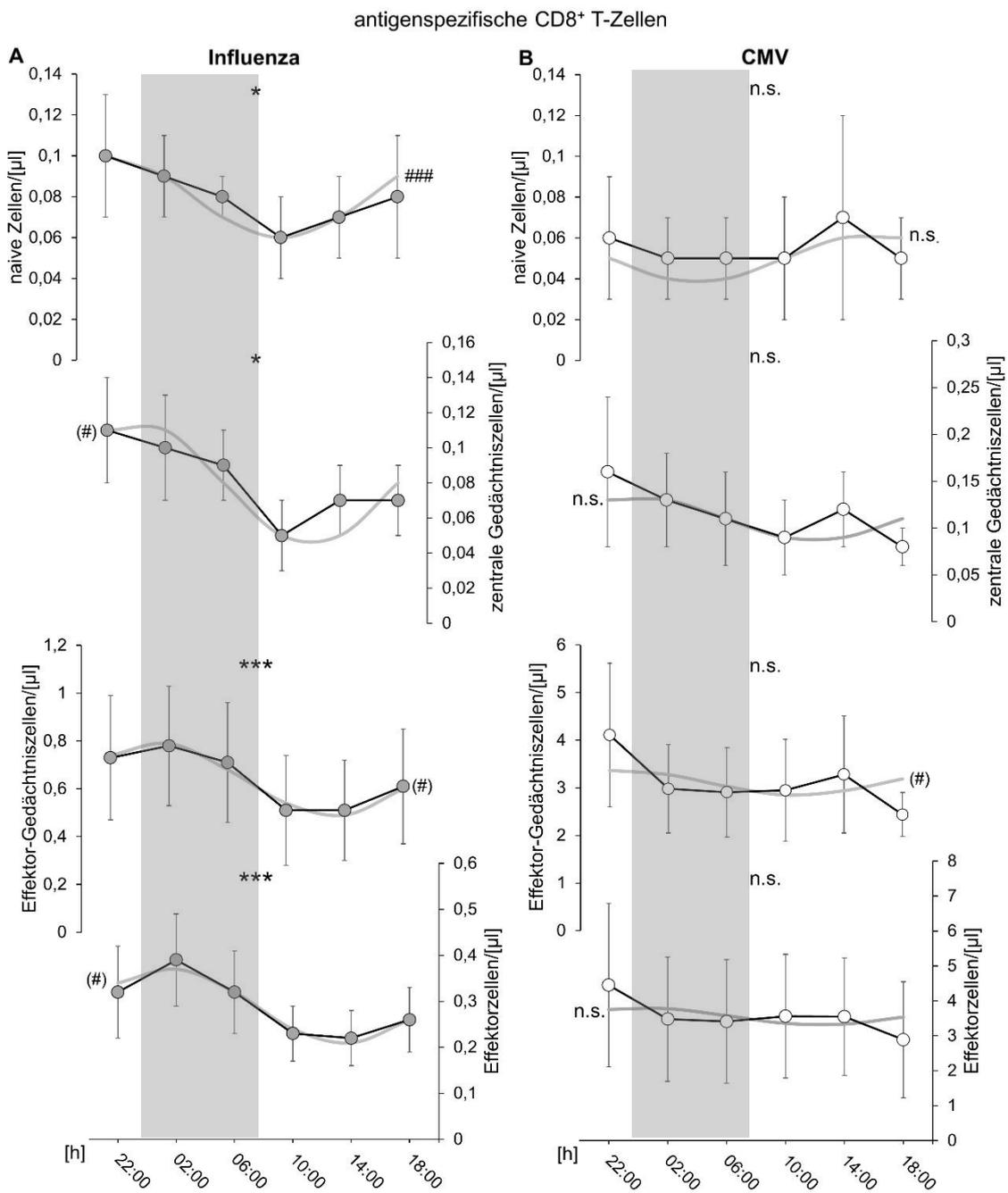


Abbildung 8: Circadianer Verlauf der absoluten Zellzahlen für die Subpopulationen zirkulierender virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Mittelwert \pm SEM von naiven Zellen (CD45RA⁺, CCR7⁺), zentralen Gedächtniszellen (CD45RA⁻, CCR7⁺), Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻, CCR7⁻) und Effektorzellen (CD45RA⁺, CCR7⁻) für influenzaspezifische (A, n = 8) und CMV-spezifische (B, n = 11) CD8⁺ T-Zellen. Der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Zeitraum, in dem die Versuchspersonen im Bett lagen und schlafen durften. *** p < 0,001, * p < 0,05 für ANOVA; ### p < 0,001, (#) p < 0,1 für Cosinor-Analysen; n.s.: nicht signifikant.

3.4 Korrelation mit Cortisol

Die im Plasma gemessenen Cortisolwerte zeigten den typischen circadianen Verlauf. Der niedrigste Wert von durchschnittlich $71,0 \text{ nmol/l} \pm 14,28 \text{ nmol/l}$ wurde um 2:00 Uhr gemessen. Nach einem morgendlichen Anstieg, mit maximalem Wert von $417,45 \text{ nmol/l} \pm 40,88 \text{ nmol/l}$ gemessen um 10:00 Uhr, fielen die Werte im weiteren Tagesverlauf kontinuierlich ab (siehe Abbildung 9).

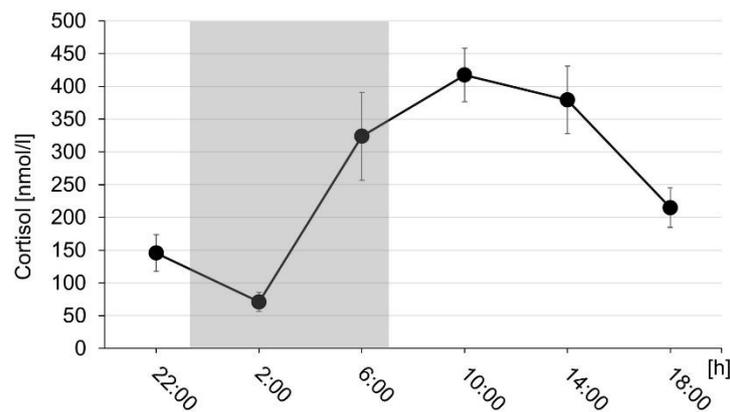


Abbildung 9: Circadiane Veränderung der Cortisolkonzentration

Mittelwert \pm SEM der Cortisolkonzentration im Plasma. Diese wurde alle vier Stunden im peripheren venösen Blut gemessen. Der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Zeitraum, in dem die Versuchspersonen im Bett lagen und schlafen durften.

Zwischen Cortisol und der Gesamtpopulation an CD8^+ T-Zellen zeigte sich eine ausgeprägte negative Korrelation ($\beta = -0,314$, $p < 0,001$). Je höher die Hormonkonzentration, desto niedriger war die Zahl im Blut zirkulierender CD8^+ T-Zellen. Ein signifikanter, wenngleich geringer ausfallender Zusammenhang zeigte sich zwischen Cortisol und der Gesamtpopulation influenzaspezifischer CD8^+ T-Zellen ($\beta = -0,227$, $p < 0,001$). Diese negative Korrelation konnte für alle influenzaspezifischen Subpopulationen bestätigt werden (siehe Tabelle 7). Am stärksten war diese bei zentralen Gedächtniszellen ($\beta = -0,334$, $p = 0,002$) ausgeprägt, etwas geringer bei naiven Zellen ($\beta = -0,249$, $p = 0,001$) und Effektorzellen ($\beta = -0,248$, $p < 0,001$). Den geringsten Einfluss hatte Cortisol auf die Anzahl der Effektor-Gedächtniszellen ($\beta = -0,174$, $p < 0,001$). Zwischen der Hormonkonzentration und CMV-spezifischen CD8^+ T-Zellen konnte keine

signifikante Korrelation nachgewiesen werden, weder für die Gesamtpopulation, noch für die Subpopulationen.

