

Aus dem

Institut für Medizinische Psychologie der Universität Tübingen

Inaugural-Dissertation

**Der Einfluss von Schlaf auf das Migrationspotenzial von
menschlichen T-Zellen**

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

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

vorgelegt von

Hübener, Robert

2024

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Hallschmid
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Bartels

Tag der Disputation:	30.10.2024
----------------------	------------

Widmung

Diese Dissertation ist den wichtigsten Personen in meinem Leben gewidmet. Vordergründig meiner Frau Jasmin Katharina, ohne die ich dieses Studium und die Arbeit an der Dissertation nicht hätte bewältigen können. Darüber hinaus meinen Eltern Johannes Reimund und Petra, welche mich während den ersten Jahren meines Lebens ohne Grenzen unterstützt haben und maßgeblichen Anteil an meinem beruflichen Werdegang haben. Zuletzt widme ich diese Arbeit meinen beiden Töchtern Malia Charlotte und Lola Elisabeth, die unser Leben jeden Tag bereichern.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Einleitung	9
2.1. Der menschliche Schlaf	10
2.2. Das Immunsystem, menschliche T-Zellen und ihre Eigenschaften	12
2.3. Migration und Adhäsion der T-Zellen aus physiologischer Sicht und die beteiligten Zytokine	15
2.4. Das Verhältnis von Schlaf, zirkadianer Rhythmik und Immunsystem	19
2.5. Hypothese	21
3. Material und Methoden	22
3.1. Material	22
3.1.1. Chemokine	22
3.1.2. Antikörper	22
3.1.3. Puffer und Kulturmedien	23
3.1.4. Sonstige Lösungen	23
3.1.5. Geräte	23
3.2. Methoden	24
3.2.1. Experimente am Menschen	24
3.2.2. Experiment im Schlaflabor	25
3.2.3. Polysomnographie und EEG-Analysen im Schlaf	28
3.2.4. Prinzipien der Fluozytometrie	28
3.2.5. Experiment im Zelllabor	31
3.2.5.1. Messung der absoluten Zellzahlen	31
3.2.5.2. Messung der Migrationskapazität	32
3.2.6. Statistische Analysen	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Der Effekt von Schlaf auf die absoluten Zellzahlen der verschiedenen T-Zell-Untergruppen	34
4.2. Der Effekt des Schlafs auf die Migration der T-Zell-Untergruppen	39
4.2.1. Spontanmigration	39
4.2.2. Migration zu CCL19	43
4.2.3. Migration zu CCL 5	47

5. Diskussion	51
5.1. Veränderungen mit Bezug auf die absoluten Zellzahlen	51
5.2. Veränderungen mit Bezug auf die Migration der T-Zell-Untergruppen zu den lymphatischen Organen in Abhängigkeit der beteiligten Chemokine CCL19 und CCL5 unter Berücksichtigung des Migrationsindex	52
5.2.1. Veränderungen mit Bezug auf die Spontanmigration der T-Zell-Untergruppen	52
5.2.2. Veränderungen mit Bezug auf die Migration in Abhängigkeit von CCL19	53
5.2.3. Veränderungen mit Bezug auf die Migration in Abhängigkeit von CCL5	55
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	58
8. Erklärungen zum Eigenanteil	62
9. Veröffentlichungen	63
10. Danksagung	64
11. Lebenslauf	65

1. Abkürzungsverzeichnis

Folgende fachspezifische Abkürzungen und Akronyme wurden in dieser Dissertationsschrift verwendet:

BMI = body mass index

C3 = central 3

C4 = central 4

CCR1 = C-Chemokine receptor type 1

CCR3 = C-Chemokine receptor type 3

CCR5 = C-Chemokine receptor type 5

CCR7 = C-Chemokine receptor type 7

CCL5 = C-Chemokine ligand 5; RANTES

CCL19 = C-Chemokine ligand 19

CCL21 = C-Chemokine ligand 21

CD = cluster of differentiation

CD3 = cluster of differentiation 3

CD4 = cluster of differentiation 4

CD8 = cluster of differentiation 8

CD11a = cluster of differentiation 11a

CD18 = cluster of differentiation 18

CD25 = cluster of differentiation 25

CD28 = cluster of differentiation 28

CD29 = cluster of differentiation 29

CD45RA = cluster of differentiation 45 RA

CD54 = cluster of differentiation 54

CD61 = cluster of differentiation 61

CD62L = cluster of differentiation 62 L

CD95 = cluster of differentiation 95

CRY = Cryptochrom-Gen

EDTA = **Ethylendiamintetraessigsäure**

EEG = Elektroenzephalografie

FACS = fluorescence-activated cell sorting

FS = forward scatter
FSC = forward scatter canal
GH = growth hormone
ICAM1 = intercellular cell adhesion molecule 1
ICAM2 = intercellular cell adhesion molecule 2
IFN γ = Interferon- γ
IL2 = Interleukin-2
IL10 = Interleukin-10
ILC = intraluminal crawling
LAD = Leukozytenadhäsionsdefizienz
LFA1 = lymphocyte function-associated antigen 1
LFA2 = lymphocyte function-associated antigen 2
LFA3 = lymphocyte function-associated antigen 3
LiHep = Lithium-Heparin
LMM = linear mixed model
MAC1 = Macrophage-1-antigen
MHC = major histocompatibility complex
MI = Migrationsindex
MIP-3 = Macrophage inflammatory protein
mRNA = messenger ribonuclein acid
NaCl = Natriumchlorid
NaHep = Natrium-Heparin
NK-Zellen = natürliche Killerzellen
NREM = non rapid eye movement
PBS = phosphate-buffered saline
RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; CCL5
REM = rapid eye movement
SCN = Nucleus suprachiasmaticus
SEC = subendothelial crawling
SS = side scatter
SSC = side scatter canal

SWS = slow wave sleep

T_{CM} = zentrale Gedächtnis-T-Zellen

T_{EM} = Effektor-Gedächtnis-T-Zellen

TEM = transendothelial migration

T_N = naive T-Zellen

TNF = Tumornekrosefaktor

TNF α = Tumornekrosefaktor-alpha

T_{SCM} = Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen

T_{TE} = transitionale Effektor-T-Zellen

T_{TM} = transitionale Gedächtnis-T-Zellen

UK = United Kingdom

US = United States

VLA = very late antigen

VLA1 = very late antigen 1

VLA2 = very late antigen 2

2. Einleitung

„Der Schlaf ist der heilige Versuch der Natur, die Tageswunden zum Verheilen zu bringen. Den Schlaf vorzeitig unterbrechen, heißt heilige Verbände abreißen.“ – Peter Altenberg.

Mit diesen Worten formulierte der österreichische Schriftsteller Peter Altenberg, welcher von 1859 bis 1919 lebte, eine wissenschaftliche Tatsache auf poetische Art und Weise, welche von immenser Bedeutung für die menschliche Psychologie und Physiologie ist.

Unser körpereigenes Immunsystem erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben, die unsere menschlichen Körper vor dem Ausbruch verschiedenster Erkrankungen schützen sollen. Dabei nutzt es eine Reihe von unterschiedlichen Mechanismen, um eine kontinuierliche Funktionstüchtigkeit der Abläufe in unserem Organismus zu gewährleisten. Es kommen natürliche Barrieren, wie z.B. unsere Haut, zum Einsatz, genauso wie weniger spezifizierte und hoch spezifizierte Zellarten, welche auf komplexe Art und Weise miteinander kommunizieren. Darüber hinaus ist unser Immunsystem dazu fähig, noch unbekannte Erreger zu identifizieren und die gebildete Immunantwort derart zu verinnerlichen, dass man von einer Gedächtnisbildung spricht, welche bei einem erneuten Kontakt mit demselben Erreger dazu führt, dass die bekannte Immunantwort schneller abläuft und der Erreger so nicht zur Entfaltung im Organismus kommt und uns somit nicht bzw. nur geringfügig schadet. Dieses immunologische Gedächtnis wird, ähnlich wie das Langzeitgedächtnis in der Lerntheorie, maßgeblich von unserem Schlafverhalten beeinflusst.

Menschlicher Schlaf läuft in verschiedenen Phasen mit unterschiedlichen cerebralen Aktivitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab. Genauso verhält es sich auch mit den immunologischen Aktivitäten unseres Körpers zum Zeitpunkt des Schlafs. Vor allem der Vorgang der Zellmigration, also der Wanderung von Immunzellen zu den Geweben, in denen sie ihre Aufgaben erfüllen, benötigt eine Ruhephase des Körpers.

Dieser Mechanismus wird in der vorliegenden Dissertation untersucht, indem zunächst die verschiedenen Schlafstadien und die Eigenschaften des Immunsystems genauer beleuchtet werden. Danach wird der Vorgang der Migration und die Zusammenhänge zwischen Schlaf, Immunsystem und der Migration genauer beschrieben, bevor die in der vorliegenden Studie zum Effekt des Schlafs auf das T-Zellverhalten des menschlichen Körpers angewendeten Materialien, Methoden und die Ergebnisse dargestellt werden. Im Schlussteil der Arbeit werden die Ergebnisse diskutiert und ein Ausblick auf die Relevanz für die aktuelle Forschung und die

klinische Anwendung am Patienten gegeben, bevor eine abschließende Zusammenfassung der Arbeit folgt.

2.1. Der menschliche Schlaf

Aus verhaltensanalytischer Sicht betrachtet, kann man Schlaf beim Menschen als einen reversiblen Verhaltenszustand von relativer Inaktivität und reduzierter Reaktionsfähigkeit auf externe Reize beschreiben, der mit einem Verlust von Bewusstsein einhergeht. Außerdem imponiert Schlaf durch eine posturale Liegeposition sowie geschlossenen Augen. Unter ungewöhnlichen Umständen kann es während des Schlafs auch zu anderen Verhaltensmustern kommen, z. B. Schlafwandeln, Sprechen im Schlaf, Zähneknirschen und anderen physischen Aktivitäten (Carskadon et al., 2009).

Der menschliche Schlaf zeigt zwei Zustände, den REM-Schlaf („rapid eye movement“) und den Non-REM-Schlaf (NREM-Schlaf), welche sich zyklisch während einer Schlafepisode abwechseln. Die Zustandscharakteristika sind wie folgt definiert: NREM-Schlaf zeigt ein variables synchrones kortikales EEG (Elektroenzephalografie) mit Spindeln, K-Komplexen und langsamen Wellen in Verbindung mit einem schwachen Muskeltonus; das REM-Schlaf-EEG dagegen ist desynchronisiert, die Muskulatur ist atonisch und es kommt zu episodischen Ausschlägen von schnellen Augenbewegungen (Dement et al., 1957).

Der Schlaf beginnt mit leichtem NREM-Schlaf und läuft durch immer tiefere NREM-Phasen, wie man in *Abbildung 1* erkennen kann, bevor die erste REM-Phase nach ca. 90 Minuten beginnt. Danach wechseln sich NREM- und REM-Schlaf jeweils in Abständen von weiteren 90 Minuten ab (Carskadon et al., 2009).

Der NREM-Schlaf wird anhand des EEG normalerweise in vier Phasen unterteilt. Der REM-Schlaf wird dagegen nicht in Stadien unterteilt, auch wenn man im REM-Schlaf tonische und phasische Typen unterscheiden kann. Der am häufigsten verwendete Marker für REM-Schlaf beim Menschen sind die schnellen Augenbewegungen, die oft mit Muskelzuckungen und kardiorespiratorischen Irregularitäten einhergehen (Dement et al., 1957). Die NREM-Phasen finden vor allem in den frühen Nachtstunden statt und die REM-Phasen werden vor allem in der zweiten Nachthälfte immer länger (Czeisler et al., 1980).

Wenn ein Mensch einschläft, wechselt unter den einfachsten Umständen das EEG von einem Muster rhythmischer Alphawellen-Aktivität zu einem relativ frequenzgemischtem Stadium mit geringer Spannung (NREM-Phase 1). Dieser Wechsel geschieht normalerweise Sekunden oder Minuten nach dem Start von langsamen Augenbewegungen (Agnew und Webb, 1972).

Im Folgenden soll der Fokus auf die verschiedenen Phasen des NREM-Schlafs gelegt werden, dabei wird Bezug genommen auf eine Arbeit der Kollegen Rechtschaffen et al. aus dem Jahre 1968 an der Universität Los Angeles: Der erste Schlafzyklus eines gesunden jungen Erwachsenen beginnt in der Phase 1 des NREM-Schlafs, die für einige Minuten zu Beginn des Schlafs anhält. Der Schlaf kann in dieser Phase unterbrochen werden, z.B. durch das leise Rufen des Namens der Person, leichte Berührung oder leises Türemschließen. Phase 2 des NREM-Schlafs, ausgezeichnet durch Schlafspindeln und K-Komplexe im EEG, folgt dieser kurzen Phase 1 und besteht danach für 10 bis 25 Minuten weiter. In dieser Phase ist ein intensiverer Stimulus nötig, um die Person aufzuwecken. Im Anschluss an Phase 2 erscheinen langsame Wellen mit hoher Spannung im EEG. Dies sind Kennzeichen der Phase 3 des NREM-Schlafs. Man spricht so lange von Phase 3, wie die angesprochenen langsamen Wellen 20 bis 50% der gesamten Epoche (i.d.R. 30 Sekunden) einnehmen. Auch Phase 3 dauert normalerweise nur wenige Minuten im ersten Zyklus und geht dann in Phase 4 über, in der dann der Anteil der langsamen Wellen größer ist und bei über 50 % liegt. Phase 4 dauert dann ca. 20 bis 40 Minuten. In den Phasen 3 und 4 wäre ein noch stärkerer Reiz als in Phase 2 nötig, um die schlafende Person aufzuwecken. Die Phasen 3 und 4 werden auch als SWS (eng., slow wave sleep) oder Delta-Schlaf bezeichnet. Nach Phase 4 kommt es dann häufig zu einem kurzen Übergang in Phase 3, der wiederum von 5 bis 10 Minuten Phase 2 abgelöst wird. Diese Phase 2 wird dann von Körperbewegungen unterbrochen, die die beginnende REM-Phase einleiten. Die folgende REM-Phase ist im ersten Zyklus meist kurzlebig (1 bis 5 Minuten). Im Verlauf der Nacht nimmt die Dauer der einzelnen REM-Phasen kontinuierlich zu, während die Dauer des Delta-Schlafs abnimmt (Rechtschaffen et al., 1968).

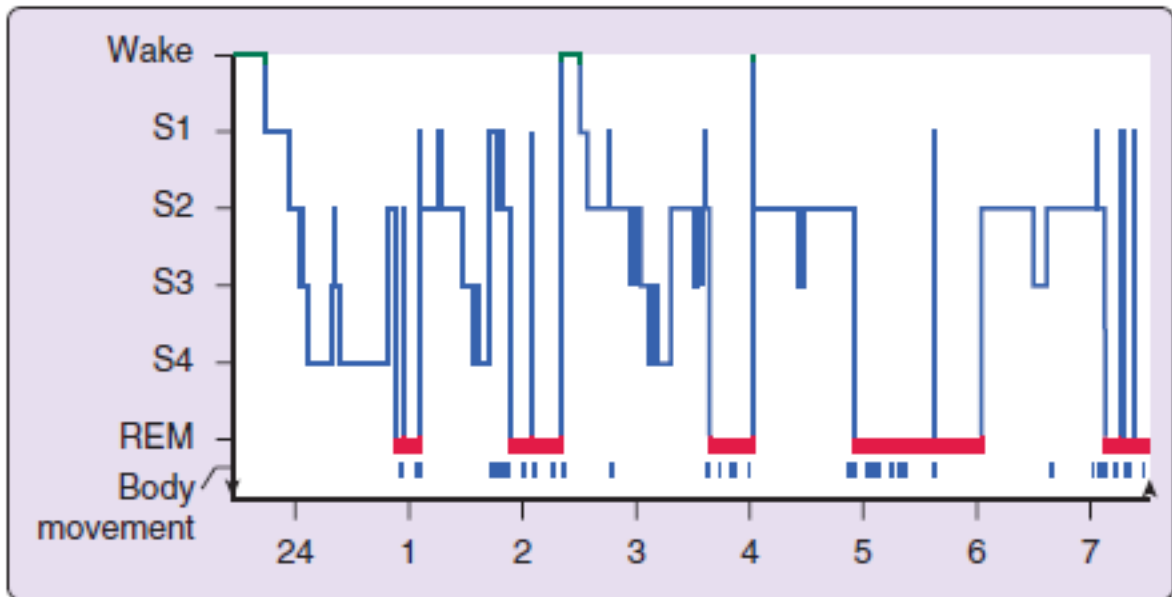


Abbildung 1. Ablauf der Schlafstadien während einer Nacht bei einem gesunden jungen 19-jährigen Erwachsenen (Carskadon et al., 2009).

2.2. Das Immunsystem, menschliche T-Zellen und ihre Eigenschaften

Das Immunsystem ist eine komplexe Zusammenstellung von physiologischen Mechanismen, deren generelles Ziel es ist, den Organismus gegen Fremdkörper, wie Pathogene (Bakterien, Viren, Parasiten) oder Krebszellen, zu verteidigen. Das Immunsystem kann in zwei Teile unterteilt werden: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Diese beiden Teile sind in **Tabelle 1** aufgezeigt. Die angeborene Immunität ermöglicht eine unspezifische, aber schnelle Antwort, die in den meisten Fällen ausreicht, um eine Infektion zu kontrollieren. Die erste Säule des Schutzes beinhaltet dabei physikalische Barrieren, Phagozytose und sezernierte Substanzen, die den Fremdkörper töten können. Die angeborene Immunität alarmiert außerdem das erworbene Immunsystem, das eine langsamere, aber antigenspezifische Antwort in Gang setzt, die die komplette Eliminierung oder Inaktivierung von Pathogenen bewirkt. Folgende Zelltypen partizipieren an der angeborenen Immunität: die NK-Zellen (natürliche Killerzellen), die mononukleären Phagozyten und die Granulozyten, jeweils in den Untergruppen - eosinophil, neutrophil und basophil. Die T-Lymphozyten sind die Schlüsselspieler der adaptiven Immunantwort. T-Zellen erkennen das Peptidfragment eines Antigens über ihre variablen T-Zell-Rezeptoren in Assoziation mit den MHC-Molekülen (eng., major histocompatibility complex) auf der Oberfläche von speziellen antigenpräsentierenden Zellen. Dazu nutzen sie ihre „Unterscheidungsgruppen“ (engl. Cluster of differentiation = CD) auf den

jeweiligen Oberflächen. Diese Glykoproteine sind bei den verschiedenen Gruppen der T-Lymphozyten unterschiedlich (Labrecque und Cermakian, 2015).