4 Diskussion

Die von uns erhobenen Daten bestätigen circadiane Veränderungen in der Anzahl zirkulierender CD8⁺ T-Zellen, die für Zellgruppen, welche unterschiedliche Viren erkennen, unterschiedlich ausfallen. Während influenzaspezifische T-Zellen weitestgehend dem Rhythmus der Gesamtpopulation an CD8⁺ T-Zellen folgten, präsentierte die absolute Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen keine klare Rhythmik. Deren relativer Anteil beschrieb sogar einen entgegengesetzten Verlauf mit maximalen Werten am Tag. Je nach Antigenpezifität unterschieden sich zudem die Aufteilungen der CD8⁺ T-Zellen auf die einzelnen Subpopulationen. Alle influenzaspezifischen Subpopulationen zeigten signifikante Änderungen über die Zeit. Unter den Subpopulationen CMV-spezifischer T-Zellen wiesen hingegen nur Effektor-Gedächtniszellen einen Trend zu einem circadianen Rhythmus auf. Die Daten belegen zwischen Cortisol und der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen eine negative Korrelation. Gleiches gilt für influenzaspezifische T-Zellen. Kein Zusammenhang bestand hingegen zwischen der Hormonkonzentration und CMV-spezifischen T-Zellen.

4.1 Unterschiede der antigenspezifischen Gesamtpopulationen

4.1.1 Absolute Anzahl

Die beiden Gesamtpopulationen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen wiesen den erwarteten Unterschied in der absoluten Anzahl an Zellen auf. Die Anzahl influenzaspezifischer T-Zellen war geringer als die der CMV-spezifischen T-Zellen und ihr Anteil an allen CD8⁺ T-Zellen betrug im Mittel 0,23% (maximaler Wert über den Tagesverlauf). Dies stimmt in der Größenordnung mit He *et al.* (2003) überein. Die Menge CMV-spezifischer T-Zellen war um ein Vielfaches größer. Deren Anteil an der Gesamtpopulation betrug im Mittel bis zu 1,41%. Gamadia *et al.* (2001) und Tussey *et al.* (2003) beschreiben vergleichbare Werte. Andere Studien hingegen fanden bis zu 10% CMV-spezifische T-Zellen

ohne Hinweise auf eine klinische Erkrankung (Lachmann *et al.*, 2012; Sylwester *et al.*, 2005). Die Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf dem höheren Altersspektrum der Versuchspersonen. In Einzelfällen wurden bei Älteren sogar bis zu 23%, meist oligoklonale CMV-spezifische T-Zellen gemessen (Khan *et al.*, 2002). Es liegt nahe, dass sich diese große antigenspezifische Zellpopulation über die Jahre durch die periodisch auftretenden Reaktivierungen der latenten Infektion und die damit einhergehenden wiederholten Antigenexpositionen entwickelt (Gillespie *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde bei CMV-Trägern eine insgesamt erhöhte Anzahl an CD8⁺ T-Zellen festgestellt (Gratama *et al.*, 1987; van Leeuwen *et al.*, 2006; Waller *et al.*, 2008).

Im Latenzstadium besteht eine Balance zwischen Virus und Immunantwort. Durch Immunsuppression, Entzündung, Infektion oder während der Reaktivierung anderer Herpesviren könnte diese gestört werden (Gillespie *et al.*, 2000). Kommt es zum Verlust der Immunkontrolle durch T-Zellen, besteht das erhöhte Risiko einer Reaktivierung, weil die virale Replikation nicht mehr ausreichend limitiert werden kann (Goodrum *et al.*, 2012; Griffiths *et al.*, 2015). Eine isolierte Reaktivierung tritt intermittierend auch bei Gesunden auf, wird allerdings durch die T-Zellantwort eingeschränkt und verursacht keine klinischen Symptome (Goodrum *et al.*, 2012). Stress gilt als ein möglicher Auslöser (Toro and Ossa, 1996). Um der vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen, hat CMV zahlreiche Strategien entwickelt. Unter anderem schmälert das Virus die Fähigkeit dendritischer Zellen stimulierend auf andere Zellen des Immunsystems einzuwirken und verringert über eine reduzierte Expression von MHC-I die Präsentation viraler Peptide gegenüber T-Zellen (Barnes and Grundy, 1992; Benz *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2015; Grigoleit *et al.*, 2002).

4.1.2 Circadianer Verlauf

Die Rezirkulation ist ein komplexer Prozess. Er ermöglicht Lymphozyten auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen über den Blutkreislauf in lymphatische

Organe oder peripheres Gewebe zu wandern und dort mit anderen Zellen in Kontakt zu treten (Mazzocchi *et al.*, 2011b). T-Zellen benötigen diese Fähigkeit unter anderem, um ihre Effektorfunktion ausüben zu können und damit einen zentralen Beitrag in der Erregerabwehr zu leisten (Baaten *et al.*, 2013). Das Wanderungsverhalten steht unter dem Einfluss des circadianen Systems (Scheiermann *et al.*, 2013). Dies manifestiert sich in einer signifikanten Veränderung der Gesamtpopulation zirkulierender CD8⁺ T-Zellen über den Tag, die bereits in mehreren Studien nachgewiesen wurde (Ackermann *et al.*, 2012; Besedovsky *et al.*, 2016; Born *et al.*, 1997; Dimitrov *et al.*, 2009; Kirsch *et al.*, 2012). Unsere Daten belegen den erwarteten circadianen Rhythmus mit einem nächtlichen Maximum und bis zu einem Viertel niedrigeren Werten tagsüber. Welchem Zweck diese circadiane Dynamik dient, ist bisher weitestgehend unbekannt. Es bestehen Anhaltspunkte dafür, dass sich die adaptive Immunantwort mit Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses vorzugsweise nachts entwickelt. Dies wird vermutlich durch die spezielle Hormonkonstellation zu dieser Tageszeit, die notwendige proinflammatorische Prozesse ermöglicht, begünstigt (Dimitrov *et al.*, 2007, 2009; Geiger *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse der Cosinor-Analyse belegen erstmals ein unterschiedliches Verhalten antigenspezifischer Zellpopulationen. Während influenzaspezifische T-Zellen sowohl in der absoluten Anzahl als auch gemessen als Anteil an der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen einen signifikanten circadianen Rhythmus aufwiesen, zeigte nur der relative Anteil CMV-spezifischer T-Zellen eine signifikante Periodik. Dessen Verlauf war jedoch entgegengesetzt mit den höchsten Werten tagsüber und den niedrigsten Werten nachts. Vergleicht man die einzelnen Rhythmen, folgten die influenzaspezifischen T-Zellen dem Verhalten aller CD8⁺ T-Zellen. Die T-Zellen, die sich auf CMV spezialisiert haben, wichen deutlich davon ab. Über die Mechanismen, die zur Entstehung dieses abweichenden Verhaltens führen, kann bislang nur spekuliert werden. Einen Erklärungsansatz bietet der unterschiedliche Infektionsverlauf der beiden untersuchten viralen Erreger.

Möglicherweise sind gewebsständige T-Zellen bei der akuten Abwehr des Influenzavirus von größerer Bedeutung als zirkulierende T-Zellen. Der Organismus kommt vermutlich in der aktiven Tagesphase vermehrt in Kontakt mit dem Erreger. Gleichzeitig ist tagsüber die Anzahl influenzaspezifischer T-Zellen im Blut am niedrigsten. Ursächlich hierfür könnte die Einwanderung der Zellen in die Lunge sein. In diesem Organ konnten residierende influenzaspezifische T-Zellen bisher vorwiegend nachgewiesen werden (Bree *et al.*, 2005; Hogan *et al.*, 2001). Damit befinden sich die virusspezifischen T-Zellen direkt am Infektionsort, an dem die unmittelbare Immunabwehr der Influenzaviren stattfindet. Inwiefern die Anzahl der in dieser Studie gemessenen zirkulierenden T-Zellen das lokale Geschehen am Infektionsort widerspiegeln, ist nicht bekannt. Die Abwanderung aus dem Blut ins Gewebe könnte eine Erklärung für den circadianen Rhythmus der Gesamtpopulation zirkulierender influenzaspezifischer T-Zellen sein.