T-Helferzellen sind CD4-positiv und erkennen die MHC-Antigen-Komplexe auf den Oberflächen der antigenpräsentierenden Zellen. T-Killerzellen sind CD8-positiv und erkennen Komplexe aus viralen Peptiden mit MHC auf den Oberflächen der vom Virus befallenen Zelle. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Strukturklassen. MHC-1-Moleküle binden an Peptide, die von endogen synthetisierten Molekülen, wie z.B. viralen Proteinen in infizierten Zellen, stammen, und werden vorwiegend von T-Killerzellen erkannt. MHC-2-Moleküle binden an Peptide von endozytierten Antigenen und werden von T-Helferzellen erkannt (Springer, 1990).

Die Aktivierung von naiven T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen, genauer gesagt durch die dendritischen Zellen. Diese Präsentation von Antigenen geschieht in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten), daher ist es notwendig, dass Antigene, die in peripher gelegene Gewebe eindringen, zu diesen Organen transportiert werden. Nach der Antigenerkennung proliferieren naive T-Lymphozyten extensiv und differenzieren sich in Effektorzellen, die den Erreger eliminieren können. CD4⁺Effektor-T-Zellen sezernieren Zytokine, die die Antwort von B-Zellen und CD8⁺T-Zellen unterstützen und Makrophagen aktivieren. Die koordinierte Interaktion von T- und B-Zellen führt zur Eliminierung von diesem Erreger. Nach der Beseitigung des Pathogens, differenzieren sich Untergruppen von B- und T-Zellen zu langlebigen Gedächtniszellen. Diese Zellen ermöglichen dann einen Langzeitschutz gegen eine Reinfektion durch eine schnelle und sehr sensitive Antwort auf die schon bekannten Erreger (Labrecque und Cermakian, 2015).

Tabelle 1. Hauptunterschiede zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (angepasst von Labrecque und Cermakian, 2015).

	angeborenes Immunsystem	erworbenes Immunsystem
Zeitraum	Stunden	Tage
Erkennungsmechanismus	pathogen-assoziierte molekulare Pathogene	Antigene
Spezifität	niedrig	hoch
Antwort auf Reinfektion	identisch	verstärkt und schneller
Zelltypen	NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen	T- und B-Lymphozyten, antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen)

Die genauere T-Zell-Differenzierung wird anhand von einer gewissen Anzahl von vorgeschriebenen Markern analysiert, z.B. CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD28, CD95, und CD62L. Die unterschiedliche Expression dieser Marker ermöglicht die Identifikation von sechs Untergruppen im peripheren Blut gesunder Menschen: Naive T-Zellen, Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen, zentrale Gedächtnis-T-Zellen, transitionale Gedächtnis-T-Zellen, Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und terminale Effektor-T-Zellen, wie man in **Abbildung 2** erkennen kann. All diese T-Zell-Untergruppen weisen auch Unterschiede in der Expression von Molekülen auf, die folgende Lymphozyten-Funktionen vermitteln: Migration, Ko-Stimulation, Zytotoxizität und Adhäsion. Naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen können aufgrund ihrer differenzierten Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen unterschieden werden. Die Analyse der sog. „Homing-Rezeptoren“ hat gezeigt, dass T-Zellen in ihrer Fähigkeit, periphere Gewebe zu lokalisieren, sehr heterogen sind. Viele Studien in Mäusen, nichtmenschlichen Primaten und Menschen bestätigten das Konzept von zentralen Gedächtnis-T-Zellen, die fröhendifferenzierte Progenitorzellen sind, sich selbst erneuern können und gleichzeitig weitere differenzierte Progenitorzellen bilden können. Diese T_{CM}-Zellen wurden früher als langlebiges T-Zell-Gedächtnis betrachtet, das wie eine Stammzelle funktioniert. Nun geht man davon aus, dass ein bestimmter Teil dieser Zellen eventuell die größte regenerative Kapazität aller Zellen haben könnte. *In-vitro* und *In-vivo*-Studien an Menschen und Rhesusaffen führten zu einer Identifizierung von verschiedenen T-Zell-Untergruppen mit vielen stammzellähnlichen Eigenschaften, die im Nachhinein dann als Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen bezeichnet wurden (T_{SCM}). T_{SCM}-Zellen sind in der Lage, sich *in vitro* selbst zu erneuern. T_{SCM}-Zellen zeigen eine

größere Multipotenz, weil sie alle Gedächtniszelluntergruppen bilden können. Keiner anderen Untergruppe von Gedächtniszellen konnte bisher nachgewiesen werden, dass sie selbst T_{SCM}-Zellen hervorbringen könnte. Transitionale Gedächtnis-T-Zellen (T_{TM}) scheinen etwas weiter differenziert zu sein als T_{CM}-Zellen, aber nicht so sehr differenziert wie Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}). Zusammenfassend kann man sagen, dass aktivierte T-Zellen sich nach der Antigeninteraktion in eine weitläufige Gruppe von Gedächtniszelluntergruppen ausdifferenzieren (Mahnke et al., 2013).

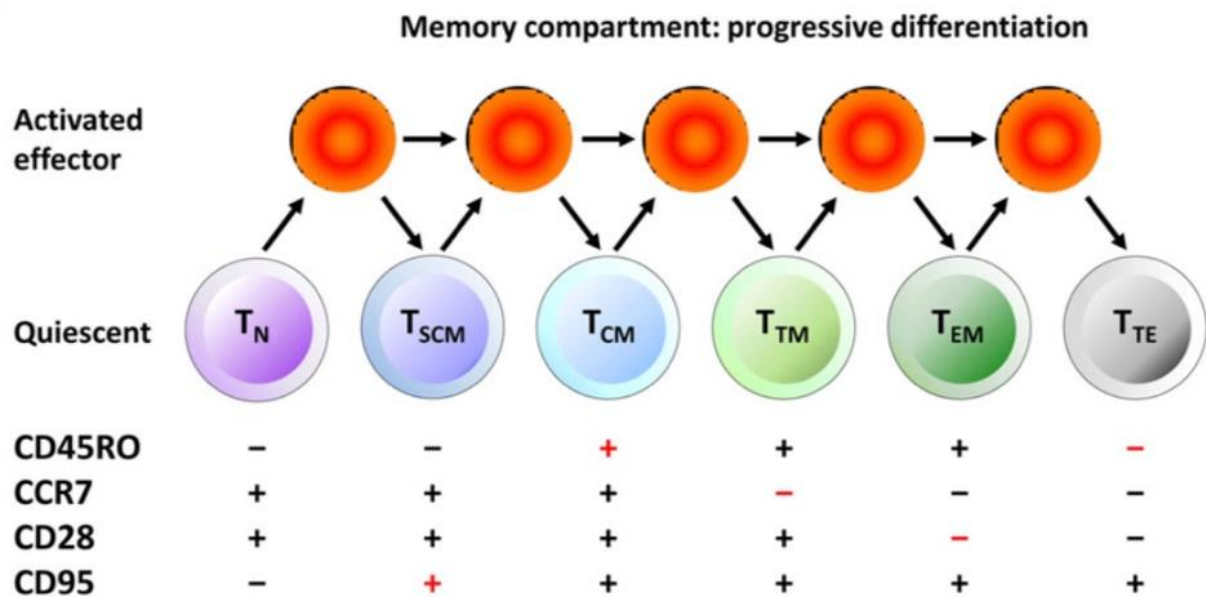


Abbildung 2. Die Heterogenität der T-Zellen in Abhängigkeit der Expression von CD45R0, CCR7 (eng., C-Chemokine receptor type 7), CD28 und CD95 (Mahnke et al., 2013).

2.3. Migration und Adhäsion der T-Zellen aus physiologischer Sicht und die beteiligten Zytokine

Eine wichtige Eigenschaft von T-Zellen, die es ihnen ermöglicht, ihre Aufgaben zu erfüllen, ist die Fähigkeit, aus dem Blut in verschiedene Körpergewebe zu migrieren. Diese sogenannte Extravasation wird von einem vielschrittigen Prozess kontrolliert, bei dem Adhäsionsmoleküle, wie Selektine, Chemokinrezeptoren und Integrine, benötigt werden, um die Anheftung, die Bewegung und eine Adhäsion der zirkulierenden T-Zellen an die Endothelzellen zu gewährleisten und letztendlich zu einer transendothelialen Migration zu führen. Nachdem sie die Endothelien und die subendotheliale Basalmembran passiert haben, migrieren T-Zellen

durch die interstitiellen Gewebe und siedeln sich in unterschiedlichen Milieus an. Dabei folgen sie Chemokingradienten, die von gewebspezifischen oder gewebsinfiltrierenden Zellen gebildet werden. Die Spezifität dieses Prozesses wird durch eine unterschiedliche Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen und ihren Liganden auf Endothelzellen und Geweben bestimmt (Ley et al., 2007). In **Abbildung 3** werden die Schritte der Migration sowohl schematisch (Abbildung 3A), als auch unter dem Elektronenmikroskop (Abbildung 3B) dargestellt.

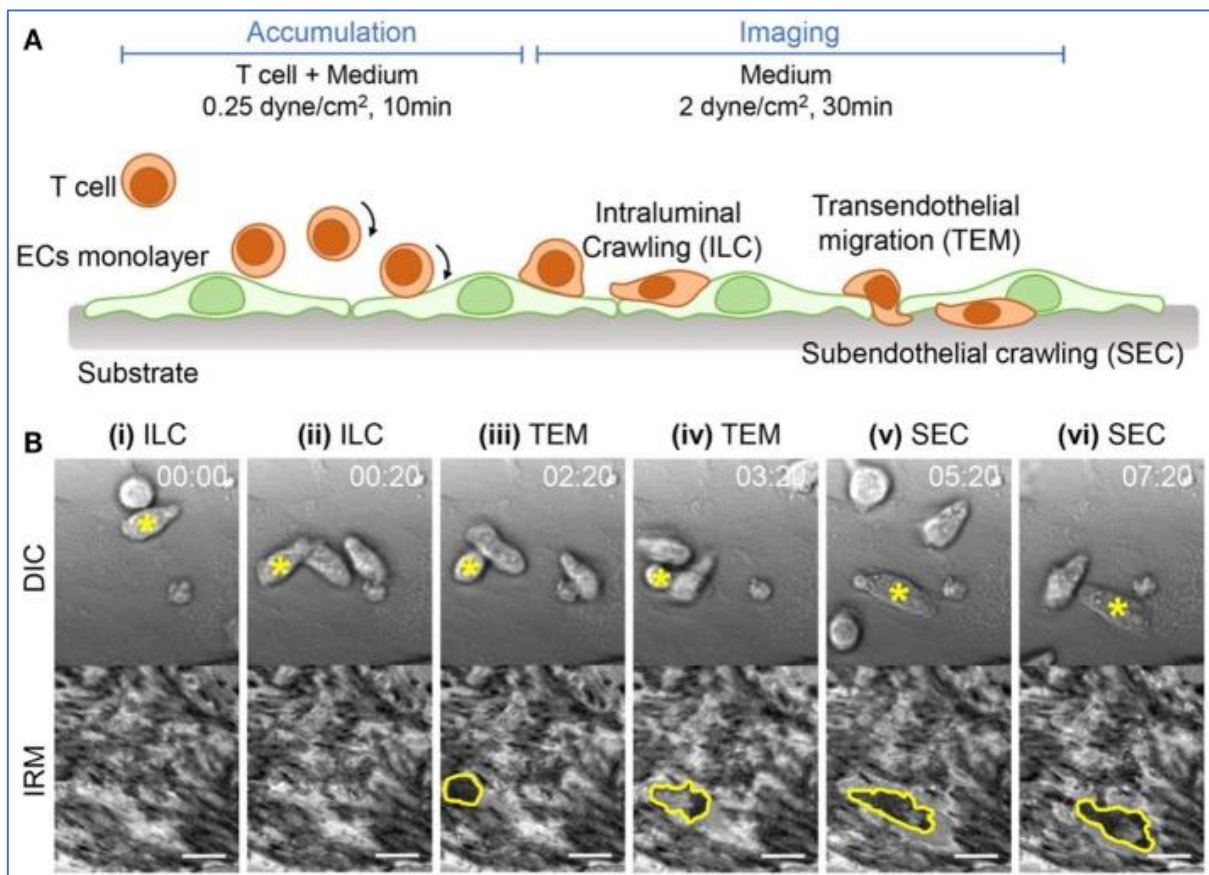


Abbildung 3. Schematische Illustration der T-Zell-Migration (Lee et al., 2018).

Die Lymphozyten sind die Zellen, die bei Säugetieren die größten Distanzen bei einer Migration zurücklegen können. Sie durchwandern im menschlichen Körper unter anderem die sekundären lymphatischen Organe, die mesenterischen Lymphknoten, die Milz und das darmassoziierte lymphatische Gewebe, wie z.B. die Peyer-Plaques. Nach der Immunantwort patrouillieren einige langlebige Gedächtnis-T-Zellen durch den Körper und weisen dabei

gewebsspezifische Rezirkulationswege durch Darm, Haut und sekundäre lymphatische Organe auf (Stein und Nombela-Arrieta, 2005).

Es existieren zwei Prozesse, die entscheidend für die Initiation und die Effektivität einer Immunantwort sind. Diese Prozesse sind die Migration von T-Zellen zu unterschiedlichen Geweben und die Adhäsion von T-Zellen an andere Zellen. Auf der Suche nach einem passenden Antigen bewegen sich T-Zellen in unserem Körper zwischen dem Blut und verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben. Es konnte sehr gut dargestellt werden, welche die molekularen Prinzipien dieses migratorischen Verhaltens von T-Zellen sind, speziell wurde eine Hypothese darüber aufgestellt, dass die Migration von T-Zellen aus vier aufeinanderfolgenden Schritten besteht (von Andrian und Mackay, 2000):

- Schritt 1: Die T-Zellen rollen durch die Blutgefäße, werden an Selektine gebunden und bewegen sich dann zu den zugehörigen Liganden im Endothel.
- Schritt 2: Chemokine und andere Entzündungsmediatoren aktivieren Integrine auf den T-Zellen.
- Schritt 3: Integrine binden an die Endothelliganden und führen somit zu einer Adhäsion der T-Zellen an die Gefäßwand.
- Schritt 4: T-Zellen wandern durch das Endothel in ihr entsprechendes Zielgewebe.

Die adhäsiven Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix sind für alle Entwicklungsprozesse wichtig, aber sie spielen eine zentrale Rolle in der Funktion des Immunsystems während des Lebens. Drei Familien von Zelloberflächenmolekülen regulieren dabei die Migration von Lymphozyten und die Interaktionen der aktivierten Zellen während der Abwehrprozesse (Springer, 1990). Schnelle Veränderungen zwischen adhäsiven und nicht-adhäsiven Zuständen sind von entscheidender Wichtigkeit für duale Funktionen der Immunoberfläche und der Immunantwort. Die drei Familien von Zelloberflächenmolekülen, die die Interaktionen vermitteln, sind die Immunglobuline, inklusive der antigenspezifischen Rezeptoren von T- und B-Lymphozyten; die Integrine, die für die dynamische Regulation von Adhäsion und Migration wichtig sind; und die Selektine, wie z.B. CD62L, die während der lymphozytären und neutrophilen Interaktion mit dem Gefäßendothel vermehrt arbeiten (Parrott und Wilkinson, 1981).

Inzwischen wurden drei Moleküle identifiziert, die für die antigenunabhängige Adhäsion zuständig sind, die durch verlängerte antigenische Stimulation von T-Zellen *in vitro* ausgelöst werden kann: LFA1, LFA2, LFA3 („lymphocyte function-associated antigen“) (Spits et al., 1986). LFA1 gehört zu den Integrinen und wird auf T-Lymphozyten exprimiert. Sein

zugehöriger Rezeptor auf der Zielzelle ist ICAM1 oder ICAM2 (intercellular cell adhesion molecule), welche wiederum zu den Immunglobulinen gehören (Springer et al., 1987). LFA1 gehört zur Integrinfamilie, der vielleicht komplettesten aller Adhäsionsmolekülfamilien. Jedes Integrinmolekül besteht aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit und man unterscheidet drei Untergruppen aufgrund ihrer Beta-Untereinheiten: Beta1-CD29, Beta2-CD18, Beta3-CD61. LFA1 gehört zur Beta2-Familie und ist sehr stark verbunden mit zwei anderen Integrinen: MAC1 (eng., Macrophage-1-antigen) und p150,95, mit dem es sich die Beta2-Untereinheit teilt (Kishimoto et al., 1987). LFA2 gehört auch zu den Immunglobulinen und wird auch auf den T-Lymphozyten exprimiert. Sein zugehöriger Rezeptor auf der Zielzelle, LFA3, ist ebenfalls ein Immunglobulin (Bierer et al., 1989).

Die Beta1-Integrin-Untergruppe beinhaltet Rezeptoren, die an die Extrazellulärmatrix-Komponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen binden können. Diese Rezeptoren spielen eine generelle Rolle in der Organisation von Geweben durch die Verbindung von Zellen der Extrazellulärmatrix in vielen Geweben und der Basalmembran, z.B. in Muskeln, Nervenzellen, Epithel und Endothel (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Die Beta1-Familie wird auch VLA-Familie (eng., „very late antigen“) genannt, weil VLA1 und VLA2 erst zwei bis vier Wochen nach einer Antigenstimulation auf Lymphozyten entstehen (Hemler, 1990).

Inflammatorische Mediatoren, wie Lipopolysaccharide, Gamma-Interferon und TNF (Tumornekrosefaktor) bewirken eine starke Induktion von ICAM1 in vielen verschiedenen Geweben und sie erhöhen dadurch auch die Bindung von Lymphozyten und Monozyten über das Zelloberflächenmolekül LFA1. Die Induktion von ICAM1 wird weitestgehend auf dem Level der mRNA (eng., messenger ribonuclein acid) reguliert (Springer et al., 1987).

Des Weiteren spielen die Chemokine CCR7 (eng., C-Chemokine receptor 7), CCL19 (eng., C-Chemokine ligand 19) und CCL5 (eng., C-Chemokine ligand 5) eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten. Chemokine sind Botenstoffe, die Leukozyten während einer Entzündungsreaktion zum entzündeten Gewebe locken und außerdem deren Migration aus dem Blut ins Gewebe beschleunigen. Zusätzlich fördern sie die Migration der Lymphozyten zu den sekundären lymphatischen Organen.

CCR7 ist ein Chemokinrezeptor der T-Zellen und wird vor allem auf den naiven T-Zellen, den zentralen T-Gedächtniszellen und den reifen dendritischen Zellen exprimiert. Dabei sind die CD4-positiven T-Zellen häufiger mit CCR7 besetzt als die CD8-positiven T-Zellen (Britschgi et al., 2018). CCR7 wird heute als ein Marker für die zentralen Gedächtnis-T-Zellen verstanden, der durch die sekundären lymphatischen Organe wandert. Studien haben gezeigt,

dass CCR7 nicht von T-Zellen exprimiert wird, die schnelle Effektorfunktionen erfüllen, und von zentralen Gedächtnis-T-Zellen, die extralymphatische Gewebe, wie die Haut, die Synovia oder die Lunge, infiltrieren (Debes et al., 2005).

CCR7 interagiert mit den CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 (eng., C-Chemokine ligand 21), die vor allem in dem hochendothelialen Venulen der sekundären lymphatischen Organe und im Lymphknotenparenchym zu finden sind. Wenn man Zellen mit CCL19 stimuliert, werden die CCR7 auf den Zelloberflächen schnell in das Zytoplasma internalisiert, was die Ligand-Rezeptor-Beziehung der beiden unterstreicht (Kobayashi et al, 2016). CCL19 unterstützt den durch Aktivierung induzierten Zelltod in Antigen-spezifischen CD4-positiven T-Zellen und reguliert die Mobilisierung der T-Zellen (Yan et al., 2019).

Es wurde gezeigt, dass CCL5 die in-vitro-Migration und die Rekrutierung von T-Zellen, dendritischen Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, NK-Zellen und Mastzellen zu den inflammatorischen Geweben induziert. CCL5 induziert die Chemotaxis bei aktivierten Gedächtnis-T-Zellen deutlich effektiver als andere Zytokine (Stanford et al., 2003). Dabei sind die relevantesten Rezeptoren CCR1 (eng., C-Chemokine receptor type 1), CCR3 und CCR5 (Marques et al., 2013). CCL5 spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration und Metastasierung von menschlichen Krebszellen. (Enarsson et al., 2004).

2.4. Das Verhältnis von Schlaf, zirkadianer Rhythmik und Immunsystem

Es ist schon länger bekannt, dass das Verhalten der einzelnen Immunzellen einer sogenannten zirkadianen Rhythmik unterliegt, d.h. tageszeitliche Schwankungen zeigt. Diese zirkadiane Rhythmik wird von körpereigenen Uhren gebildet, die sich auch in den Zellen des Immunsystems finden. Die meisten Immunzellen exprimieren zirkadiane Schrittmachergene und zeigen eine weitgefächerte Auswahl an Genen, die nach einem 24-Stunden-Rhythmus exprimiert werden. Dies hat tiefe Einflüsse auf zelluläre Funktionen, z.B. auf einen täglichen Rhythmus in der Synthese und Abgabe von Zytokinen, Chemokinen und zytolytischen Faktoren, auf die tägliche Steuerung der Immunantwort durch die sogenannten „pattern recognition receptors“ sowie auf zirkadiane Rhythmen in den zellulären Funktionen Phagozytose, Migration zu entzündeten Geweben, zytolytischer Aktivität und der proliferativen Antwort auf Antigene. Dementsprechend führen Veränderungen des zirkadianen Rhythmus, wie z.B. eine Schrittmachergen-Mutation in Mäusen oder Umweltveränderungen, die einer

Schichtarbeit ähneln, zu verschlechterten Immunantworten (Labrecque und Cermakian, 2015). Diese zirkadiane Rhythmik ist in **Abbildung 4** schematisch dargestellt.

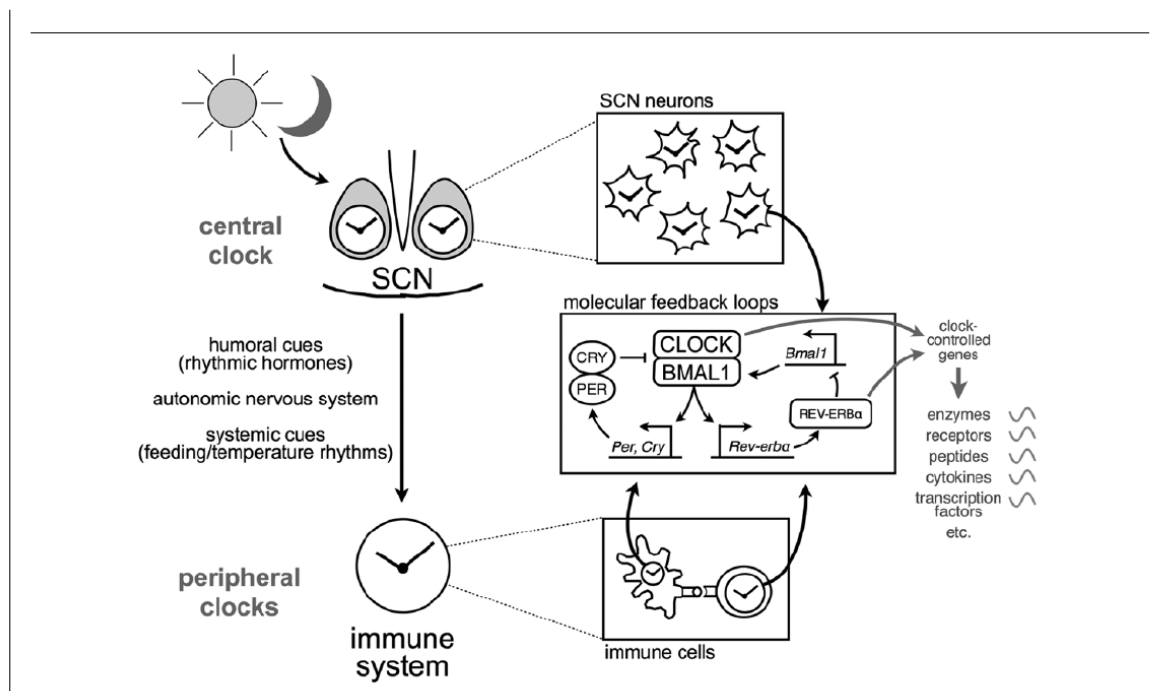


Abbildung 4. Das zirkadiane System und molekulare zirkadiane Mechanismen (Labrecque und Cermakian, 2015).

Einige wenige Studien haben ausgewertet, ob die B- und T-Zellen unterschiedliche „Urgene“ exprimieren und ob diese Expression rhythmisch erfolgt. In Maus-Lymphknoten, die hauptsächlich B- und T-Zellen enthalten, werden einige zirkadiane Gene rhythmisch exprimiert, und dieser Rhythmus wird in Mäusen mit künstlich erzeugten Mutationen dieser Gene negativ verändert (Fortier et al., 2011).

Es wurde schon früh erkannt, dass die Anzahl von Leukozyten im Blut in einer zirkadianen Art und Weise variiert. In menschlichen Blutsammlungen sind die Anzahlen von B- und T-Zellen nachts generell hoch, sinken zum Morgen hin ab und verbleiben niedrig über den folgenden Tag (Besedovsky et al., 2014a). Unter den T-Lymphozyten zeigen die naiven T-Zellen, die zentralen Gedächtnis-T-Zellen und die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gleiche Rhythmen. Der morgendliche Abfall der T-Zellzahlen im menschlichen Blut ist mit dem morgendlichen Anstieg von Cortisol vergesellschaftet. Wenn man den morgendlichen Anstieg von Cortisol bei gesunden Proband*innen mit dem Medikament Metyrapon verhindert, sinken auch die T-Zellzahlen im Blut nicht (Besedovsky et al., 2014a).

Zusätzlich zum zirkadianen Rhythmus hat Schlaf einen maßgeblichen Einfluss auf verschiedene Immunfunktionen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Schlaf nach einer Impfung die adaptive Immunantwort fördert (Lange et al., 2011). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch spekuliert worden, dass Schlaf über eine Förderung der T-Zellmigration in die Lymphknoten die Entstehung einer adaptiven Immunantwort unterstützt (Besedovsky et al., 2019).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Blut bei nachts schlafenden Proband*innen eine signifikante Reduktion der totalen Anzahl von CD4-positiven T-Lymphozyten und CD8-positiven T-Lymphozyten im Vergleich zu nächtlich wachen Proband*innen stattfindet. Der Effekt der Reduktion begann in den Untersuchungen zwischen 0.30 Uhr und 2 Uhr (Besedovsky et al., 2016).

Eine Übersichtsarbeit von den Kollegen Besedovsky et al. aus dem Jahr 2011 zeigten außerdem: Für die meisten Lymphozytenuntergruppen, die untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Schlaf, im Vergleich zu einer kontinuierlichen Wachheit, die Zellzahlen im Blut während der Nacht reduziert. Dieser Abfall der Zellzahl wird folglich bei der täglichen Aktivität wieder durch eine Erhöhung der Zellzahlen im Blut kompensiert. Dies trifft für T-Helferzellen, aktivierte T-Zellen und NK-Zellen zu (deutsche Übersetzung aus Besedovsky et al., 2011).

2.5. Hypothesen

Aus den Vorarbeiten zu unserer Studie und den bereits durchgeführten Untersuchungen zum Verhalten menschlicher T-Zellen im Schlaf ergeben sich folgende Hypothesen für die vorliegende Studie:

1. Während des Schlafs sind im Blut weniger T-Zellen vorhanden als während der nächtlichen Wachheit.
2. T-Zellen normal schlafender Proband*innen zeigen im Vergleich zu T-Zellen von Proband*innen, die unter Schlafentzug stehen, eine verstärkte Migration zu CCL19, einem Chemokin, welches T-Zellen zu Lymphknoten führt.
3. Der Effekt von Schlaf auf die Migration von T-Zellen steht spezifisch unter dem Einfluss von CCL19, während andere Chemokine (hier exemplarisch am inflammatorischen Chemokin CCL5 untersucht) nicht daran beteiligt sind.

3. Material und Methoden

In den folgenden Abschnitten sollen die verwendeten Materialien und die angewendeten Methoden der durchgeführten Studie genauer erläutert werden.

3.1. Material

Folgende Materialien wurden für die Experimente während der Studie verwendet:

3.1.1. Chemokine

Zur Bestimmung der Chemokine, d.h. der Signalproteine unseres Körpers, die für die Chemotaxis, also das Anlocken von Zellen zu unterschiedlichen Geweben, verantwortlich sind, wurden folgende Analyseinstrumente verwendet:

- rekombinantes Humanes CCL19 (MIP-3 β) (carrier-frei) von BioLegend
- rekombinantes Humanes CCL5 (RANTES) (carrier-frei) von BioLegend

3.1.2. Antikörper

Zur Differenzierung der Zellzahlen in die verschiedenen Untergruppen, welche in unserem Experiment untersucht wurden, verwendeten wir folgende verschiedene Antikörper, also Proteine, welche spezifisch für die Epitope bestimmter Antigene sind:

- Alexa Fluor® 700 anti-humaner CD45RA Antikörper von BioLegend
- Brilliant Violet 421™ anti-humaner CD4 Antikörper von BioLegend
- Brilliant Violet 510™ anti-humaner CD3 Antikörper von BioLegend
- FITC anti-humaner CD62L Antikörper von BioLegend
- PerCP anti-humaner CD8a Antikörper von BioLegend

3.1.3. Puffer und Kulturmedien

Um einen reibungslosen Ablauf der Versuche im Zelllabor zu gewährleisten, wurden folgende Puffersysteme und Kulturmedien verwendet:

- Transwell® permeable Unterstutzungsmedien: Membraneinsatz 5µm von Corning Incorporated Life Sciences
- Corning® CellBIND® 24-well Clear Multiple Quellplatten mit flachem Boden, steril
- Phosphat-gepufferte Saline, pH 7.4, flüssig, steril-gefiltert, für Zellkulturen verwendbar

3.1.4. sonstige Lösungen

Zudem benötigten wir folgende Lösungen, um das Experiment durchführen zu können:

- 500 ml NaCl (Natriumchlorid) 0,9% Lösung der Firma Braun
- Lysing Solution 10X Konzentrat von BD Bioscience

3.1.5. Geräte

Abschließend war eine Vielzahl von Geräten notwendig, um die im Folgenden aufgeführten Versuche im Schlaflabor und im Zelllabor durchzuführen:

- Falcon® Rundboden-Polystyren-Röhrchen, 5 ml
- Absolutzählungsröhrchen von BD Trucount™ und BD Bioscience
- Monovetten der Firma Sarstedt:
 - - LiHep/2.7ml (orange)
 - - EDTA/7.5ml (rot)
 - - NaHep/2.7ml (grün)
 - - EDTA K3/4.9ml (lila)
 - - NaHep/10ml Vacutainer
- laboreigene EEG-Ag- und AgCl-Elektroden
- laboreigener EEG-Rekorder (BrainAmp-Verstärker der Firma Brain Products)
- Lic-2 Elektrodenpaste
- Leukoplast
- Eppendorf-Cups
- sterile Spritzen der Firma Braun in verschiedenen Größen (5, 10, 20 ml)
- periphere Venenverweilkatheter der Firma Braun (18 und 20 Ch)

- Standard-Infusionssysteme der Firma Braun
- Schlauchsystem „Heidelberger Verlängerung“
- laboreigene Zentrifuge

3.2. Methoden

Im folgenden Abschnitt sollen alle angewandten Methoden der Studie genauer beleuchtet werden.

3.2.1. Experimente am Menschen

Das Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie hat langjährige Erfahrung mit Schlafstudien am Menschen inklusive der Blutentnahmen. Die Blutentnahmen erfolgten nach der Anlage einer peripheren Venenverweilkanüle, die in der Nacht verweilte. Eine mögliche Komplikation war eine Entzündung der punktierten Vene, die aber nur sehr selten vorkommt. Die Proband*innen wurden vor der Studie sehr sorgfältig selektiert und aufgeklärt.

Die Voraussetzungen für eine Teilnahme an unserer Studie waren:

- allgemeine Gesundheit
- sehr gutes Deutsch (Niveau einer Muttersprache)
- Nichtraucher
- Normalgewicht – BMI (eng., body mass index) zwischen 20 und 25
- Alter zwischen 18 und 30 Jahre
- keine Schichtarbeit in den letzten sechs Wochen vor dem Experiment
- keine Einnahme von Medikamenten (außer Kontrazeptiva)
- ein regulärer Schlafrhythmus
- keine psychiatrischen, neurologischen, kardiovaskulären, pulmonalen, endokrinen und gastrointestinalen Vorerkrankungen
- keine regelmäßige Medikamenteneinnahme (außer Kontrazeptiva)
- Nichtraucher
- keine Schlafstörungen
- keine Blut- oder Plasmaspende bis zu vier Wochen vor und bis zum Ende des Experiments

- keine Flugreisen mit mehr als sechs Stunden Zeitverschiebung sechs Wochen vor und bis zum Ende des Experiments

Es gab eine Voruntersuchung des Blutes, die Entnahme dafür fand während der Probenacht statt. Dabei wurden Routineuntersuchungen vorgenommen, bei denen sich die Werte der Proband*innen im Normalbereich befinden sollten. Die Teilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis und eine schriftliche Einverständniserklärung war für jeden Proband*in obligatorisch. Beide Experimente wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen ohne Einwände begutachtet (Aktenzeichen 155/2016BO2, 26.07.2016).

An dieser experimentellen Studie nahmen 14 gesunde Proband*innen teil, davon sieben Frauen und sieben Männer mit einem Altersdurchschnitt von 23,9 Jahren und einer Standardabweichung von +/- 3,37 Jahren. Keiner der Proband*innen zeigte eine medizinische Vorgeschichte bezüglich chronischer Krankheiten oder psychischer Störungen. Eine akute Erkrankung wurde vor den Experimenten durch eine körperliche Untersuchung und Routinelaboruntersuchungen ausgeschlossen. Alle Teilnehmer hatten einen regulären Schlaf-Wach-Rhythmus, nahmen keine Medikamente ein und waren Nichtraucher. Alle Teilnehmer gaben Ihr Einverständnis zur Teilnahme in Abstimmung mit der Deklaration von Helsinki.