CMV verursacht nach der Primärinfektion eine latent persistierende Infektion, mit der sich der Organismus ein Leben lang auseinandersetzen muss. Man könnte demzufolge annehmen, dass CMV-spezifische T-Zellen, die eine zentrale Rolle in der Immunabwehr gegen das Virus spielen (Gillespie *et al.*, 2000), bei einer permanent möglichen Konfrontation keinen circadianen Rhythmus entwickeln. In Messungen, die über ein halbes Jahr alle zwei Wochen in Urin, Speichel und Blut gesunder CMV Träger durchgeführt wurden, konnte das Virus in einer Mehrheit der Proben festgestellt werden. Die Ergebnisse der Studie belegen eine intermittierende Reaktivierung von CMV, da sich das Virus bei allen Versuchspersonen nachweisen ließ, aber keine Versuchsperson über den gesamten Zeitraum ausschließlich positive Virusnachweise hatte (Toro and Ossa, 1996). Allerdings wurden hier nicht mehrere Proben innerhalb eines Tages gewonnen, weshalb diese Studie keine Antwort darauf liefert, ob den Reaktivierungen des Virus ein tageszeitlicher Rhythmus zugrunde liegt. Shadan (2007) vermutet einen circadianen Rhythmus in der Replikation persistierender DNA-Viren. Er begründet dies mit der starken Abhängigkeit von der Wirtszelle, deren Zellzyklus vom circadianen System reguliert wird. Im Mausexperiment konnte nachgewiesen werden, dass die

Expression von CMV-Genen nachts, also während der aktiven Tageszeit der Mäuse, am höchsten war (Collaco *et al.*, 2005; Sigworth *et al.*, 2003). Demzufolge könnte man spekulieren, dass diese Genexpression beim Menschen vor allem tagsüber stattfindet. Unsere Daten belegen, dass in der Altersgruppe unserer Versuchspersonen (Durchschnittsalter 25,09 Jahre) kein ausgeprägter Rhythmus der absoluten Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen vorhanden ist. Allerdings zeigte die relative Zellzahl (gemessen an der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen) höchste Werte am Tag. Ob dieser relative Anstieg tagsüber mit der bislang nur im Tierexperiment gefundenen tageszeitlichen Rhythmik der CMV-Genexpression zusammenhängt, bleibt zu untersuchen.

4.2 Unterschiede der antigenspezifischen Subpopulationen

4.2.1 Prozentuale Verteilung

T-Zellen, die auf verschiedene Viren spezialisiert sind, weisen eine unterschiedliche Dominanz der Phänotypen auf (Appay *et al.*, 2002; Tussey *et al.*, 2003). Die Ursachen, die zur Ausprägung eines bestimmten Erscheinungsbildes führen, sind noch nicht bekannt. Es ist davon auszugehen, dass die ungleichen biologischen Eigenschaften der viralen Erreger ausschlaggebend sind, weil sie eine spezifische Anpassung der Immunantwort notwendig machen, um eine ausreichende Pathogenkontrolle gewährleisten zu können (Gratama *et al.*, 2008; van Lier *et al.*, 2003). Vermutet wird ein Einfluss der Antigenlast, des Infektionsverlaufs und wiederkehrende Infektionen mit dem gleichen Virus (Gamadia *et al.*, 2004). Konsequenzen könnten auch das Ausmaß der Kostimulation und beteiligte Zytokine haben (Gamadia *et al.*, 2004). Des Weiteren wird eine Bedeutung des Zelltyps, den ein Virus infiziert, angenommen (van Lier *et al.*, 2003).

Die uneinheitliche Nomenklatur und die Verwendung verschiedener charakteristischer Oberflächenmarker zur Einteilung der Subpopulationen erschweren den Vergleich der Studienergebnisse. Neben den in dieser Arbeit

verwendeten Oberflächenmolekülen CD45RA und CCR7 werden in zahlreichen Studien CD27 und CD28 zur Klassifikation der Subpopulationen verwendet. Diese beiden Proteine auf der Zelloberfläche von Lymphozyten dienen der Kostimulation und ermöglichen Aussagen über das Differenzierungsstadium, weil sie auf spätdifferenzierten Zellen nicht vorkommen (Appay *et al.*, 2002; Hamann *et al.*, 1997; van Leeuwen *et al.*, 2006). CD62L ermöglicht die Migration in sekundärlymphatisches Gewebe und wird gemeinsam mit CCR7 auf der Zelloberfläche exprimiert (Mahnke *et al.*, 2013), weshalb Resultate aus Arbeiten, in denen nur einer der beiden Marker verwendet wurde, im Großen und Ganzen vergleichbar sind.

Betrachtet man die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen ist die Anzahl der gemessenen Zellen für die vier Subpopulationen unterschiedlich groß. Die Mehrheit der CD8⁺ T-Zellen sind naive Zellen. Die Zellzahlen für Effektor-Gedächtniszellen, zentrale Gedächtniszellen und Effektorzellen nehmen in der genannten Reihenfolge ab (Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a, 2016; Dimitrov *et al.*, 2009).

Die gewonnenen Daten zeigen für influenzaspezifische T-Zellen eine andere prozentuale Verteilung. Effektor-Gedächtniszellen (59%) stellten den größten Anteil. Effektorzellen (25%) kamen häufiger vor als bei der Gesamtheit CD8⁺ T-Zellen. Naive Zellen (8%) und zentrale Gedächtniszellen (8%) bildeten die kleinsten Anteile. Einhergehend mit der Annahme, die meisten virusspezifischen T-Zellen persistieren als CD45RO⁺ (van Lier *et al.*, 2003), repräsentierten beide Formen der Gedächtniszellen gemeinsam 67% der influenzaspezifischen T-Zellen. Deren Anteil wurde mit 79% bereits höher berichtet, was in der anderen Gating-Strategie begründet sein könnte (Tussey *et al.*, 2003). Da Influenza eine weit verbreitete Infektion ist, kommen viele Menschen damit mehrfach in Kontakt. Dies könnte die ausgeprägte Population an Effektor-Gedächtniszellen erklären. Im Vergleich zu CMV tritt eine Antigenexposition jedoch seltener auf, die Antigenlast ist niedriger, womit die geringere Anzahl von Effektorzellen vereinbar wäre (Tussey *et al.*, 2003). Der ähnlich große Anteil zentraler Gedächtniszellen wie in der Gesamtpopulation

entspricht der Erwartung, dass influenzaspezifische T-Zellen einen eher fröhendifferenzierten Phänotyp aufweisen (Appay *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2007). Der deutlich geringere Anteil naiver Zellen und die große Gruppe der Effektor-Gedächtniszellen widerspricht dieser Annahme hingegen. Daraus lässt sich schließen, dass Zellen, die das Influenzavirus als ihr spezifisches Pathogen erkennen, vermutlich weiter differenziert sind als bisher angenommen. Ein großer Anteil influenzaspezifischer T-Zellen exprimiert CD27 (Gillespie *et al.*, 2000; He *et al.*, 2003). Der Oberflächenmarker lässt sich auf allen Subpopulationen nachweisen, außer auf terminal differenzierten Zellen (Appay *et al.*, 2008). Dieser Aspekt bekräftigt die Annahme, influenzaspezifische T-Zellen seien weniger differenziert als CMV-spezifische T-Zellen. Die vergleichsweise geringe Differenzierung könnte wiederum begründen, dass die Gesamtheit aller influenzaspezifischen T-Zellen einem circadianen Rhythmus folgt, der sich ähnlich verhält, wie der Rhythmus der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen.

Die prozentualen Anteile der Subpopulationen CMV-spezifischer T-Zellen wichen sowohl von denen der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen als auch von denen der influenzaspezifischen T-Zellen ab. Im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Zellgruppen bildeten Effektorzellen (50%) den größten Anteil. Den zweitgrößten Anteil stellten Effektor-Gedächtniszellen (47%). Die beiden Subpopulationen der zentralen Gedächtniszellen (2%) und naiven Zellen (1%) waren in noch geringerem Anteil vorhanden, als in der Gruppe influenzaspezifischer T-Zellen. Die Aufteilung stimmt weitestgehend überein mit Champagne *et al.* (2001), wenngleich die Anteile der zentralen Gedächtniszellen (5%) und der naiven Zellen (5%) in deren Arbeit höher ausfielen, der Anteil der Effektor-Gedächtniszellen (40%) hingegen etwas geringer. Obwohl die verschiedenen Gating-Strategien berücksichtigt werden müssen, zeigen bisherige Arbeiten mehrheitlich einen spätdifferenzierten Phänotyp der CMV-spezifischen T-Zellen (Appay *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2002; van Lier *et al.*, 2003; Waller *et al.*, 2008). Gamadia *et al.* (2001) beschreibt das hauptsächliche Auftreten von Effektorzellen und Gedächtniszellen. In weiteren Studien dominieren unter den Subpopulationen entweder Effektorzellen