3.2.2. Experiment im Schlaflabor

Um den Effekt von Schlaf versus nächtliche Wachheit auf funktionelle Aspekte einzelner T-Zellen zu untersuchen, führten wir eine experimentelle Studie an gesunden Menschen durch. Dabei unterlag jeder Proband*in zwei experimentellen Bedingungen, bei denen die Überwachung für jeweils 24 Stunden erfolgte. In der Schlafbedingung durften die Proband*innen von 23:00 Uhr bis 7:00 Uhr im Schlaflabor schlafen. In der Wachbedingung wurden die Proband*innen während der Experimentalnacht in einer halbsitzenden Position bei schwachen Lichtverhältnissen sowie am darauffolgenden Tag wachgehalten. In beiden Bedingungen wurde um 22:00 Uhr das erste Mal Blut abgenommen, um Ausgangswerte für jeden Proband*in zu ermitteln. Danach entnahmen wir alle vier Stunden Blut, in welchem im weiteren Verlauf die wesentlichen Immunparameter bestimmt wurden. Diese dienten zur Phänotypisierung der Lymphozyten und für die Untersuchungen zur Beschreibung der T-Zell-Migration.

Zusätzlich fanden vier Blutentnahmen am Tag zu folgenden Uhrzeiten statt: 10:00, 14:00, 18:00 und 22:00 Uhr. Vor den Blutentnahmen am Tag sollten die Proband*innen jeweils

eine halbe Stunde in einer sitzenden Position verweilen, um eine vergleichbare Situation mit den Entnahmen in der Nacht zu schaffen.

Zusätzlich entnahmen wir von 23:00 bis 07:00 Uhr jede Stunde einmal Blut, in dem die rhythmischen Variationen von einigen schlafassoziierten Hormonen nachgewiesen werden sollten: GH (eng., growth hormone), Cortisol, Prolaktin und Aldosteron. Somit erhielten wir Daten für eine detaillierte Analyse von schlafabhängigen Hormonspiegelveränderungen und T-Zell-Funktionen.

Die Proband*innen erhielten während der Experimentalsitzung standardisierte Mahlzeiten um 08:00, 12:00 und 18:15 Uhr, um nahrungsabhängige Einflüsse unter Kontrolle zu halten. Um erhöhte Stresslevel zu vermeiden, konnten die Proband*innen während der Experimentalsitzung Wasser trinken, allerdings wurde die zugeführte Menge reglementiert. Über Nacht erhielten die Proband*innen über die Verweilkanüle eine Durchschnittsmenge von 800 ml Kochsalzlösung, die einerseits zur Entnahme über das nach außen führende Schlauchsystem, und andererseits zur Versorgung der Proband*innen über Nacht benötigt wurde. Durch das Schlauchsystem konnte gewährleistet werden, dass die Proband*innen von der Blutentnahme nur gering gestört werden und ihr Schlaf so nicht beeinträchtigt wird. Vor der ersten Blutentnahme und den Blutentnahmen am Experimentaltag wurden bei den Proband*innen diverse Vitalwerte gemessen, um ihre körperliche Verfassung beurteilen zu können: Herzfrequenz, Blutdruck und Temperatur.

Am Experimentaltag wurde den Proband*innen gewährt, nach dem Mittagessen im Abstand von jeweils vier Stunden für 15 bis 20 Minuten in Begleitung des Doktoranden nach draußen zu gehen. In der Wachbedingung war diese Aktivität hilfreich, um wach zu bleiben. Um 22:15 Uhr nach der letzten Blutentnahme (d.h. nach 24 Stunden im Schlaflabor) wurden die Proband*innen wieder ins häusliche Umfeld entlassen, um sich vom Experiment zu erholen. Am Folgetag nach dem Experiment gingen sie zunächst ihren alltäglichen Aktivitäten nach und kamen am Abend wieder zurück ins Schlaflabor. Dort wurde eine letzte Blutentnahme um 20:00 Uhr durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Immunparameter nach der Erholungsnacht wieder den Ausgangswerten entsprachen, die wir zu Beginn des Experimentes erhoben hatten. Der Ablauf des Experiments im Schlaflabor ist in der folgenden **Tabelle 2** noch einmal schematisch dargestellt.

Tabelle 2. Ablauf des Experimentes im Schlaflabor.

	Ablauf
20:30 Uhr	Ankunft des Proband*in, Instruktionen, Anlage der peripheren Venenverweilkanüle und des EEGs
22:00 Uhr	Blutentnahme 1
23:00 Uhr	Licht aus/an je nach Bedingung, Blutentnahme 2
00:00 Uhr – 06:00 Uhr	stündlich Blutentnahmen 3 – 9
01:00 Uhr	Blutentnahme 4
02:00 Uhr	Blutentnahme 5
03:00 Uhr	Blutentnahme 6
07:00 Uhr	Licht an bei Schlafbedingung, Blutentnahme 10
07:05 Uhr	Entfernung EEG, Toilettenpause, Dokumentation der zugeführten Infusionsmenge
08:00 Uhr	Frühstück
10:00 Uhr	Blutentnahme 11
12:00 Uhr	Mittagessen
12:45 Uhr	Spaziergang
14:00 Uhr	Blutentnahme 12
15:00 Uhr	Spaziergang
16:00 Uhr	Zwischenmahlzeit
18:00 Uhr	Blutentnahme 13, Abendessen
19:00 Uhr	Spaziergang
20:00 Uhr	Zwischenmahlzeit
22:00 Uhr	Blutentnahme 14, Entlassung des Proband*in, Dokumentation der zugeführten Flüssigkeit
	Erholungsnacht
	Folgetag
19:50 Uhr	Blutentnahme 15

Sieben Tage vor Beginn des Experiments wurden die Teilnehmer gebeten, ein Schlafprotokoll auszufüllen, um ihre Schlaf-Wach-Muster aufzuzeichnen. Außerdem wurden sie mit Uhren ausgestattet, die ihre körperliche Aktivität und ihre Aktivität bei Tageslicht aufzeichneten. Dies waren Modelle der Serie „MotionWatch 8“, CamNtech Ltd, Cambridgeshire, UK. Diese Uhren wurden bis zum Ende eines Experimentes getragen und die Auswertung der Bewegungsaufzeichnungen wurde verwendet, um einen regulären Schlaf-Wach-Rhythmus der

Proband*innen in der Woche vor dem Experiment und während des Experiments zu verifizieren. Alle Proband*innen hatten demnach einen regelmäßigen Schlaf-Wach-Rhythmus.

Zwischen beiden Experimentalbedingungen sollten bei allen Proband*innen mindestens vier Wochen Abstand sein, um ihnen einerseits eine adäquate Erholung von den multiplen Blutentnahmen zu ermöglichen und andererseits sollten bei den Frauen beide Bedingungen während dem Beginn der folliculären Phase des Menstruationszyklus (zwischen dem fünften und neunten Tag des Menstruationszyklus) stattfinden, um mögliche Effekte der Sexualhormone auf die zu untersuchenden Effekte vom Schlaf auf das T-Zellverhalten zu kontrollieren. Dieser Parameter konnte in der Studie nur bedingt umgesetzt werden, da kurzfristige Terminverschiebungen der Experimentalnächte durch Krankheit der Proband*innen oder anderweitige Verpflichtungen der Proband*innen entstanden. Immerhin konnte aber gewährleistet werden, dass jede Frau, die am Experiment teilnahm, beide Bedingungen in der gleichen Phase ihres Menstruationszyklus absolvieren konnte.

Um sich an die Experimentalbedingungen mit der Verweilkanüle, der Blutentnahme und dem EEG zu gewöhnen, nahmen alle Proband*innen an einer Probenacht unter der Schlafbedingung teil.

3.2.3. Polysomnographie und EEG-Analysen im Schlaf

Der Schlaf der Proband*innen wurde durch EEG-Elektroden an den Positionen C3 (eng., central 3) und C4 (eng., central 4) (mit Referenzelektroden an den Processus mastoidei), sowie bipolaren EOG- und EMG-Ableitungen (EMG-Elektroden positioniert am Kinn) nach dem internationalen 10-20-System polysomnographisch aufgezeichnet. Die einzelnen Schlafstadien wurden dann in 30-Sekunden-Abschnitten mittels standardisierter Regeln nach Rechtschaffen & Kales bestimmt.

3.2.4. Prinzipien der Fluozytometrie

Die Fluozytometrie ist eine weit verbreitete Methode, um die Expression von Zelloberflächen- und intrazellulären Molekülen zu messen, sie zu charakterisieren und unterschiedliche Zelltypen in heterogenen Zellpopulationen zu definieren. Außerdem kann man mit dieser Methode die Reinheit einer isolierten Subpopulation bestimmen, sowie die Zellgröße und das

Zellvolumen dieser analysieren. Sie ermöglicht also eine multiparametrische Analyse von einzelnen Zellen (Cossarizza et al., 2017).

Wenn eine Sammlung von Partikeln in Lösung in ein Fluozytometer injiziert wird, werden die Partikel zufällig im dreidimensionalen Raum verteilt. Deswegen muss die Sammlung in einen Strom von einzelnen Partikeln organisiert werden, der von dem Detektorsystem der Maschine untersucht werden kann. Dieser Prozess wird durch ein Strömungssystem erreicht. Dieses bilden ein zentraler Kanal, durch den die Sammlung injiziert wird, und eine äußere Schicht, die eine schneller fließende Strömung beinhaltet. Wenn sich die äußere Strömung bewegt, entsteht ein massiver Zuggesamt auf die immer enger werdende zentrale Kammer. Diesen Effekt bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung (Cossarizza et al., 2017). Er ist in der **Abbildung 5** noch einmal schematisch dargestellt.

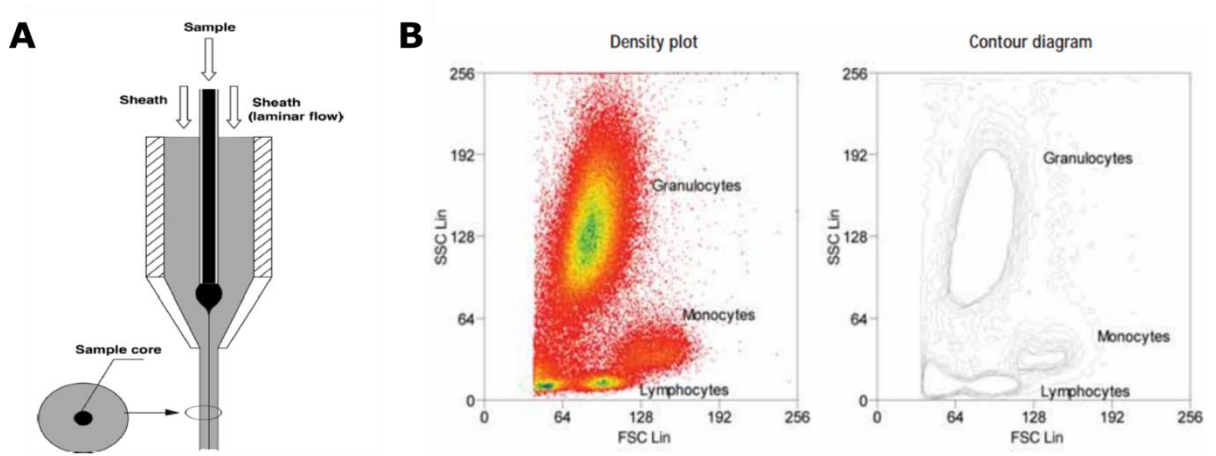


Abbildung 5. (A) Zentralkanal nach hydrodynamischer Fokussierung bei laminarer Strömung in einem Fluozytometer (Crosland-Taylor, 1953). (B) Analyse von Blutzellen in der Fluozytometrie unter Verwendung von FSC (eng., forward scatter canal) und SSC (eng., side scatter canal) (Rahman, et al., 2006).

Nach der hydrodynamischen Fokussierung passiert jeder Partikel mehrere Lichtstrahlen. Der Laser und die Bogenlampe sind die bekanntesten Lichtquellen, die in der modernen Fluozytometrie benutzt werden. Licht, das nach vorn streut, typischerweise 20 Grad von der Achse des Laserstrahls, wird von einer Linse gesammelt, die man als Vorwärtsstreuungskanal (FSC – „forward scatter canal“) bezeichnet. Die FSC-Intensität entspricht in etwa der Partikelgröße und kann so auch dazu verwendet werden, zwischen

Zelldebris und lebenden Zellen zu unterscheiden. Licht, das in einem Winkel von 90 Grad zum Ausgangspunkt gemessen wird, bezeichnet man als Seitenstreuung. Der Seitenstreuungskanal (SSC – „side scatter canal“) gibt Aufschluss darüber, wie hoch der granuläre Inhalt eines Partikels ist. FSC und SSC sind für jeden Partikel individuell und eine Kombination der beiden Kanäle kann dafür verwendet werden, unterschiedliche Zelltypen in einer heterogenen Sammlung zu unterscheiden. Die Richtung des Lichts, das von der Zelle abgestrahlt wird, korreliert mit der Zellgröße (FS – „forward scatter“ - Vorwärtsstreuung) und der Zellgranularität (SS – „side scatter“ - Seitstreuung). Ein hilfreiches Beispiel dafür ist der Blutfluss durch das Zytometer: größere und granulärere Granulozyten produzieren eine große Population mit viel SS und FS. Monozyten sind große, wenig granuläre Zellen, also produzieren sie eine separate Population mit viel FS und wenig SS. Lymphozyten und Lymphoblasten produzieren eine separate Population mit wenig FS und wenig SS, da sie sowohl klein als auch wenig granulär sind. So können die Zellen anhand ihrer FS und SS in zwei verschiedene Populationen unterteilt werden, was wiederum in **Abbildung 5** dargestellt wird. Mithilfe dieser Technologien kann man eine exakte Sortierung der Zellen vornehmen, die man auch als FACS (eng., fluorescence-activated cell sorting) -Analyse bezeichnet (Cossarizza et al., 2017).

Bei dieser FACS-Analyse sind die Partikel zusätzlich mit Fluorochromen besetzt. Fluorochrome sind Färbemittel, die Lichtenergie ab einer gegebenen Wellenlänge aufnehmen und diese in einer längeren Wellenlänge reemittieren. Diese zwei Prozesse bezeichnet man als Exzitation und Emission. Der Prozess der Emission folgt schnell, meist innerhalb weniger Nanosekunden, und bezeichnet die eigentliche Fluoreszenz eines Partikels. Der Nutzen einer fluoreszierenden Probe, wie z.B. fluorochromkonjugierter Antikörper, ist der, dass man ein entsprechendes Epitop direkt untersuchen kann und seine biologischen und biochemischen Eigenschaften leichter messen kann. Fluoreszente Proben können bei einer Vielzahl von Untersuchungen nützlich sein: bei der Identifizierung und Quantifizierung von unterschiedlichen Zellpopulationen, Zelloberflächenrezeptoren oder intrazellulären Organellen, bei der Zellsortierung, bei der Immunphänotypisierung oder bei Calciumeinstromexperimenten (Cossarizza et al., 2017).

3.2.5. Experiment im Zelllabor

Im folgenden Abschnitt sollen die Experimente dargestellt werden, die mit dem Blut der Proband*innen gemacht wurden. Generell wurden in diesen Experimenten folgende Parameter bestimmt:

- allgemeine Zellzahlen im Blut
- T-Zellen-Phänotypisierung unter Verwendung von FACS:
 - naive T-Zellen, T_N : CD45RA⁺, CD62L⁺
 - zentrale Gedächtnis-T-Zellen, T_{CM} : CD45RA⁻, CD62L⁺
 - Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, T_{EM} : CD45RA⁻, CD62L⁻
 - terminale Effektor-T-Zellen, T_{TE} : CD45RA⁺, CD62L⁻
 - alle jeweils in der CD4⁺- und CD8⁺-Untergruppe
- Migrationskapazität der folgenden Untergruppen gegenüber der Chemokine CCL19 und CCL5:
 - CD3-positive T-Zellen
 - CD4-positive T-Helferzellen
 - CD8-positive zytotoxische T-Zellen
 - In der CD4- und CD8-positiven Untergruppe:
 - naive T-Zellen, T_N : CD45RA⁺, CD62L⁺
 - zentrale Gedächtnis-T-Zellen, T_{CM} : CD45RA⁻, CD62L⁺
 - Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, T_{EM} : CD45RA⁻, CD62L⁻
 - terminale Effektor-T-Zellen, T_{TE} : CD45RA⁺, CD62L⁻

3.2.5.1. Messung der absoluten Zellzahlen

Unter Verwendung einer Lyse-no-wash-Fluozytometrie-Methode bestimmten wir die absoluten Zellzahlen von CD3-positiven T-Zellen, CD4-positiven T-Helferzellen, CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, sowie ihrer Untergruppen: T_N , T_{CM} , T_{SCM} , T_{TM} , T_{EM} und T_{TE} . Es erfolgte eine Immunfixation von 90 µl Blut mit anti-CD3/BV510, anti-CD4/BV421, anti-CD8/PerCP, anti-CD45RA/AF700, anti-CD62L/FITC (Firma BioLegend, San Diego, CA, USA) in TruCount-Röhrchen der Firma BD Biosciences aus San José in Kalifornien, USA. Nach 15 min Inkubation in Dunkelheit und bei Raumtemperatur wurden dann 900 µl einer FACS-Lyselösung der Firma BD Biosciences hinzugegeben, bevor das Ganze nochmal 15 Minuten inkubiert wurde. Zum Schluss wurden mindestens 10.000 CD3-positive T-Zellen im

Zellanalysegerät FACS-Calibur unter Verwendung der DIVA-Software der Firma BD-Biosciences analysiert. Wir berechneten die absolute Zellzahl pro μl unter Verwendung folgender Formel:

$$\begin{aligned} & \text{Zellen}/\mu\text{l} \\ & = \text{Zellevents im entsprechenden Bereich} \times \text{Anzahl der Ausschläge pro Röhrchen} \\ & \quad / \text{Anzahl der Ausschlagevents} \times \text{gesammeltes Blutvolumen in } \mu\text{l} \end{aligned}$$

3.2.5.2. Messung der Migrationskapazität

Bevor das Experiment starten konnte, mussten die Chemokin-Aliquoten aufgetaut und gedreht werden. Nach der Inkubationszeit musste der Antikörper-Mastermix für alle Experimente erstellt werden, genauso wie 45 ml der Lyselösung in einer Konzentration von 1:10. Die Zentrifuge musste gestartet werden.