(Gillespie *et al.*, 2000; Tussey *et al.*, 2003; van Lier *et al.*, 2003) oder Effektor-Gedächtniszellen (Khan *et al.*, 2002; Waller *et al.*, 2008). Bedenkt man die geringe Differenz im prozentualen Anteil beider Subpopulationen in der vorliegenden Arbeit, scheint dies erklärbar. Deren häufiges Vorkommen legt nahe, dass die adaptive Immunantwort eine rasche Effektorfunktion zur Kontrolle des Virus benötigt. Jede Reaktivierung verursacht eine weitere Antigenstimulation und eine sekundäre Immunantwort mit der Freisetzung entzündlicher Mediatoren (Tussey *et al.*, 2003). Die wiederkehrende Antigenexposition während der Latenz könnte antigenspezifische T-Zellen beeinflussen (van Lier *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass dies bei CMV häufiger geschieht als bei anderen latent persistierenden Viren und neben der großen Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen auch eine Erklärung für deren ausgeprägte Differenzierung ist (Khan *et al.*, 2004; Tussey *et al.*, 2003; O'Hara *et al.*, 2012). Effektorzellen sterben nach einer akuten Infektion meistens ab (Romero *et al.*, 2007). Die Größe dieser Subpopulation ist ein weiterer Aspekt, der eine häufige Konfrontation des Immunsystems mit dem Virus vermuten lässt. Ergänzend sei erwähnt, dass sich die Verteilung der Subpopulationen bei der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen im Laufe des Lebens verändert. Beispielsweise nimmt die Anzahl naiver Zellen ab (Li *et al.*, 2019). Eine latente CMV-Infektion scheint diese Veränderungen zu beeinflussen und einen Anstieg der Effektorzellen und Effektor-Gedächtniszellen im höheren Alter zu bewirken (Wertheimer *et al.*, 2014).

4.2.2 Circadianer Verlauf

Bisherige Studien, die CD8⁺ T-Zellen in Subpopulationen einteilten, konstatierten eine höhere Anzahl naiver Zellen, zentraler Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen in den Nachtstunden, die morgens abfiel. Effektorzellen waren hingegen nachts weniger zahlreich und stiegen am Tagesbeginn an (Ackermann *et al.*, 2012; Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a, 2016; Dimitrov *et al.*, 2009). Die Subpopulationen der beiden Gruppen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen, die in dieser Arbeit gemessen wurden, zeigten unterschiedliche circadiane Verläufe.

Die influenzaspezifischen Subpopulationen präsentierten nachts circa zwischen 22:00 Uhr und 2:00 Uhr maximale Werte. Die Ergebnisse der Varianzanalyse bestätigten für alle Subpopulationen signifikante Veränderungen über die Zeit. In der Cosinor-Analyse zeigte sich hingegen nur für naive Zellen ein signifikanter circadianer Rhythmus. Dies bekräftigt andere Studien, die für alle CD8⁺ T-Zellen bei den naiven Zellen morgens den stärksten Abfall sahen (Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a, 2016; Dimitrov *et al.*, 2009). Für die drei weiteren Subpopulationen bestand ein Trend zur Signifikanz. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden statistischen Methoden (Varianzanalyse versus Cosinor-Analyse) könnten damit zusammenhängen, dass die Anzahl der T-Zellen sich zwar über die Zeit verändert, aber nicht exakt in einem 24-stündigen Rhythmus. Außerdem lässt sich kritisch anmerken, dass die fehlende statistische Signifikanz der Trendwerte teils der geringen Studiengröße geschuldet sein mag. Eine Erweiterung der Ergebnisse auf größere Studienpopulationen wäre wünschenswert. Die Differenzierung von T-Zellen anhand antigenspezifischer HLA-A2-Multimere ist ein etabliertes Vorgehen. Aufgrund der methodenspezifischen Einschränkung auf HLA-A2 Träger wäre jedoch das Screening einer sehr großen Personenzahl notwendig. Für die vorliegende Studie wurden 99 Personen gescreent, von denen lediglich 16% HLA-A2 Träger mit einer ausreichenden Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen waren, was die geringe Versuchspersonenzahl der vorliegenden Studie erklärt.

In dieser Studie folgten die influenzaspezifischen Effektorzellen dem gleichen Rhythmus wie die anderen Subpopulationen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen zur Gesamtpopulation an CD8⁺ Effektor-T-Zellen, die eine maximale Anzahl am Tag aufweisen (Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a; Dimitrov *et al.*, 2009). Als ursächlich für den selektiven Anstieg der Effektorzellen gilt Adrenalin (Dimitrov *et al.*, 2009, 2010). Es besteht die Vermutung, dass Zellen mit einer zytotoxischen Effektorfunktion hauptsächlich tagsüber mobilisiert werden, wenn die Antigenexposition höher ist (Besedovsky *et al.*, 2016; Geiger *et al.*, 2015). Dies würde einer evolutionär bedingten Anpassung der adaptiven Immunantwort entsprechen, um während des vorwiegenden Eindringens von Erregern in der aktiven Phase einen sofortigen Schutz zu gewährleisten.

(Cermakian *et al.*, 2013; Scheiermann *et al.*, 2013). Über die zugrundeliegenden Ursachen für das andersartige Verhalten influenzaspezifischer Effektorzellen kann nur spekuliert werden. Möglicherweise entspricht der morgendliche Abfall dieser Zellgruppe im Blut einer vermehrten Einwanderung in die Lunge, womit sie im Falle eines verstärkten Antigenkontakts tagsüber vermehrt am Hauptinfektionsort verfügbar wären.

Für das circadiane Verhalten von naiven Zellen und zentralen Gedächtniszellen bestehen theoretische Erklärungsansätze. Möglicherweise migrieren die T-Zellen dieser beiden Gruppen tagsüber ins Knochenmark, um dort Überlebenssignale zu erhalten und in einem Ruhezustand gehalten zu werden, wie es bereits für hämatopoetische Stammzellen beschrieben wurde (Benvenuto *et al.*, 2007). Dies könnte als vorübergehende Eindämmung der wenig differenzierten Anteile der erworbenen Immunabwehr interpretiert werden (Lange *et al.*, 2010). Möglich wäre auch eine regulatorische Beteiligung an der Hämatopoese (Mazo *et al.*, 2005). Mehrere Aspekte sprechen dafür, dass die Migration in lymphatisches Gewebe und die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen nachts im Schlaf stattfinden (Besedovsky *et al.*, 2019; Cermakian *et al.*, 2013; Haus and Smolensky, 1999; Lange *et al.*, 2010). Die nächtliche Freisetzung naiver T-Zellen aus dem Knochenmark mag daher das Einwandern der Zellen in sekundärlymphatische Gewebe erleichtern, um dort die Entstehung der adaptiven Immunantwort zu initiieren (Dimitrov *et al.*, 2009; Mazzocchi *et al.*, 2011b).

Keine Subpopulation CMV-spezifischer T-Zellen hatte einen nachweisbaren signifikanten Rhythmus. Dies bestärkt die Hypothese, dass für CMV der circadiane Rhythmus der Immunabwehr eine untergeordnete Rolle spielt, weil die latente Infektion über den gesamten Tag im Organismus vorhanden ist und sich somit möglicherweise evolutionär bedingt kein spezieller Rhythmus ausgebildet hat. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch, dass die Cosinor-Analyse für Effektor-Gedächtniszellen einen Trend zur Signifikanz ergab. Davon ausgehend, dass CMV insbesondere Endothelzellen und Leukozyten infiziert (Sinzger *et al.*, 1995; Gerna *et al.*, 2019), könnte die Anzahl zirkulierender

CMV-spezifischer Effektor-Gedächtniszellen in der Virusbekämpfung besonders relevant sein, weil die Zellen direkt im Blut ihre Effektorfunktionen ausüben können. Sollte also eine Reaktivierung des Virus tatsächlich gehäuft während der Aktivitätsphase auftreten, wie unter Punkt 4.1.2 diskutiert (Collaco *et al.*, 2005; Shadan, 2007; Sigworth *et al.*, 2003), wäre dies eine mögliche Erklärung für eine tagsüber erhöhte Anzahl CMV-spezifischer Effektor-Gedächtniszellen im Blut.

4.3 Einflussnahme von Cortisol

Bei allen Versuchspersonen konnte der charakteristische circadiane Verlauf von Cortisol mit einem starken morgendlichen Anstieg gefunden werden (Besedovsky *et al.*, 2012, 2014a; Born *et al.*, 1997; Dimitrov *et al.*, 2007; Dodt *et al.*, 1997; Haus and Smolensky, 1999; Mazzocchi *et al.*, 2011b; Ritchie *et al.*, 1983; Thomson *et al.*, 1980). Die Regressionsanalyse bestätigte eine ausgeprägte negative Korrelation zwischen Cortisol und der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen, die auch in einer vorherigen Studie gefunden worden war (Dimitrov *et al.*, 2009).