Die Chemotaxis-Assays wurden unter Verwendung von Polycarbonat-Membranen mit einer Porengröße von $5 \mu\text{m}$ durchgeführt. Diese tragen den Markennamen „Transwell inserts“ und stammen von der Firma Corning Incorporated in Tewksbury, MA, USA. Kurz gesagt, wurde zunächst eine Menge von $200 \mu\text{l}$ einer 1:4-Lösung aus dem gerade entnommenen Blut des Proband*in und der Chemikalie RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) in die obere Kammer des Systems gegeben. In der unteren Kammer wurde entweder PBS (eng., phosphate-buffered saline) mit rekombinantem humanen CCL19 (400 ng/ml) oder mit rekombinantem humanen CCL5 (400 ng/ml), beide Chemikalien stammen von BioLegend, oder PBS allein für das Beschreiben der spontanen Migration, gegeben. PBS wurde hierbei immer zuerst eingefüllt. Das totale Volumen entsprach in der unteren Kammer dabei $600 \mu\text{l}$. In der oberen Kammer wurden in den Eppendorfs $200 \mu\text{l}$ Blut mit $600 \mu\text{l}$ PBS ggf. in Verbindung mit CCL5 oder CCL19 zusammengebracht, danach bei geringer Geschwindigkeit gut gemischt und dann $200 \mu\text{l}$ der Mischung mit der $100\text{-}\mu\text{l}$ -Pipette Tropfen für Tropfen in die einzelnen Platten verteilt. Das Ganze wurde dann vier Stunden lang bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Nach vier Stunden unter Inkubation mit 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ wurden $100 \mu\text{l}$ der Flüssigkeit aus beiden Kammern entnommen und dann mit folgenden Antikörpern immunofixiert: anti-CD3/BV510, anti-CD4/BV421, antiCD8/PerCP, anti-CD45RA/AF700 und anti-CD62L/FITC, alle von der Firma BioLegend. Danach wurden die Zellen, die in die untere Kammer migriert waren, und die Zellen, die sich noch in der oberen Kammer befanden, gezählt. Dafür verwendeten wir ein BD LSR Fortessa Fluozytometer.

Zur Berechnung wurde ein Migrations-Index gebildet:

$$\left(\frac{\text{Zahl der migrierten Zellen}}{\text{Zahl der nicht migrierten Zellen}} \right) \times 100$$

Die gezielte Migration zu CCL19 und CCL5 wurde durch Subtraktion der jeweiligen Migrationsindices von dem Migrationsindex der PBS-Kontrolle errechnet.

3.2.6. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung von IBM SPSS Statistics, Version 26 (IBM Corp., Armonk, N.Y., US) durchgeführt. Wir verwendeten lineare gemischte Modelle (engl., linear mixed models, LMM), um den Einfluss von Schlaf auf die T-Zell-Zahlen und ihre Migration zu bestimmen. Die festen Effekte wurden mittels der konstanten Variablen Experimentalbedingung (schlafen vs. wach bleiben), Zeitpunkt der Blutentnahme (22, 2, 6, 10, 14, 18 Uhr und 20 Uhr am Folgetag des Experiments) und der Interaktion „Bedingung“ x „Zeit“ definiert. Die Variable „Proband*in“ wurde als Zufallsvariable definiert. Die erste Blutentnahme um 22 Uhr galt dabei als „Baseline“-Kovariate.

4. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Studie dargestellt werden.

4.1. Der Effekt von Schlaf auf die absoluten Zellzahlen der verschiedenen T-Zell-Untergruppen

Wie in den *Abbildungen 6, 7 und 8* und *Tabelle 3* erkennbar ist, reduzierte der Schlaf, verglichen mit nächtlicher Wachheit, die absoluten Zellzahlen der gesamten CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen, sowie die Anzahl aller CD4-positiven und CD8-positiven T-Zell-Untergruppen während der Nacht, bis auf die Untergruppen der **T_{TE}**. Die Veränderung der absoluten Zellzahlen über die Zeit war für alle Untergruppen signifikant.

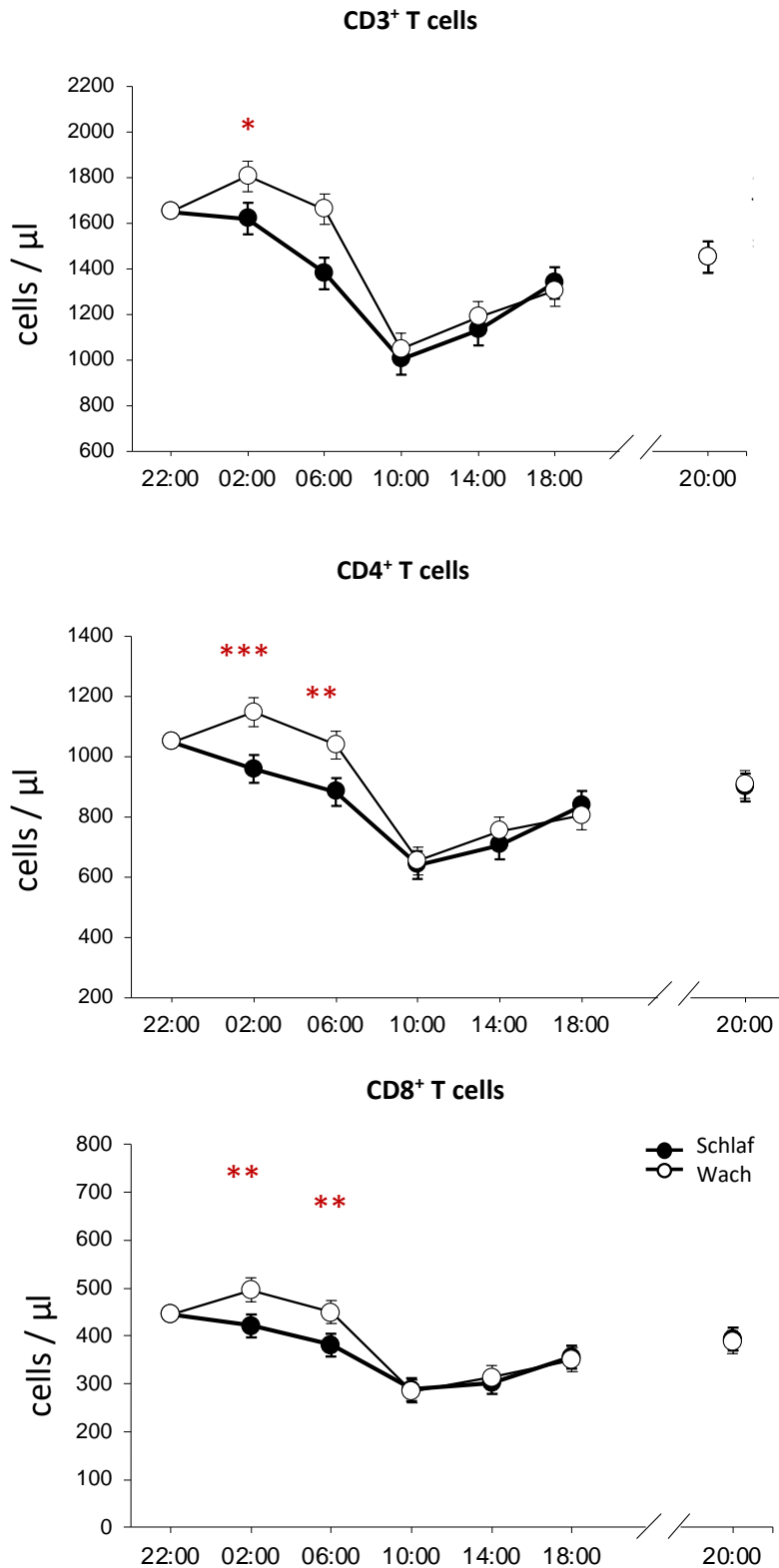


Abbildung 6. Effekt von Schlaf und nächtlicher Wachheit auf die absoluten Zellzahlen der zirkulierenden T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- Standardabweichung der Anzahl der zirkulierenden CD3-, CD4- und CD8- positiven T-Zellen.

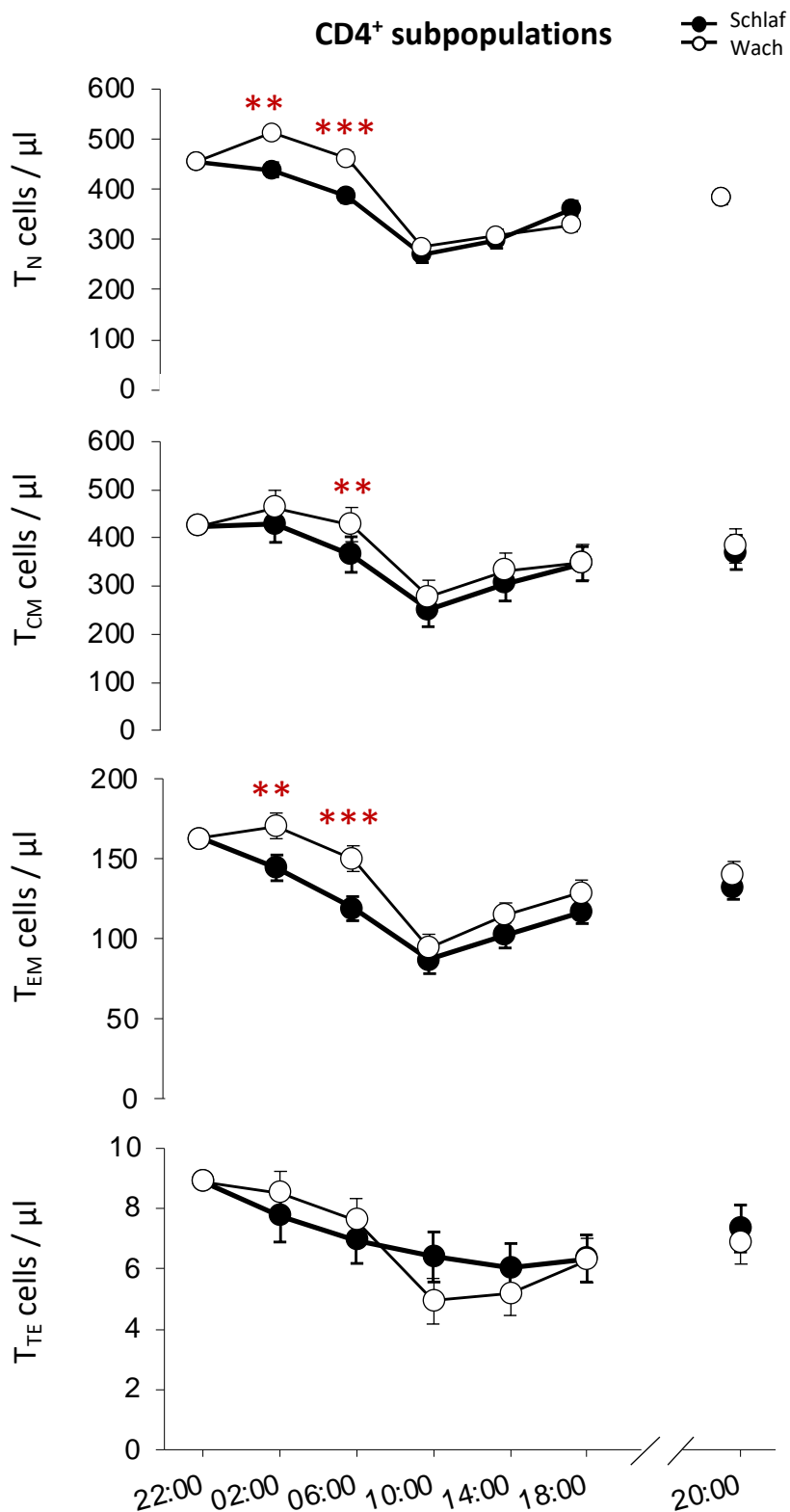


Abbildung 7. Effekt von Schlaf und nächtlicher Wachheit auf die absoluten Zellzahlen der zirkulierenden T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- Standardabweichung der Anzahl der zirkulierenden Subpopulationen der CD4-positiven T-Zellen.

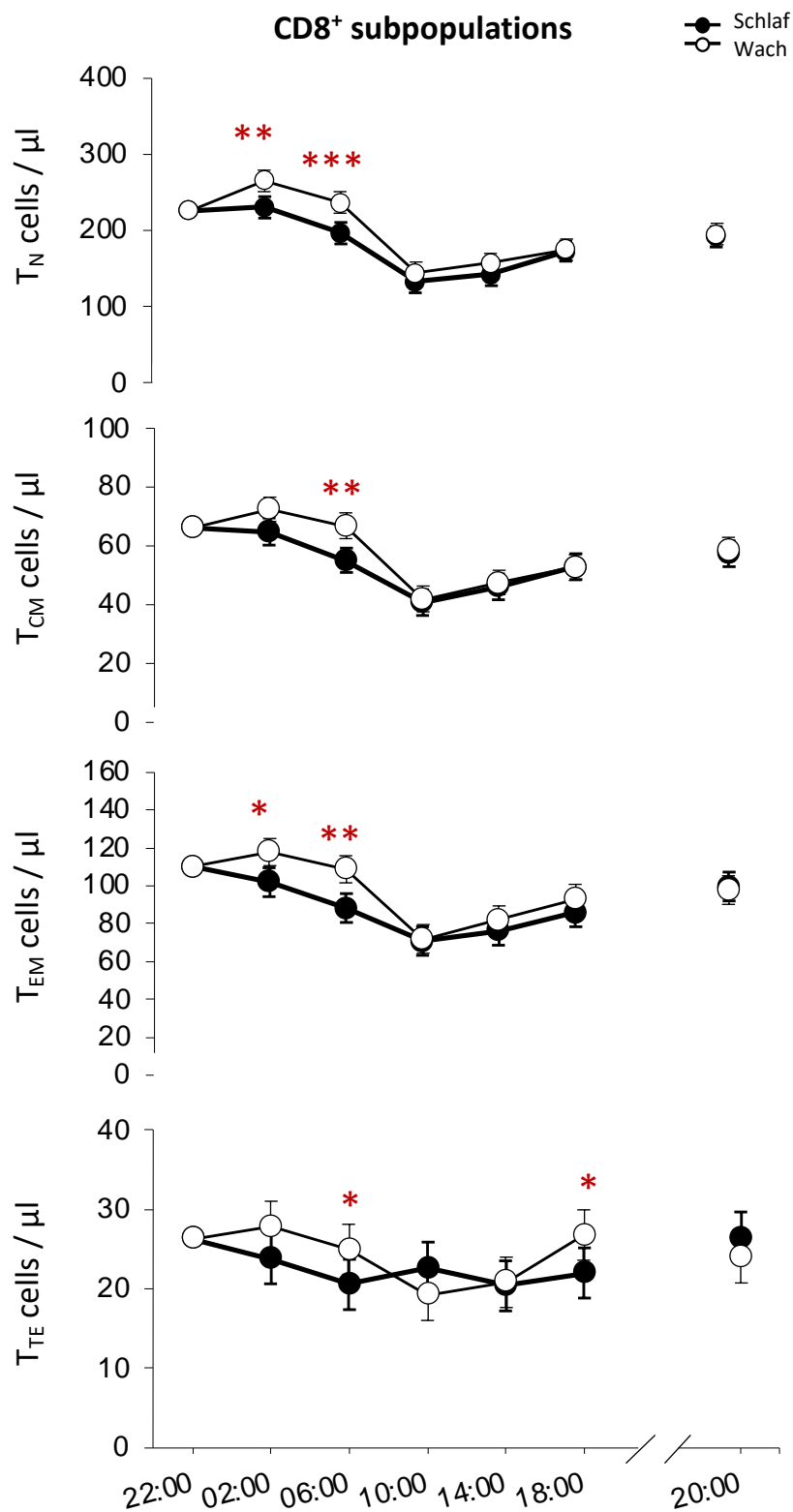


Abbildung 8. Effekt von Schlaf und nächtlicher Wachheit auf die absoluten Zellzahlen der zirkulierenden T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- Standardabweichung der Anzahl der zirkulierenden Subpopulationen der CD4-positiven T-Zellen.

Tabelle 3. Ergebnisse der linearen gemischten Modellanalyse für die absoluten Zellzahlen der im Blut zirkulierenden T-Zell-Untergruppen.

	Haupteffekt „Bedingung“	Haupteffekt „Zeit“	Interaktion „Bedingung“ x „Zeit“
CD3⁺	P = 0,005	P < 0,001	P = 0,027
CD4⁺	P = 0,008	P < 0,001	P = 0,038
T_{N4}	P = 0,032	P < 0,001	P = 0,027
T_{CM4}	P = 0,004	P < 0,001	P > 0,1
T_{EM4}	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,1
T_{TE4}	P > 0,1	P = 0,008	P > 0,1
CD8⁺	P = 0,030	P < 0,001	P = 0,060
T_{N8}	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,1
T_{CM8}	P = 0,026	P < 0,001	P > 0,1
T_{EM8}	P = 0,003	P < 0,001	P > 0,1
T_{TE8}	P > 0,1	P = 0,002	P = 0,019

4.2. Der Effekt des Schlafs auf die Migration der T-Zell-Untergruppen

Der genannte Effekt wurde in unserer Studie bezüglich der Spontanmigration von T-Zellen, ihrer Migration zu CCL19 und ihrer Migration zu CCL5 hin untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.2.1. Spontanmigration

Die Schlafbedingung in unserem Experiment erhöhte die spontane Migrationsrate aller CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen, wie in *Tabelle 4* und in den *Abbildungen 9, 10 und 11* gezeigt, mit einem signifikanten Unterschied am Tag nach der Experimentalnacht zwischen 10:00 und 14:00 Uhr. Außerdem gab es eine signifikante Erhöhung der spontanen Migration der T_{N4} , der T_{N8} , der T_{CM8} und der T_{TE8} T-Zell-Untergruppen in der Schlafbedingung im Vergleich zur Wachbedingung. Bei den T_{CM4} zeigte der Unterschied der beiden Bedingungen einen statistischen Trend ($p = 0,06$). Bei den T_{EM4} , T_{EM8} und T_{TE4} gab es keinen erkennbaren Unterschied zwischen der Schlaf- und der Wachbedingung. Eine weitere interessante Erkenntnis war, dass in den naiven Untergruppen und bei den T_{TE8} die Unterschiede in der spontanen Migration zwischen beiden Bedingungen nach der Erholungsnacht immer noch erkennbar und signifikant waren. Die T_N und die T_{CM} zeigten einen signifikant größeren Migrationsindex als die T_{TE} , was wir erwartet hatten.

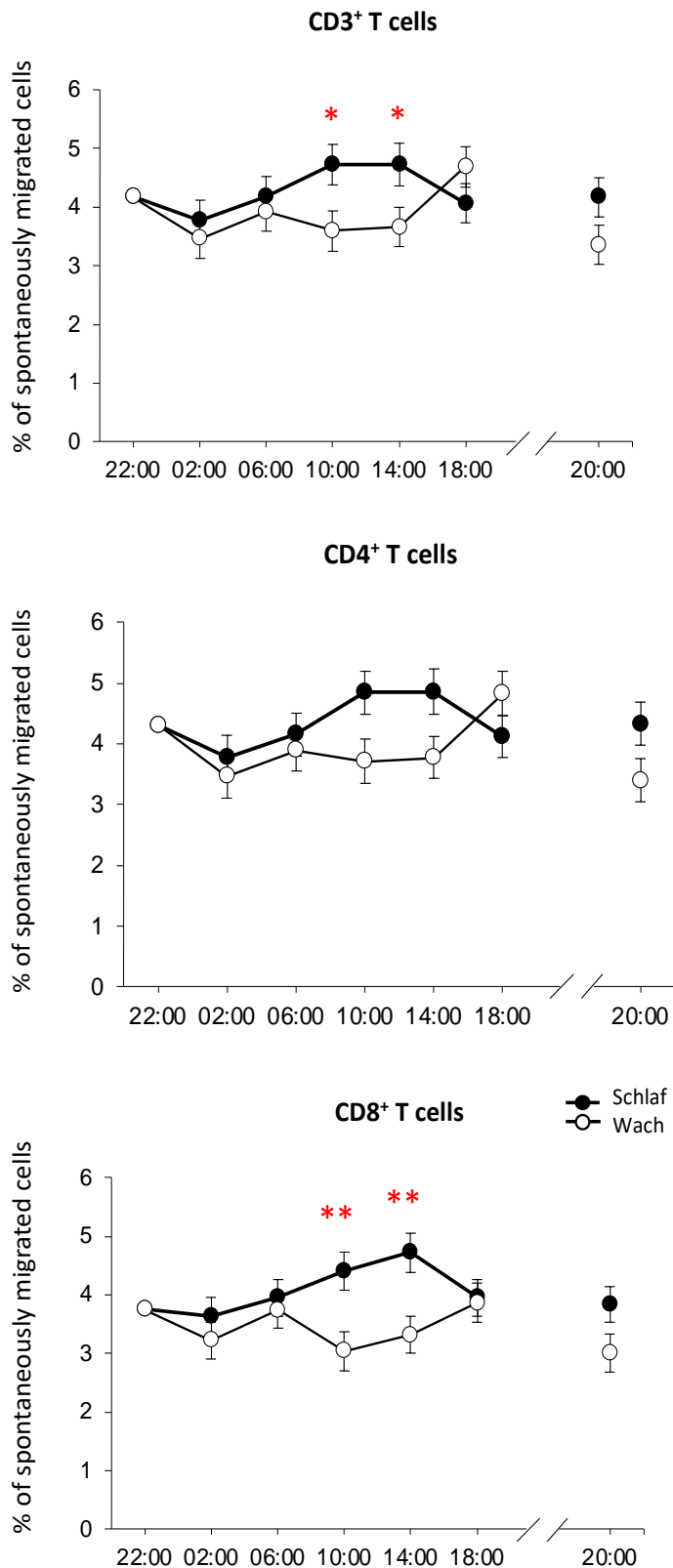


Abbildung 9. Effekt von Schlaf auf die Spontanmigration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten CD3-, CD4- und CD8- positiven T-Zellen in Abwesenheit eines chemotaktischen Stimulus (Spontanmigration).

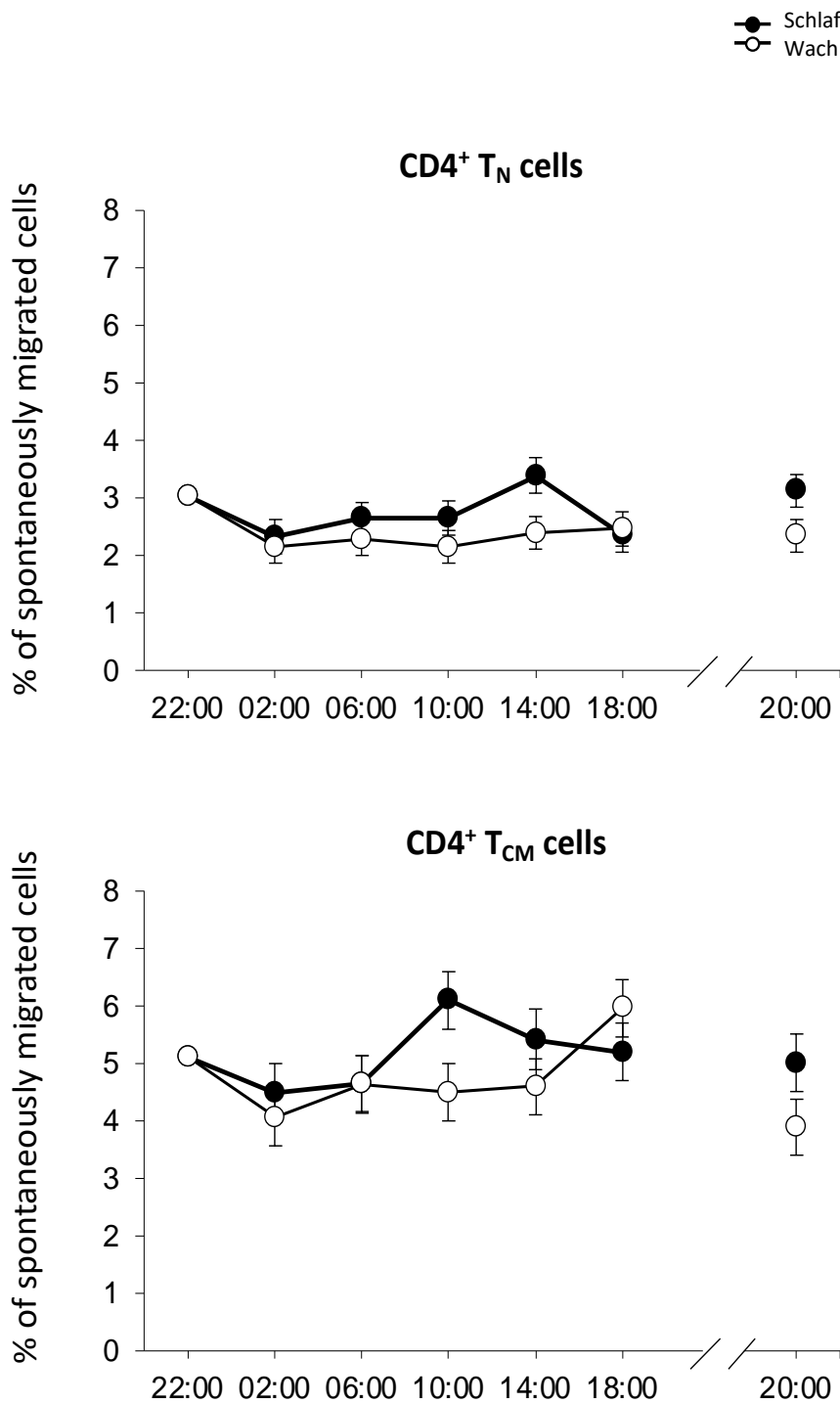


Abbildung 10. Effekt von Schlaf auf die Spontanmigration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten Subpopulationen der CD4- positiven T-Zellen in Abwesenheit eines chemotaktischen Stimulus (Spontanmigration).

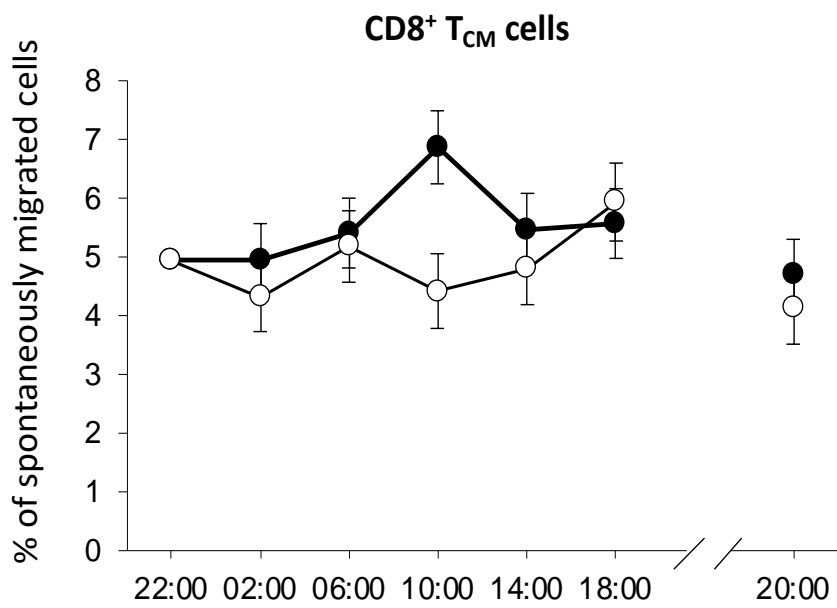
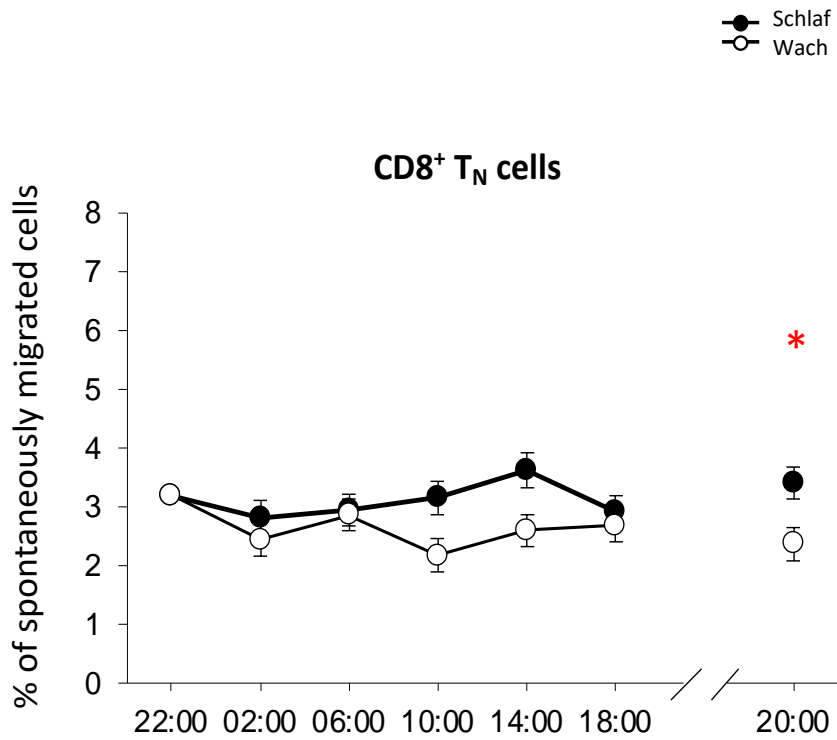


Abbildung 11. Effekt von Schlaf auf die Spontanmigration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten Subpopulationen der CD8- positiven T-Zellen in Abwesenheit eines chemotaktischen Stimulus (Spontanmigration).

Tabelle 4. Ergebnisse der linearen gemischten Modellanalyse für den spontanen Migrationsindex und die CCL19- und CCL5- abhängigen Migrationsindices in allen erforschten Zelluntergruppen. MI = Migrationsindex: migrierte Zellen in Anwesenheit des Chemokins CCL19 (CCL19 MI) oder CCL5 (CCL5 MI), oder in Abwesenheit der Chemokine (Spontanmigration).

	Spontaner MI	CCL 19 MI	CCL 5 MI
CD3⁺	P = 0,01	P = 0,004	P > 0,1
CD4⁺	P = 0,013	P = 0,014	P > 0,1
T_{N4}	P = 0,005	P = 0,015	P > 0,1
T_{CM4}	P = 0,06	P = 0,066	P > 0,1
T_{EM4}	P > 0,1	P > 0,1	P > 0,1
T_{TE4}	P > 0,1	P > 0,1	P > 0,1
CD8⁺	P < 0,001	P = 0,015	P > 0,1
T_{N8}	P < 0,001	P = 0,004	P > 0,1
T_{CM8}	P = 0,047	P > 0,1	P > 0,1
T_{EM8}	P > 0,1	P > 0,1	P > 0,1
T_{TE8}	P = 0,002	P > 0,1	P > 0,1

4.2.2. Migration zu CCL19

Außerdem erhöhte der Schlaf die direkte Migration zu CCL19 bei allen CD3-, CD4- und CD8-positiven Zellen und bei den T_{N4} und T_{N8}, was anhand von *Tabelle 4* und den *Abbildungen 12, 13 und 14* gezeigt wird. Bei allen anderen Untergruppen gab es keinen signifikanten Unterschied auf die direkte Migration zu CCL19. Auch bei der direkten Migration zu CCL19 waren die Unterschiede zwischen beiden Bedingungen noch nach der Erholungsnacht erkennbar.

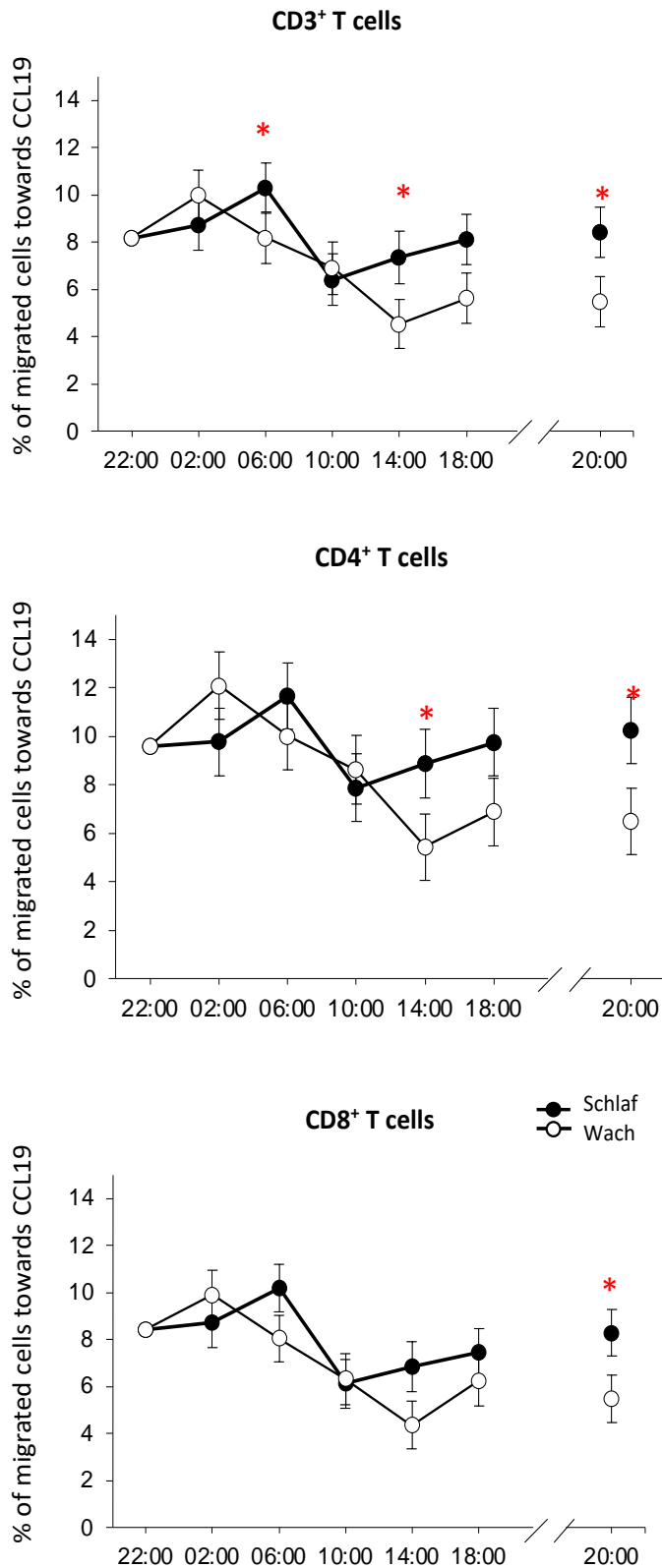


Abbildung 12. Effekt von Schlaf auf die CCL19-gerichtete Migration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen in Anwesenheit von CCL19.