Die Gesamtpopulation influenzaspezifischer T-Zellen korrelierte negativ mit Cortisol, allerdings in schwächerem Ausmaß als die Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen. In bisherigen Studien beeinflusste Cortisol mit einer Verzögerung von drei Stunden den Abfall naiver T-Zellen am stärksten (Besedovsky *et al.*, 2014b; Dimitrov *et al.*, 2009). Bei influenzaspezifischen T-Zellen zeigte sich der größte Zusammenhang hingegen für zentrale Gedächtniszellen. Dies ist analog zum circadianen Rhythmus, der bei den influenzaspezifischen T-Zellen für zentrale Gedächtniszellen am stärksten ausgeprägt war, bei der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen hingegen für naive Zellen (Dimitrov *et al.*, 2009). Für die Gesamtpopulation der CD8⁺ T-Zellen demonstrierten Effektor-Gedächtniszellen einen schwächeren Zusammenhang als zentrale Gedächtniszellen (Dimitrov *et al.*, 2009). In dieser Arbeit fiel die Korrelation zwischen Cortisol und influenzaspezifischen Effektor-Gedächtniszellen am geringsten aus, was im Einklang damit ist, dass diese Subpopulation auch die geringste circadiane

Variation zeigte. Effektorzellen blieben bei Dimitrov *et al.* (2009) unbeeinflusst von der Cortisolkonzentration im Blut, stattdessen ließ sich eine positive Korrelation zu Adrenalin nachweisen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Befunden dieser Arbeit, in der influenzaspezifische Effektor-T-Zellen eine negative Korrelation mit Cortisol zeigen. Dies spricht dafür, dass Cortisol den Rhythmus dieser influenzaspezifischen Effektor-T-Zellen (mit)bewirkt, die, wie weiter oben diskutiert, ein Maximum in der Nacht und nicht am Tag zeigt, wie es für die Gesamtpopulation CD8⁺ Effektorzellen beschrieben wurde (Dimitrov *et al.*, 2009).

Es gibt Hinweise darauf, dass Cortisol über eine Erhöhung der Expression von CXCR4-Rezeptoren eine Umverteilung von T-Zellen ins Knochenmark fördert (Besedovsky *et al.*, 2014b; Dimitrov *et al.*, 2009; Okutsu *et al.*, 2005). Naive Zellen und zentrale Gedächtniszellen weisen die höchste Expression von CXCR4 auf (Besedovsky *et al.*, 2014a; Dimitrov *et al.*, 2009; Sallusto *et al.*, 1999) und fallen unter Einfluss von Cortisol am stärksten ab (Besedovsky *et al.*, 2014b; Dimitrov *et al.*, 2009). Die Korrelation zwischen dem circadianen Rhythmus der influenzaspezifischen T-Zellen und der Cortisolkonzentration spricht dafür, dass diese Zellen tatsächlich tagsüber ins Knochenmark umverteilt werden, wobei auch andere Verteilungsorte, wie z.B. die Lunge, denkbar sind.

Weder für die Gesamtpopulation CMV-spezifischer T-Zellen noch für die Subpopulationen ließ sich ein Zusammenhang zur Konzentration von Cortisol nachweisen. Der fehlende Einfluss dieses bedeutsamen Steuerelementes des circadianen Systems mag ein Grund für den nicht vorhandenen circadianen Rhythmus dieser antigenspezifischen T-Zellen sein.

4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Aussagen dieser Studie beschränken sich auf zirkulierende Zellen im Blut, die nur einem Teil aller CD8⁺ T-Zellen im Organismus entsprechen. Es muss berücksichtigt werden, dass die Verteilung antigenspezifischer Zellen in lymphatischen Organen oder am Infektionsort anders sein kann (van Leeuwen *et al.*, 2006; van Lier *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu zirkulierenden T-Zellen, zeigen influenzaspezifische T-Zellen in der Lunge eine andersgeartete Zusammensetzung der Subpopulationen mit einer weitergehenden Differenzierung (Bree *et al.*, 2005; Hogan *et al.*, 2001). CMV-spezifische T-Zellen hingegen haben in der Lunge die gleiche Verteilung wie im Blut (Bree *et al.*, 2005). Die Bestimmung fluoreszenzmarkierter Zellen in der Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode, allerdings bedarf es einer Blut- oder Gewebeentnahme. Letztere schränkt die Forschung am Menschen ein. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives Bildgebungsverfahren, mit dem bereits antigenspezifische T-Zellen in Geweben auch außerhalb des Bluts detektiert werden können (Wei *et al.*, 2018). In zukünftigen Studien könnte somit beispielsweise die Verteilung der T-Zellen nach akuter Infektion verfolgt werden, um eventuelle Veränderungen in Lokalisation oder Rhythmus im Zuge der Latenz- bzw. Gedächtnisbildung festzustellen. Auf diese Weise könnte man möglicherweise in Zukunft auch beim Menschen das Wissen über T-Zellen erweitern.

Inwiefern die Symptome viraler Erkrankungen tageszeitliche Veränderungen aufweisen, wurde bislang nur in wenigen Studien untersucht. Für die Hustenfrequenz bei Erkältungen konnten circadiane Veränderungen belegt werden (Kuhn *et al.*, 1982). Smith *et al.* (1988) konstatierte eine erhöhte Körpertemperatur nach Infektion mit Influenza B, mit der stärksten Ausprägung in den frühen Morgenstunden. In der gleichen Studie zeigte sich ein erhöhter Taschentuchverbrauch bei viralen Erkrankungen am Morgen. Dies könnte allein auf äußere Einflüsse, beispielsweise nächtliche Sekretansammlung und Schlafen in Bauchlage, zurückgeführt werden. Dennoch sollte ein möglicher Beitrag durch das circadiane System in Betracht gezogen werden (Smolensky

et al., 1995). Man könnte vermuten, dass durch die Änderungen in Manifestation und Erkrankungsschwere der Medikationsbedarf im Laufe eines Tages unterschiedlich ausgeprägt ist (Smolensky *et al.*, 1995). In der vorliegenden Studie konnten erstmals Unterschiede im circadianen Rhythmus für antigenspezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass diese einer Anpassung des Immunsystems an die spezifischen Eigenschaften eines Virus entsprechen. Ausschlaggebend könnten beispielsweise Zeiträume sein, in denen das Infektionsrisiko bei akuten Infektionen am höchsten ist oder die Reaktivierung latenter Viren bevorzugt stattfindet. Ein größeres Wissen über die circadianen Veränderungen könnte sich vorteilhaft in die bestehende antivirale Therapie integrieren lassen oder zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen. Oseltamivir ist ein Neuraminidaseinhibitor, der zur Prophylaxe von Influenza einmal täglich, zur Therapie zweimal täglich eingenommen wird. Möglicherweise könnte ein Einnahmezeitpunkt, der an den virusspezifischen circadianen Rhythmus angepasst ist, eine verbesserte Wirksamkeit erreichen. Es ist vorstellbar, dass eine einmalige Einnahme am Tag zum optimalen circadianen Zeitpunkt die gleiche Effektivität zeigt wie eine wiederholte Einnahme ohne den individuellen Rhythmus des Virus zu berücksichtigen. Die Reduktion der Dosis würde unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen und Resistenzen verringern. Des Weiteren könnte womöglich durch eine zeitlich optimal angepasste, antivirale Therapie die Reaktivierung latent persistierender Infektionen verringert oder vollständig vermieden werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt einer Impfung die adaptive Immunantwort beeinflusst (Langlois *et al.*, 1995; Long *et al.*, 2016; Phillips *et al.*, 2008) und möglicherweise den Impferfolg verbessert. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch der Einnahmezeitpunkt antiviraler Medikamente eine wichtige Rolle bei der Therapie von Viruserkrankungen spielen könnte. Um konkrete Zeiträume für Prävention und Therapie bestimmen zu können, sind weitere Studien bezüglich virusspezifischer circadianer Rhythmen notwendig. Die vorliegende Arbeit stellt mit dem Befund, dass es virusspezifische T-Zellrhythmen gibt, einen ersten Schritt in diese Richtung dar.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob antigenspezifische T-Zellen unterschiedlich durch das circadiane System beeinflusst werden, je nachdem, ob sie als Pathogen das akut verlaufende Influenzavirus oder das latent persistierende Cytomegalievirus (CMV) erkennen. Hierfür wurde 11 gesunden Versuchspersonen mit positivem serologischem Nachweis gegen CMV unter Beibehaltung des physiologischen Schlaf-Wach-Rhythmus im Zeitraum eines Tages alle vier Stunden Blut abgenommen. Mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach der Anfärbung mit fluoreszierenden antigenspezifischen HLA-A2-Multimeren die Differenzierung CMV- und influenzaspezifischer CD8⁺ T-Zellen. Durch Antikörper gegen CD45RA und CCR7 wurden die Subpopulationen (naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen und Effektorzellen) bestimmt.

Die Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen präsentierte die bekannte circadiane Periodik mit nächtlichem Maximum. Influenzaspezifische T-Zellen, in der Mehrzahl Effektor-Gedächtniszellen, folgten diesem Rhythmus. Alle Subpopulationen der influenzaspezifischen T-Zellen wiesen signifikante Veränderungen über den Tag auf. CMV-spezifische T-Zellen, bei denen Effektorzellen und Effektor-Gedächtniszellen dominierten, zeigten hingegen nur für den relativen Anteil einen signifikanten circadianen Rhythmus, allerdings mit entgegengesetztem Verlauf und maximalen Werten am Tag. Während die Gesamtpopulation und influenzaspezifische T-Zellen negativ mit Cortisol korrelierten, ergab sich für CMV-spezifische T-Zellen kein Zusammenhang.

Die neuen Erkenntnisse über das unterschiedliche circadiane Verhalten von T-Zellen, die Viren mit verschiedenen Eigenschaften erkennen, trägt zum besseren Verständnis für die hochspezifische Anpassung der adaptiven Immunabwehr bei. Damit bieten sich Ansatzpunkte, um nach weiterer Forschung eine effektivere Prävention und Therapie viraler Erkrankungen unter Berücksichtigung erregerspezifischer Rhythmen zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- Abruzzese, E. (2011), "Chronobiologie des Hormon- und des Immunsystems", in *Ehlert, Känel (Hrsg.) – Psychoendokrinologie und Psychoimmunologie*, Springer, Berlin Heidelberg, 129–149.
- Ackermann, K., Revell, V.L., Lao, O., Rombouts, E.J., Skene, D.J. and Kayser, M. (2012), "Diurnal rhythms in blood cell populations and the effect of acute sleep deprivation in healthy young men", *Sleep*, 35, 933–940.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H. and Kyriacou, C.P. (2002), "Circadian Cycling of the Mouse Liver Transcriptome, as Revealed by cDNA Microarray, Is Driven by the Suprachiasmatic Nucleus", *Current Biology*, 12, 540–550.
- Altman, J.D., Moss, P.A.H., Goulder, P.J.R., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. and Davis, M.M. (1996), "Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes", *Science*, 274, 94–96.
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D.V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J. and Rowland-Jones, S.L. (2002), "Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections", *Nature medicine*, 8, 379–385.
- Appay, V., van Lier, R.A.W., Sallusto, F. and Roederer, M. (2008), "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues", *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73, 975–983.
- Aschoff, J. (1965), "Circadian Rhythms in Man. A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity", *Science*, 148, 1427–1432.
- Atanackovic, D., Schnee, B., Schuch, G., Faltz, C., Schulze, J., Weber, C.S., Schafhausen, P., Bartels, K., Bokemeyer, C., Brunner-Weinzierl, M.C. and Deter, H.-C. (2006), "Acute psychological stress alerts the adaptive immune response. Stress-induced mobilization of effector T cells", *Journal of neuroimmunology*, 176, 141–152.
- Baaten, B.J.G., Cooper, A.M., Swain, S.L. and Bradley, L.M. (2013), "Location, location, location: the impact of migratory heterogeneity on T cell function", *Frontiers in immunology*, 4, 311.

- Barnes, P.D. and Grundy, J.E. (1992), "Down-regulation of the class I HLA heterodimer and beta 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus", *The Journal of general virology*, 73 (Pt 9), 2395–2403.
- Baron, S. (1996), *Medical microbiology: General concepts study guide*, 4. ed., Univ. of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Tex.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L. and Zoran, M.J. (2005), "Circadian rhythms from multiple oscillators. Lessons from diverse organisms", *Nature reviews. Genetics*, 6, 544–556.
- Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G. and Uccelli, A. (2007), "Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25, 1753–1760.
- Benz, C., Reusch, U., Muranyi, W., Brune, W., Atalay, R. and Hengel, H. (2001), "Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus", *The Journal of general virology*, 82, 2061–2070.
- Besedovsky, L., Born, J. and Lange, T. (2012), "Blockade of mineralocorticoid receptors enhances naïve T-helper cell counts during early sleep in humans", *Brain, behavior, and immunity*, 26, 1116–1121.
- Besedovsky, L., Born, J. and Lange, T. (2014a), "Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4", *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28, 67–75.
- Besedovsky, L., Dimitrov, S., Born, J. and Lange, T. (2016), "Nocturnal sleep uniformly reduces numbers of different T-cell subsets in the blood of healthy men", *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 311, R637-R642.
- Besedovsky, L., Lange, T. and Haack, M. (2019), "The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease", *Physiological reviews*, 99, 1325–1380.
- Besedovsky, L., Linz, B., Dimitrov, S., Groch, S., Born, J. and Lange, T. (2014b), "Cortisol increases CXCR4 expression but does not affect CD62L and CCR7 levels on specific T cell subsets in humans", *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 306, E1322-E1329.
- Boivin, D.B., James, F.O., Wu, A., Cho-Park, P.F., Xiong, H. and Sun, Z.S. (2003), "Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells", *Blood*, 102, 4143–4145.

- Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M. and Fehm, H.L. (1997), "Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells", *Journal of immunology*, 158, 4454–4464.
- Bree, G.J. de, van Leeuwen, E.M.M., Out, T.A., Jansen, H.M., Jonkers, R.E. and van Lier, R.A.W. (2005), "Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung", *The Journal of experimental medicine*, 202, 1433–1442.
- Cermakian, N., Lange, T., Golombek, D., Sarkar, D., Nakao, A., Shibata, S. and Mazzocchi, G. (2013), "Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system", *Chronobiology International*, 30, 870–888.
- Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., Förster, R., Rowland-Jones, S., Sékaly, R.P., McMichael, A.J. and Pantaleo, G. (2001), "Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes", *Nature*, 410, 106–111.
- Chandran, P.A., Laske, K., Cazaly, A., Rusch, E., Schmid-Horch, B., Rammensee, H.-G., Ottensmeier, C.H. and Gouttefangeas, C. (2016), "Validation of immunomonitoring methods for application in clinical studies: The HLA-peptide multimer staining assay", *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 342–352.
- Collaco, A.M., Rahman, S., Dougherty, E.J., Williams, B.B. and Geusz, M.E. (2005), "Circadian regulation of a viral gene promoter in live transgenic mice expressing firefly luciferase", *Molecular imaging and biology*, 7, 342–350.
- Cuninkova, L. and Brown, S.A. (2008), "Peripheral circadian oscillators. Interesting mechanisms and powerful tools", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129, 358–370.
- Cutolo, M. (2012), "Chronobiology and the treatment of rheumatoid arthritis", *Current opinion in rheumatology*, 24, 312–318.
- Dickmeis, T. (2009), "Glucocorticoids and the circadian clock", *The Journal of endocrinology*, 200, 3–22.
- Dimitrov, S., Benedict, C., Heutling, D., Westermann, J., Born, J. and Lange, T. (2009), "Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets", *Blood*, 113, 5134–5143.
- Dimitrov, S., Lange, T. and Born, J. (2010), "Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine", *Journal of immunology*, 184, 503–511.
- Dimitrov, S., Lange, T., Gouttefangeas, C., Jensen, A.T.R., Szczepanski, M., Lehnholz, J., Soekadar, S., Rammensee, H.-G., Born, J. and Besedovsky, L. (2019), "Gas-coupled receptor signaling and sleep regulate integrin