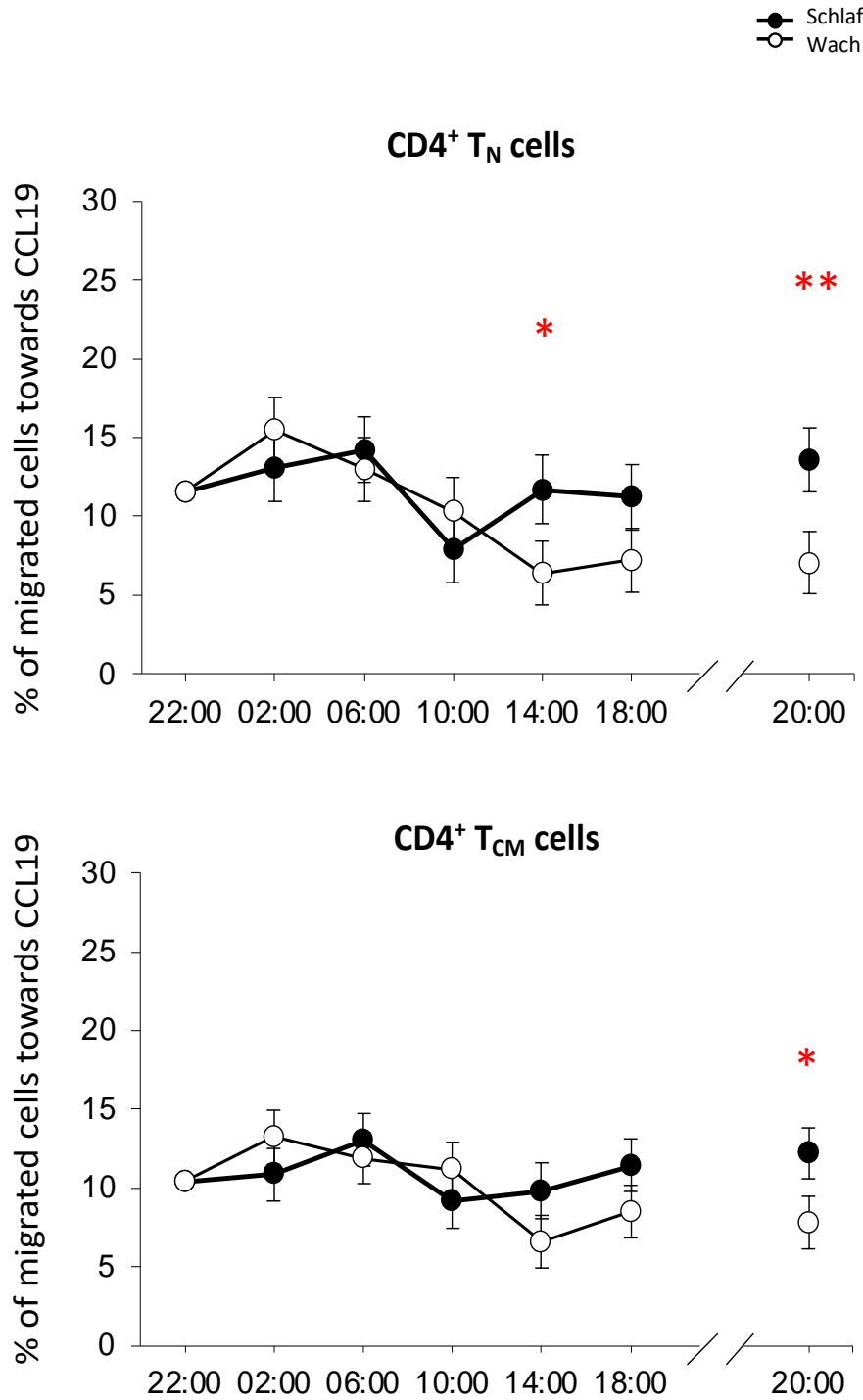


Abbildung 13. Effekt von Schlaf auf die CCL19-gerichtete Migration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten Subpopulationen der CD4-positiven T-Zellen in Anwesenheit von CCL19.

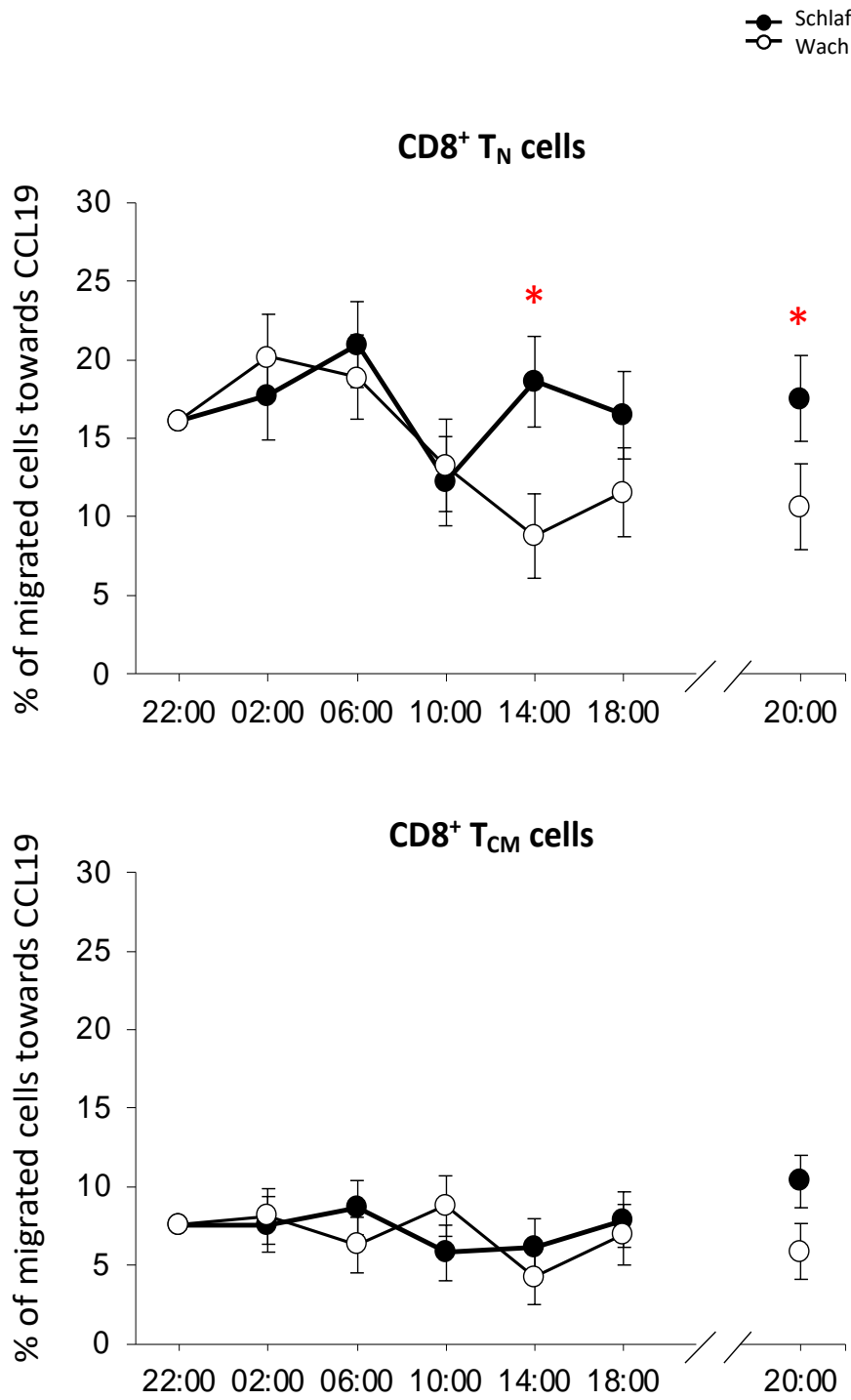


Abbildung 14. Effekt von Schlaf auf die CCL19-gerichtete Migration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten Subpopulationen der CD8-positiven T-Zellen in Anwesenheit von CCL19.

4.2.3. Migration zu CCL 5

Um zu sehen, ob der Effekt von Schlaf auf die T-Zell-Migration spezifisch für das Homing zu den Lymphknoten ist, haben wir dann das Migrationspotenzial der T-Zellen gegenüber dem Chemokin CCL5 untersucht, das T-Zellen zu entzündetem Gewebe lockt. Im Vergleich zur Migration zu CCL19, veränderte sich die Migration zu CCL5 in keiner der Untergruppen, die im Experiment untersucht wurden, in Bezug auf die unterschiedlichen Experimentalbedingungen, was wiederum in *Tabelle 4* und den *Abbildungen 15, 16 und 17* gezeigt wird.

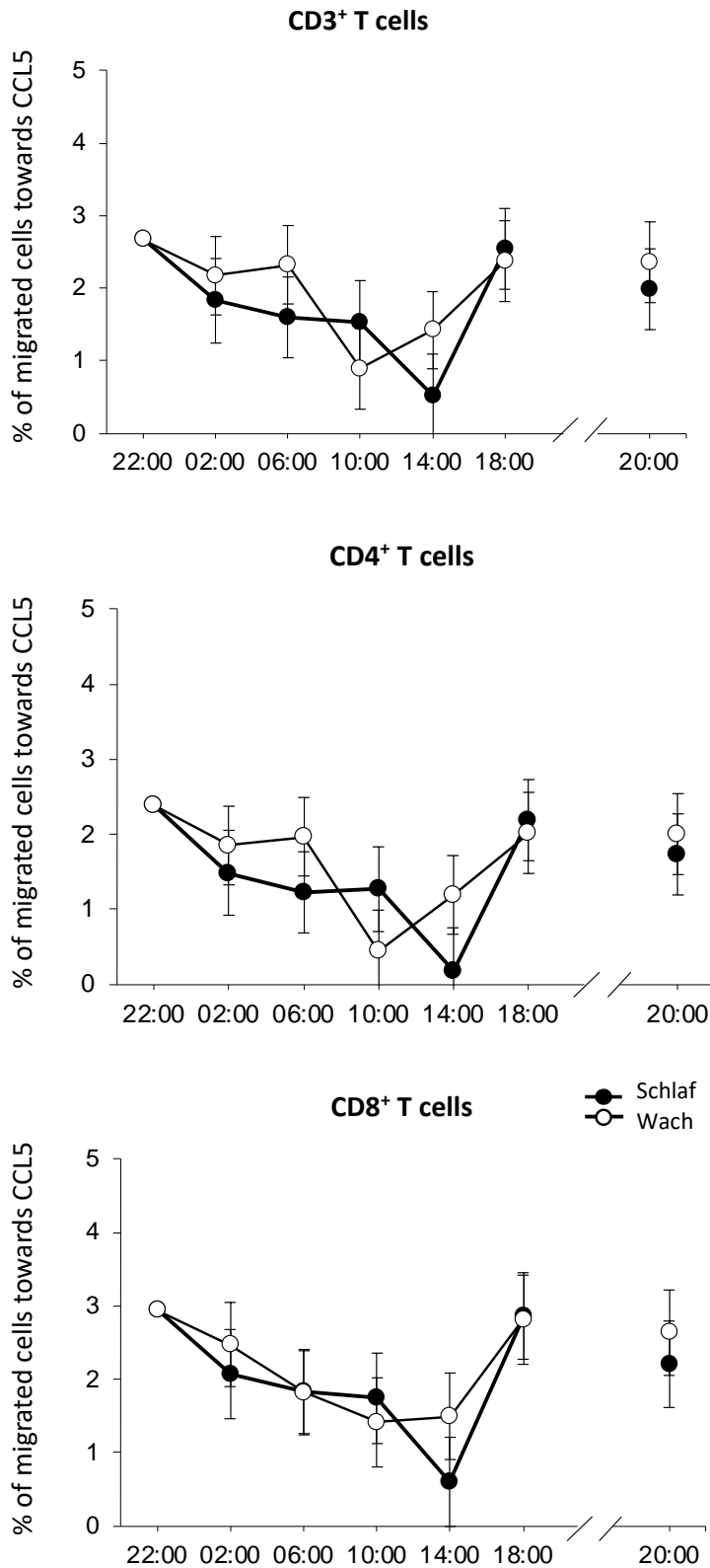


Abbildung 15. Effekt von Schlaf auf die CCL5-gerichtete Migration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen in Anwesenheit von CCL5.

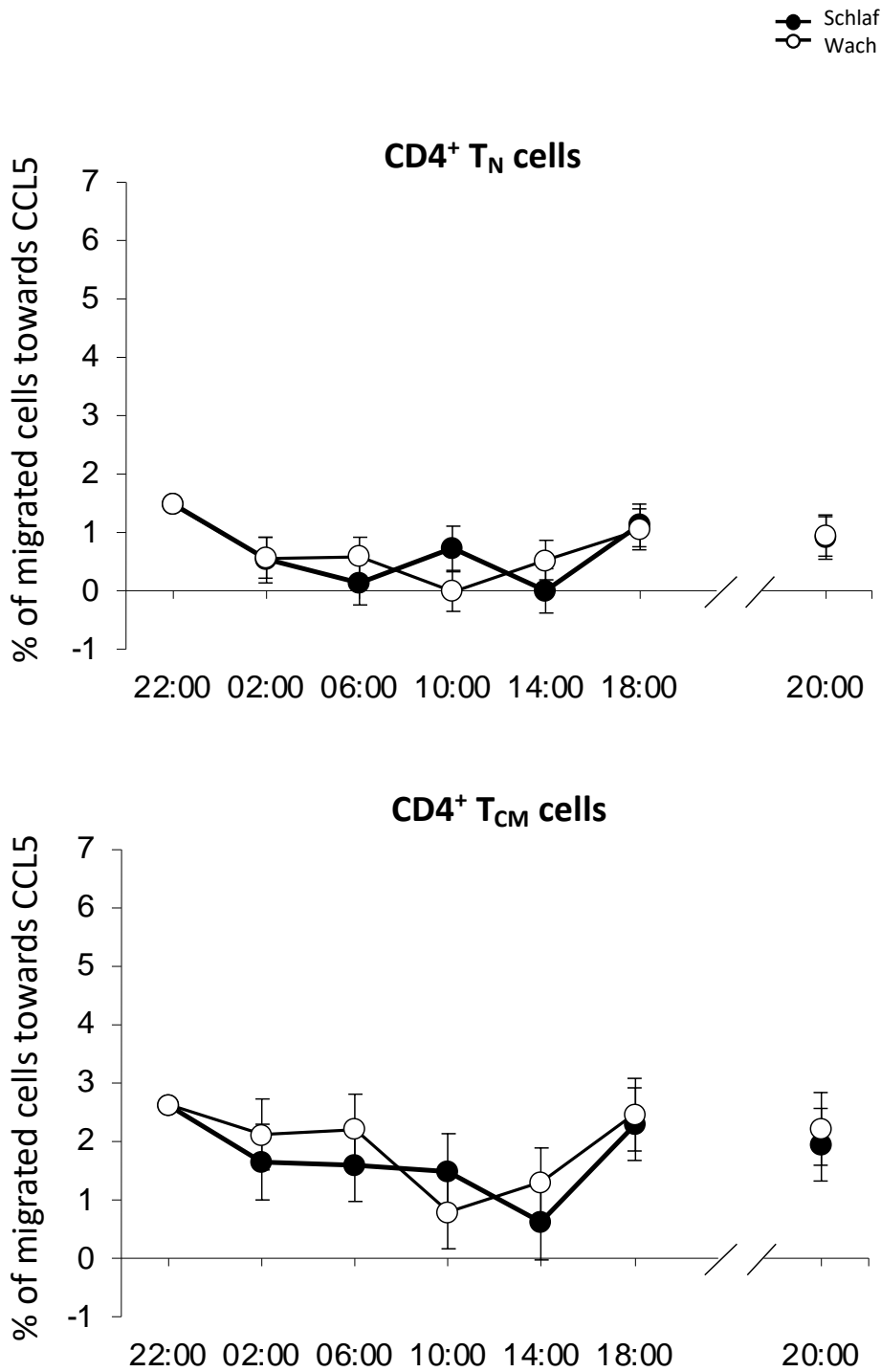


Abbildung 16. Effekt von Schlaf auf die CCL5-gerichtete Migration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten Subpopulationen der CD4-positiven T-Zellen in Anwesenheit von CCL5.

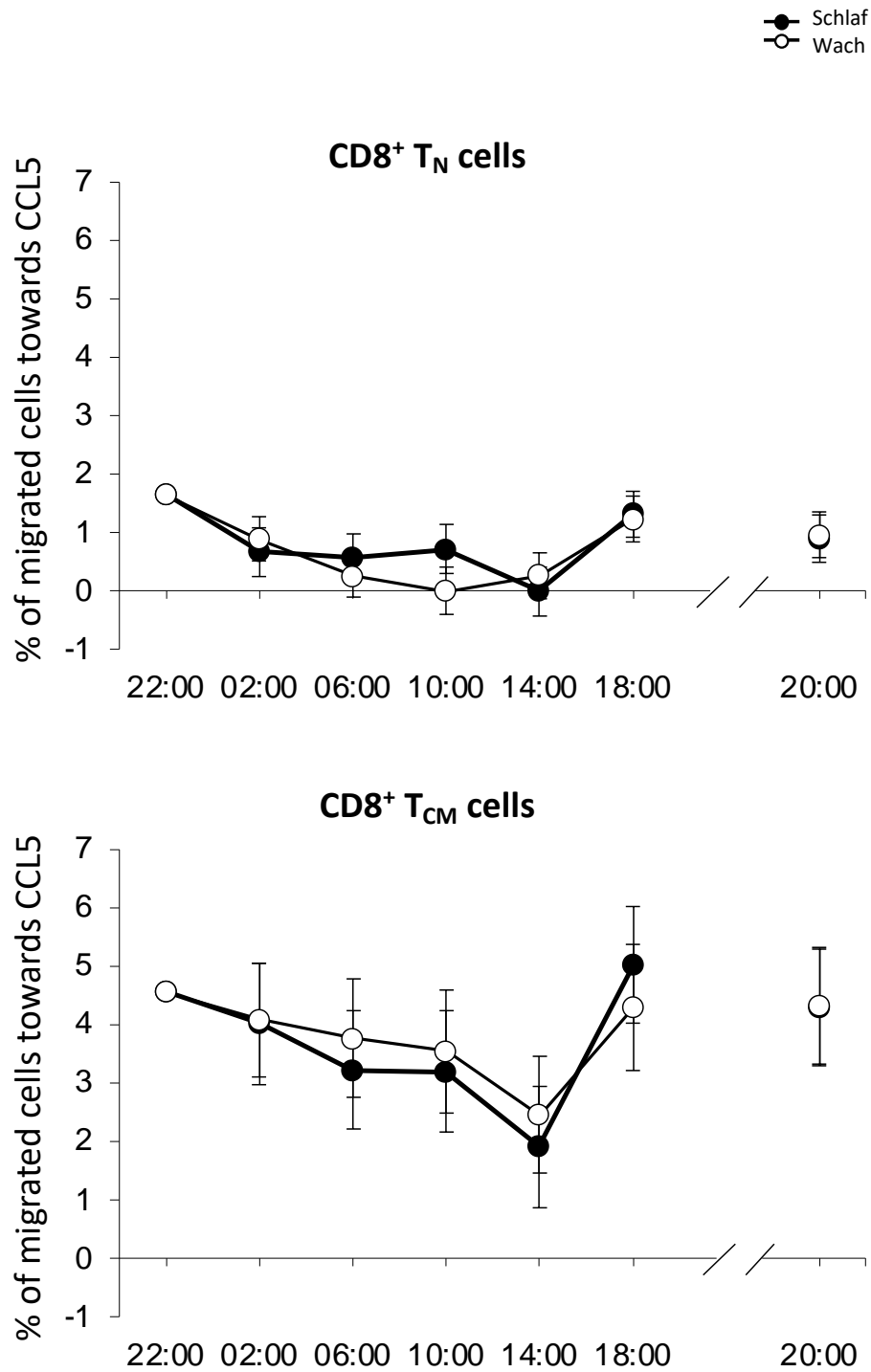


Abbildung 17. Effekt von Schlaf auf die CCL5-gerichtete Migration der T-Zellen. Gezeigt sind die erwarteten Anteile +/- der statistischen Standardabweichung der migrierten Subpopulationen der CD8-positiven T-Zellen in Anwesenheit von CCL5.