- activation of human antigen-specific T cells”, *The Journal of experimental medicine*, 216, 517–526.
- Dimitrov, S., Lange, T., Nohroudi, K. and Born, J. (2007), “Number and Function of Circulating Human Antigen Presenting Cells Regulated by Sleep”, *Sleep*, 30, 401–411.
- Dodt, C., Breckling, U., Derad, I., Fehm, H.L. and Born, J. (1997), “Plasma Epinephrine and Norepinephrine Concentrations of Healthy Humans Associated With Nighttime Sleep and Morning Arousal”, *Hypertension*, 30, 71–76.
- Edgar, R.S., Stangherlin, A., Nagy, A.D., Nicoll, M.P., Efstathiou, S., O'Neill, J.S. and Reddy, A.B. (2016), “Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 10085–10090.
- Enders, G., Daiminger, A., Lindemann, L., Knotek, F., Bäder, U., Exler, S. and Enders, M. (2012), “Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996-2010”, *Medical microbiology and immunology*, 201, 303–309.
- Fauci, A.S. (1975), “Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and b lymphocytes to the bone marrow”, *Immunology*, 28, 669–680.
- Gamadia, L.E., Rentenaar, R.J., Remmerswaal, E.B.M., Surachno, S., Weel, J.F.L., Toebes, M., Schumacher, T.N.M., van Lier, R.A.W. and Berge, I.J.M. ten (2001), “CMV-specific CD8pos T lymphocyte differentiation in latent CMV infection”, *Transplantation Proceedings*, 33, 1802–1803.
- Gamadia, L.E., van Leeuwen, E.M.M., Remmerswaal, E.B.M., Yong, S.-L., Surachno, S., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Berge, I.J.M. ten and van Lier, R.A.W. (2004), “The Size and Phenotype of Virus-Specific T Cell Populations Is Determined by Repetitive Antigenic Stimulation and Environmental Cytokines”, *The Journal of Immunology*, 172, 6107–6114.
- Geiger, S.S., Fagundes, C.T. and Siegel, R.M. (2015), “Chrono-immunology. Progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems”, *Immunology*, 146, 349–358.
- Gerna, G., Kabanova, A. and Lilleri, D. (2019), “Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors”, *Vaccines*, 7.
- Gillespie, G.M., Wills, M.R., Appay, V., O'Callaghan, C., Murphy, M., Smith, N., Sissons, P., Rowland-Jones, S., Bell, J.I. and Moss, P.A. (2000), “Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T

- lymphocytes in healthy seropositive donors”, *Journal of virology*, 74, 8140–8150.
- Goodrum, F., Caviness, K. and Zagallo, P. (2012), “Human cytomegalovirus persistence”, *Cellular microbiology*, 14, 644–655.
- Gratama, J.W., Kardol, M., Naipal, A.M., Slats, J., Den Ouden, A., Stijnen, T., D’Amaro, J., The, T.H. and Bruning, J.W. (1987), “The influence of cytomegalovirus carrier status on lymphocyte subsets and natural immunity”, *Clinical and experimental immunology*, 69, 16–24.
- Gratama, J.W., Kern, F., Manca, F. and Roederer, M. (2008), “Measuring antigen-specific immune responses, 2008 update”, *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73, 971–974.
- Griffiths, P., Baraniak, I. and Reeves, M. (2015), “The pathogenesis of human cytomegalovirus”, *The Journal of pathology*, 235, 288–297.
- Grigoleit, U., Riegler, S., Einsele, H., Laib Sampaio, K., Jahn, G., Hebart, H., Brossart, P., Frank, F. and Sinzger, C. (2002), “Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells”, *British journal of haematology*, 119, 189–198.
- Gupta, A. and Shetty, H. (2005), “Circadian variation in stroke - a prospective hospital-based study”, *International journal of clinical practice*, 59, 1272–1275.
- Hadrup, S.R., Maurer, D., Laske, K., Frøsig, T.M., Andersen, S.R., Britten, C.M., van der Burg, S.H., Walter, S. and Gouttefangeas, C. (2015), “Cryopreservation of MHC multimers. Recommendations for quality assurance in detection of antigen specific T cells”, *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 87, 37–48.
- Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R. and van Lier, R.A. (1997), “Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells”, *The Journal of experimental medicine*, 186, 1407–1418.
- Hastings, M., O’Neill, J.S. and Maywood, E.S. (2007), “Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms”, *The Journal of endocrinology*, 195, 187–198.
- Hastings, M.H., Reddy, A.B. and Maywood, E.S. (2003), “A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease”, *Nature reviews. Neuroscience*, 4, 649–661.
- Haus, E. (2007), “Chronobiology in the endocrine system”, *Advanced drug delivery reviews*, 59, 985–1014.

- Haus, E. and Smolensky, M.H. (1999), "Biologic Rhythms in the Immune System", *Chronobiology International*, 16, 581–622.
- He, X.-S., Mahmood, K., Maecker, H.T., Holmes, T.H., Kemble, G.W., Arvin, A.M. and Greenberg, H.B. (2003), "Analysis of the frequencies and of the memory T cell phenotypes of human CD8+ T cells specific for influenza A viruses", *The Journal of infectious diseases*, 187, 1075–1084.
- Hogan, R.J., Usherwood, E.J., Zhong, W., Roberts, A.A., Dutton, R.W., Harmsen, A.G. and Woodland, D.L. (2001), "Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections", *The Journal of Immunology*, 166, 1813–1822.
- Jarvis, M.A. and Nelson, J.A. (2002), "Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages", *Current opinion in microbiology*, 5, 403–407.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J. and Ahmed, R. (2002), "Effector and memory T-cell differentiation. Implications for vaccine development", *Nature reviews. Immunology*, 2, 251–262.
- Khan, N., Hislop, A., Gudgeon, N., Cobbold, M., Khanna, R., Nayak, L., Rickinson, A.B. and Moss, P.A.H. (2004), "Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age. Cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection", *The Journal of Immunology*, 173, 7481–7489.
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J.A., Sinclair, A.J., Nayak, L. and Moss, P.A.H. (2002), "Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals", *The Journal of Immunology*, 169, 1984–1992.
- Kirsch, S., Thijssen, S., Alarcon Salvador, S., Heine, G.H., van Bentum, K., Fliser, D., Sester, M. and Sester, U. (2012), "T-cell numbers and antigen-specific T-cell function follow different circadian rhythms", *Journal of clinical immunology*, 32, 1381–1389.
- Knapp, M.S., Cove-Smith, J.R., Dugdale, R., Mackenzie, N. and Pownall, R. (1979), "Possible effect of time on renal allograft rejection", *British medical journal*, 1, 75–77.
- Koch, H.J. and Raschka, C. (2009), "Diurnal Variation of Pain Perception in Young Volunteers Using the Tourniquet Pain Model", *Chronobiology International*, 21, 171–173.
- Kuhn, J.J., Hendley, J.O., Adams, K.F., Clark, J.W. and Gwaltney, J.M. (1982), "Antitussive effect of guaifenesin in young adults with natural colds. Objective and subjective assessment", *Chest*, 82, 713–718.

- Labrecque, N. and Cermakian, N. (2015), "Circadian Clocks in the Immune System", *Journal of biological rhythms*, 30, 277–290.
- Lachmann, R., Bajwa, M., Vita, S., Smith, H., Cheek, E., Akbar, A. and Kern, F. (2012), "Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses", *Journal of virology*, 86, 1001–1009.
- Lange, T., Dimitrov, S. and Born, J. (2010), "Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193, 48–59.
- Langlois, P.H., Smolensky, M.H., Glezen, W.P. and Keitel, W.A. (1995), "Diurnal Variation in Responses to Influenza Vaccine", *Chronobiology International*, 28–36.
- Li, M., Yao, D., Zeng, X., Kasakovski, D., Zhang, Y., Chen, S., Zha, X., Li, Y. and Xu, L. (2019), "Age related human T cell subset evolution and senescence", *Immunity & ageing I & A*, 16, 24.
- Long, J.E., Drayson, M.T., Taylor, A.E., Toellner, K.M., Lord, J.M. and Phillips, A.C. (2016), "Morning vaccination enhances antibody response over afternoon vaccination: A cluster-randomised trial", *Vaccine*, 34, 2679–2685.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. and Myrtek, D. (2014), *Der Experimentator: Immunologie, Experimentator*, 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014, Springer Spektrum, Berlin.
- Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M. and Lugli, E. (2013), "The who's who of T-cell differentiation. Human memory T-cell subsets", *European journal of immunology*, 43, 2797–2809.
- Manfredini, R., Gallerani, M., La Cecilia, O., Boari, B., Fersini, C. and Portaluppi, F. (2002), "Circadian pattern in occurrence of renal colic in an emergency department. Analysis of patients' notes", *BMJ (Clinical research ed.)*, 324, 767.
- Martinez-Bakker, M. and Helm, B. (2015), "The influence of biological rhythms on host-parasite interactions", *Trends in ecology & evolution*, 30, 314–326.
- Masopust, D. and Schenkel, J.M. (2013), "The integration of T cell migration, differentiation and function", *Nature reviews. Immunology*, 13, 309–320.
- Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R.P., Koni, P.A., Silberstein, L.E. and Andrian, U.H. von (2005), "Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells", *Immunity*, 22, 259–270.
- Mazzocchi, G., Cata, A. de, Greco, A., Damato, M., Pinto, D.G. de, Montrano, M., Marzulli, N., Pia Dagostino, M. and Carughi, S. (2011a), "Opposing

- circadian rhythms of CD3+, CD4+ and CD3+, CD8+ lymphocyte subpopulations in healthy humans”, *Biological Rhythm Research*, 42, 111–118.
- Mazzoccoli, G., Muscarella, L.A., Fazio, V.M., Piepoli, A., Paziienza, V., Dagostino, M.P., Giuliani, F., Polyakova, V.O. and Kvetnoy, I. (2011b), “Antiphase signalling in the neuroendocrine-immune system in healthy humans”, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 65, 275–279.
- Nicholson, P.A. and Bogie, W. (1973), “Diurnal variation in the symptoms of hay fever. Implications for pharmaceutical development”, *Current medical research and opinion*, 1, 395–400.
- O'Hara, G.A., Welten, S.P.M., Klenerman, P. and Arens, R. (2012), “Memory T cell inflation. Understanding cause and effect”, *Trends in immunology*, 33, 84–90.
- Okutsu, M., Ishii, K., Niu, K.J. and Nagatomi, R. (2005), “Cortisol-induced CXCR4 augmentation mobilizes T lymphocytes after acute physical stress”, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288, R591-R599.
- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M.W. and Eichele, G. (2006), “The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock”, *Cell metabolism*, 4, 163–173.
- Peper, J.K. and Stevanović, S. (2015), “A combined approach of human leukocyte antigen ligandomics and immunogenicity analysis to improve peptide-based cancer immunotherapy”, *Cancer immunology, immunotherapy CII*, 64, 1295–1303.
- Phillips, A.C., Gallagher, S., Carroll, D. and Drayson, M. (2008), “Preliminary evidence that morning vaccination is associated with an enhanced antibody response in men”, *Psychophysiology*, 45, 663–666.
- Portaluppi, F. and Lemmer, B. (2007), “Chronobiology and chronotherapy of ischemic heart disease”, *Advanced drug delivery reviews*, 59, 952–965.
- Ritchie, A.W., Oswald, I., Micklem, H.S., Boyd, J.E., Elton, R.A., Jazwinska, E. and James, K. (1983), “Circadian variation of lymphocyte subpopulations. A study with monoclonal antibodies”, *British medical journal (Clinical research ed.)*, 286, 1773–1775.
- Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E. and Rufer, N. (2007), “Four

- functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes”, *Journal of immunology*, 178, 4112–4119.
- Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004), “Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance”, *Annual review of immunology*, 22, 745–763.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999), “Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions”, *Nature*, 401, 708–712.
- Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L. and Loudon, A. (2018), “Clocking in to immunity”, *Nature reviews. Immunology*, 18, 423–437.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y. and Frenette, P.S. (2013), “Circadian control of the immune system”, *Nature reviews. Immunology*, 13, 190–198.
- Shadan, F.F. (2007), “A circadian model for viral persistence”, *Medical hypotheses*, 68, 546–553.
- Sigworth, L.A., Liao, L., Chandler, T.R. and Geusz, M.E. (2003), “Luciferase expression controlled by a viral gene promoter in a mammalian circadian pacemaker”, *Neuroreport*, 14, 443–447.
- Sinclair, J. (2008), “Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage”, *Journal of clinical virology the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 41, 180–185.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H. and Jahn, G. (1995), “Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues”, *The Journal of general virology*, 76 (Pt 4), 741–750.
- Smith, A., Tyrrell, D., Coyle, K., Higgins, P. and Willman, J. (1988), “Diurnal variation in the symptoms of colds and influenza”, *Chronobiology International*, 5, 411–416.
- Smolensky, M.H., REINBERG, A. and Labreque, G. (1995), “Twenty-four hour pattern in symptom intensity of viral and allergic rhinitis. Treatment implications”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 95, 1084–1096.
- Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H. and Weitz, C.J. (2002), “Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart”, *Nature*, 417, 78–83.
- Suzuki, S., Toyabe, S., Moroda, T., Tada, T., Tsukahara, A., Iiai, T., Minagawa, M., Maruyama, S., Hatakeyama, K., Endoh, K. and Abo, T. (1997), “Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible

- correlation with the function of the autonomic nervous system”, *Clinical and experimental immunology*, 110, 500–508.
- Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., Nelson, J.A. and Picker, L.J. (2005), “Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects”, *The Journal of experimental medicine*, 202, 673–685.
- Thomson, S.P., McMahon, L.J. and Nugent, C.A. (1980), “Endogenous cortisol. A regulator of the number of lymphocytes in peripheral blood”, *Clinical immunology and immunopathology*, 17, 506–514.
- Toro, A.I. and Ossa, J. (1996), “PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals. Does latency need redefinition?”, *Research in Virology*, 147, 233–238.
- Tussey, L.G., Nair, U.S., Bachinsky, M., Edwards, B.H., Bakari, J., Grimm, K., Joyce, J., Vessey, R., Steigbigel, R., Robertson, M.N., Shiver, J.W. and Goepfert, P.A. (2003), “Antigen burden is major determinant of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cell maturation state. Potential implications for therapeutic immunization”, *The Journal of infectious diseases*, 187, 364–374.
- van Leeuwen, E.M.M., Koning, J.J., Remmerswaal, E.B.M., van Baarle, D., van Lier, R.A.W. and Berge, I.J.M. ten (2006), “Differential usage of cellular niches by cytomegalovirus versus EBV- and influenza virus-specific CD8+ T cells”, *The Journal of Immunology*, 177, 4998–5005.
- van Lier, R.A.W., Berge, I.J.M. ten and Gamadia, L.E. (2003), “Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses”, *Nature reviews. Immunology*, 3, 931–939.
- Waller, E.C.P., Day, E., Sissons, J.G.P. and Wills, M.R. (2008), “Dynamics of T cell memory in human cytomegalovirus infection”, *Medical microbiology and immunology*, 197, 83–96.
- Wei, W., Jiang, D., Ehlerding, E.B., Luo, Q. and Cai, W. (2018), “Noninvasive PET Imaging of T cells”, *Trends in cancer*, 4, 359–373.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M. and Reppert, S.M. (1995), “Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms”, *Neuron*, 14, 697–706.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S. and Kay, S.A. (2010), “Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties”, *Annual review of physiology*, 72, 551–577.

- Wertheimer, A.M., Bennett, M.S., Park, B., Uhrlaub, J.L., Martinez, C., Pulko, V., Currier, N.L., Nikolich-Žugich, D., Kaye, J. and Nikolich-Žugich, J. (2014), "Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 192, 2143–2155.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepkka, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. and Takahashi, J.S. (2004), "PERIOD2:LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5339–5346.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Jan Born durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Luciana Besedovsky, Dr. Stoyan Dimitrov, Prof. Dr. Tanja Lange und Prof Dr. Jan Born.

Die Experimente wurden im Rahmen eines großen SFB-geförderten Projekts (SFB 654, Projekt C6) nach Einarbeitung durch Dr. Stoyan Dimitrov und Dr. Luciana Besedovsky von mir in Zusammenarbeit mit Jannik Lehnholz, Michael Sczcepanski, Dardan Demhasaj, Adam Murtazaliev und Heidi Ströle durchgeführt. Die mir zugeteilten Aufgaben, inklusive der Rekrutierung von Versuchspersonen, sowie deren Betreuung, Vorbereitung der Polysomnographie, Legen des Venenverweilkatheters, Blutentnahmen, Probenverarbeitung und Datenarchivierung, habe ich alle selbständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Frau Dr. Luciana Besedovsky.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 21.06.2020

Verena Leykamm

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jan Born, dem Leiter des Instituts für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie Tübingen, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Frau Dr. Luciana Besedovsky für ihre freundliche und engagierte Betreuung. Vielen Dank für die stets wertvolle Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit. Ein großes Dankeschön dafür, dass sie mit viel Geduld und guten Ratschlägen das Korrekturlesen dieser Arbeit übernommen hat.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Stoyan Dimitrov für die Einweisungen in die wissenschaftlichen Methoden mit zahlreichen geduldigen Erklärungen, sowie seine fachliche Hilfe während der Durchführung und Auswertung.

Allen mit denen ich im Institut zusammenarbeiten durfte, möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich motiviert und begleitet haben.

Abschließend ein ganz besonderes Dankeschön an meine Eltern, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und vor allem dafür, dass sie mich immer unterstützen.