5. Diskussion

In unserem Experiment haben wir untersucht, ob Schlaf verglichen zu nächtlicher Wachheit die Migration von T-Zellen fördert. Dies wurde anhand zweier Parameter untersucht:

1. den absoluten Zellzahlen verschiedener T-Zell- Untergruppen im Blut.
2. der Migration der T-Zell-Untergruppen in Abhängigkeit der beteiligten Chemokine CCL5 und CCL19 mittels eines Migrationsassays.

5.1. Veränderungen mit Bezug auf die absoluten Zellzahlen

Bezüglich der absoluten Zellzahlen konnte unsere Hypothese größtenteils bestätigt werden. Fast alle T-Zell-Untergruppen zeigten sowohl in der CD3-, der CD4- und der CD8- Untergruppe das von uns erwartete Verhalten in Abhängigkeit von Schlaf: die Zellzahlen im Blut waren während des Schlafs signifikant reduziert im Vergleich zur Wachbedingung, was eine Migration der T-Zellen aus dem Blut suggeriert.

Ähnliche Ergebnisse erzielten die Kollegen Born et al. bereits im Jahr 1997: „Im Vergleich zu nächtlicher Wachheit reduzierte nächtlicher Schlaf die Anzahl der Monozyten, NK-Zellen und die Anzahlen aller Lymphozytenuntergruppen.“ (Born et al., 1997).

Lediglich bei einer Untergruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den absoluten Zellzahlen im Blut während des physiologischen Schlafs bzw. während des Schlafentzugs nachgewiesen werden. Diese Gruppe waren die terminalen Effektor-T-Zellen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Analysen vorangegangener Studien zu dieser Untergruppe (Besedovsky et al., 2016).

Alles in Allem legen diese Ergebnisse nahe, dass ein geregelter Schlaf-Wach-Rhythmus mit ca. sieben bis acht Stunden Schlaf pro Nacht (von 23:00 bis 07:00 Uhr) dazu führt, dass das menschliche Immunsystem seine Aufgaben besser erfüllt als bei nächtlicher Wachheit (z.B. bei Schlafstörungen oder Schichtarbeit).

5.2. Veränderungen mit Bezug auf die Migration der T-Zell-Untergruppen zu den lymphatischen Organen in Abhängigkeit der beteiligten Chemokine CCL19 und CCL5

Bezüglich der Untersuchung der Migration anhand der verschiedenen Untersuchungsparameter sollen die Ergebnisse im folgenden Abschnitt anhand der bereits im Ergebnisteil vorhandenen Gliederung erörtert werden.

5.2.1. Veränderungen mit Bezug auf die Spontanmigration der T-Zell-Untergruppen

Die T_N , T_{CM} und T_{TE} zeigten die stärkste spontane (ungerichtete) Migration nach Schlaf verglichen zu nächtlicher Wachheit. Dabei zeigte sich ein erwarteter Unterschied in der Quantität dieser Veränderungen zugunsten der T_N und der T_{CM} , welcher aus unserer Sicht in direktem Zusammenhang mit den quantitativen Unterschieden in den absoluten Zellzahlen steht. Auch dort zeigten die T_{TE} eine verringerte Abhängigkeit von Schlaf bzw. Schlafentzug im Vergleich zu den anderen Untergruppen. Dass die T_N und T_{CM} eine erhöhte Migration zeigten, lässt sich einerseits am undifferenzierten Stadium der T_N und andererseits am Aufgabengebiet der T_{CM} erklären. Es sind ausdifferenzierte zentrale Gedächtniszellen, die regelmäßig zwischen den Lymphknoten und dem Blut hin und her zirkulieren, um die entsprechenden Informationen zu verarbeiten und weiterzugeben sowie im Falle einer Sekundärinfektion schnell zu reagieren. Dementsprechend kann man davon ausgehen, dass ihre Fähigkeit zur Migration besser ausgebildet ist als bei anderen Zellen, und somit auch eine verstärkte Migration stattfinden kann.

Außerdem exprimieren beide Gruppen die Oberflächenmarker CCR7 und CD62L (Mahnke et al., 2013), welche ihnen wiederum die Migration zu den Lymphknoten ermöglichen (Campbell et al., 2020). Auch aus diesem Grund entwickelt sich bei beiden Gruppen ein positiver Effekt des Schlafs auf ihre Spontanmigration, welche theoretisch auch als generelles Maß für die Migrationskapazität der einzelnen Zellen gesehen werden kann.

Vor allem die T_{EM} zeigten in Bezug auf die spontane Migration kaum Unterschiede in der Schlaf- und Wachbedingung. Diese Effektor-Gedächtniszellen zeigten schon in vorangegangenen Studien eine nur begrenzte Spontanmigration, woraus geschlussfolgert wurde, dass sie zu einer erhöhten Migration weitere Faktoren, wie Chemokine oder eine verstärkte inflammatorische Komponente benötigen, um ihre Migrationsrate zu erhöhen (Mahnke et al., 2013).

5.2.2. Veränderungen mit Bezug auf die Migration der T-Zell-Untergruppen in Abhängigkeit von CCL19

Wenn man die direkte Migration zu CCL19, das für das Homing von T-Zellen zu den Lymphknoten essenziell ist (Ebert et al., 2005), betrachtet, zeigt sich ebenfalls eine allgemein verstärkte Migration in der Schlafbedingung im Vergleich zur Wachbedingung. Diese Unterschiede zwischen den Bedingungen waren auch nach einer vollen Nacht des Erholungsschlafs noch signifikant, wodurch eine gewisse Persistenz des Effekts anzunehmen ist. Demzufolge kann man davon ausgehen, dass eine langfristige Schlafhygiene (d.h. das Einhalten eines regelmäßigen Schlafrhythmus von acht bis neun Stunden pro Tag) bei Menschen dafür sorgt, dass die untersuchten Zellgruppen ihre Funktion im Immunsystem besser erfüllen können und so eine geringere Krankheitsanfälligkeit resultiert.

Aus den bereits in der Einleitung erwähnten Vorarbeiten zur Studie war bekannt, dass die Anzahl der T-Zellen durch einen geregelten nächtlichen Schlaf reduziert wird (Besedovsky et al., 2016) und dass diese wiederum von CCL19 abhängig ist (Ebert et al., 2005). Dementsprechend konnte man bereits im Vorfeld der Studie erwarten, dass die oben genannte Effektpersistenz entsteht, wenn man unseren Körper und seine Funktionen als lernfähiges bzw. adaptives System versteht.

Vor allem die naiven T-Zellen zeigten dahingehend einen erhöhten Effekt des Schlafes. An diesem Punkt könnte man vermuten, dass bei dieser Gruppe aufgrund ihrer noch gering ausgeprägten Differenzierung eine verstärkte Anziehung durch das Chemokin CCL19 besteht. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei den T_{CM} , obwohl er in diesen Teilmengen im Vergleich zu den T_N keine Signifikanz erreichte. Dieser Fakt basiert möglicherweise darauf, dass in diesen Gruppen eine geringere Expression von CCR7, dem Rezeptor von CCL19, vorliegt (Besedovsky et al., 2014b).

In Anlehnung an vorangegangene Experimente von anderen Wissenschaftlern vermuten wir, dass die Effektor-T-Zellen ihre Migrationskapazität zu den Lymphknoten dadurch verlieren, dass die Oberflächenmarker CCR7 und CD62L im Verlauf der Zelldifferenzierung herunterreguliert werden. Die Kollegen Lewinsohn et al. beschrieben dahingehend folgenden Sachverhalt: „Mit der Veränderung von einer naiven T-Zelle zu einer Effektor-T-Zelle, erlangen die Effektor-T-Zellen einen charakteristischen Phänotyp. Genauer gesagt kommt es zu einer Herunterregulierung von CD62L und CCR7, welche die Migration in die Lymphknoten ermöglichen.“ (Lewinsohn et al., 2011).

Es ist davon auszugehen, dass die Effektor-T-Zellen zwar ihre quantitative Migrationskapazität einbüßen, aber trotzdem in der Lage sind, zu den spezifischen Geweben zu gelangen und dort die proinflammatorischen Zytokine zu produzieren.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass eben diese Expression von CCR7 nicht komplett beendet wird, wenn sich eine Gedächtnis-T-Zelle gewebspezifisch differenziert, sondern dass auch nach dieser Differenzierung eine CCR7-Expression stattfindet. Somit können die Zellen auch nach ihrer Differenzierung noch eine Migration in sekundäre lymphatische Organe vollziehen (Campbell et al., 2020).

Darüber hinaus lässt sich ein zeitlicher Einfluss in Bezug auf die Entwicklungsbiologie der T-Zellen vermuten: in unserem Experiment zeigten sich generell sehr wenige CD4-positive Effektorzellen im peripheren Blut der Proband*innen. Nachdem diese als naive T-Zellen aktiviert werden, stirbt eine hohe Prozentzahl von ihnen, andere differenzieren sich zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und wiederum andere verbleiben in den Geweben als spezifische Effektorzellen.

Wenn man die Migration der T-Zell-Untergruppen analysiert, bestätigen sich zunächst die oben genannten Erkenntnisse. Während sich die absoluten Zellzahlen im Blut, während der Schlafbedingung im täglichen Vergleich zur Wachbedingung verringerten, erhöhten sich die zu CCL19 gerichteten Migrationsraten der Leukozyten während dieser Bedingung signifikant und umgekehrt. Vor allem am Tag nach der Experimentalnacht zwischen 10:00 und 14:00 Uhr bestand ein deutlicher Unterschied. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz im Zeitverlauf der Auswirkungen des Schlafes auf die zirkulierenden T-Zellzahlen und das Migrationspotenzial könnte sein, dass der Schlaf durch die akute Förderung der Extravasation von T-Zellen nur die T-Zellen während der Nacht im Kreislauf belässt, die ein geringeres Migrationspotenzial haben. Dies kann die akute Wirkung von Schlaf gegenüber nächtlicher Wachheit auf das Migrationspotenzial verschleiern. Im Gegensatz dazu wird tagsüber, wenn die Zellzahlen der Schlaf- und Wachzustände ähnlich sind, ein unterschiedliches Migrationspotenzial zwischen T-Zellen der Schlaf- und Wachzustandsbedingung in der Zirkulation deutlich.

5.2.3. Veränderungen mit Bezug auf die Migration der T-Zell-Untergruppen in Abhängigkeit von CCL5

Eine Schlafabhängigkeit der Migration zu CCL5, welches normalerweise die Lymphozyteninfiltration zu den entzündeten Geweben fördert (Appay et al., 2001), konnte in unserem Experiment hingegen nicht nachgewiesen werden. Dies suggeriert eine hohe Spezifität des schlafabhängigen Migrationsverhaltens verschiedener T-Zell-Untergruppen zu CCL19 und damit einen möglicherweise verstärkenden Effekt des Schlafs auf die "Homing-Kapazitäten" der T-Zellen zu den Lymphknoten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die Spezifität der Wirkung von Schlaf auf die gerichtete Migration von T-Zellen zu CCL19 als ein Marker für die Lymphknoten - eine Schlussfolgerung, die durch frühere Tierversuche unterstützt wird. Hier zeigten sich nach Schlafentzug bei Mäusen reduzierte Lymphozyten-Zahlen in Lymphknoten (Ruiz et al., 2017) und eine Abnahme der Genexpression von CCL19, CCR7 und CD62L, welche für die Rekrutierung von Immunzellen zu den Lymphknoten wichtig sind (Tune et al., 2020). Unsere Daten zeigen, wie der Nachtschlaf das Migrationspotenzial der Hauptpopulation menschlicher T-Zellen und ihrer Untergruppen gegenüber CCL19 verstärkt. Da CCL19 ein essenzielles Chemokin für die T-Zell-Rekrutierung in die Lymphknoten ist, zeigt sich durch unser Experiment auch, wie der Schlaf die Initiation einer adaptiven Immunantwort verstärkt. Diese Ergebnisse beantworten so nicht nur einfache wissenschaftliche Fragen, sondern können auch klinische Konsequenzen haben. Beispielsweise könnte man mit diesem neuen Wissen neue Protokolle bzw. Abläufe für die Verabreichung von Impfungen und des Schlafverhaltens in den darauffolgenden Wochen anfertigen.

6. Zusammenfassung

Der menschliche Schlaf und das menschliche Immunsystem stehen in direktem Zusammenhang zueinander. Aus vorgegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass der Schlaf und die damit verbundene Ruhephase für verschiedene Organismen eine entscheidende Rolle für die Aktivität der T-Lymphozyten im menschlichen Körper spielt. Auch einige Untergruppen von T-Lymphozyten wurden bereits in vorangegangenen Experimenten hinsichtlich ihrer Aktivität im Blut von Menschen und Tieren während des Schlafs untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Zellen im Blut stattfindet, wenn ein Mensch oder ein Tier einem regelhaftem Schlaf-Wach-Rhythmus folgt. Diese Tatsache suggeriert eine Zellwanderung zu den Geweben hin. Offen war aber bislang, ob diese Veränderungen für mehrere aktuell bekannte Untergruppen von T-Lymphozyten zutreffen und ob die Migration der Zellen von einem bestimmten oder mehreren Chemokinen abhängt.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden vor diesem Hintergrund mehrere Aspekte des T-Zell-Verhaltens des menschlichen Körpers in Abhängigkeit vom Schlaf untersucht. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der Migrationskapazität von menschlichen T-Zellen.

Für diese Untersuchung wurde am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensbiologie der Eberhard Karls Universität zu Tübingen eine experimentelle Studie mit 14 gesunden Proband*innen mit einem Altersdurchschnitt von 23,9 Jahren. Die Proband*innen wurden nach primär festgelegten Kriterien ausgewählt und vor den Experimenten eingehend körperlich und laborserochemisch untersucht. Die Untersuchungen teilten sich in zwei Experimente auf: ein Experiment im Schlaflabor an den Proband*innen und ein Experiment im Zelllabor am Blut der Proband*innen. Das Experiment im Schlaflabor fand unter standardisierten Bedingungen statt - alle Proband*innen mussten je eine Nacht im Schlaflabor schlafen und eine Nacht unter Schlafentzug verbringen. Dabei wurden mehrere Blutentnahmen in standardisierten Abständen durchgeführt. Die entnommenen Blutproben wurden dann im Zelllabor hinsichtlich folgender Parameter untersucht: absolute Zellzahlen der verschiedenen T-Lymphozyt-Untergruppen im Blut der Probanden, Migrationsindex der verschiedenen T-Lymphozyt-Untergruppen bezogen auf die Spontanmigration, die Migration zum Chemokin CCL19 und die Migration zum Chemokin CCL5. Alle genannten Parameter wurden dann in Abhängigkeit der vorhandenen Bedingung (Schlafzustand oder Wachzustand) statistisch ausgewertet.

Die T-Zellen normal schlafender Menschen zeigten im Vergleich zu Menschen unter Schlafentzug eine reduzierte Anzahl im Blut. Außerdem haben wir eine stärkere spontane (ungerichtete) Migration verschiedener T-Zell-Untergruppen festgestellt. Die Anwesenheit von CCL19, einem Chemokin, welches in den Lymphknoten vorkommt, führte außerdem zu einer verstärkten Migration in der Schlafbedingung. CCL5, ein Chemokin, welches die Lymphozyteninfiltration zu den entzündeten Geweben fördert, führte jedoch zu keiner schlafabhängigen Veränderung der Migration. Diese Befunde waren ähnlich für fast alle untersuchten CD3-, CD4- und CD8-T-Zell-Untergruppen.

Lediglich bei einer Untergruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den absoluten Zellzahlen im Blut während des physiologischen Schlafs bzw. während des Schlafentzugs nachgewiesen werden. Diese Gruppe waren die terminalen Effektor-T-Zellen. Die Ergebnisse suggerieren eine verstärkte Migration von T-Zellen in die Lymphknoten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass nächtlicher Schlaf dazu führt, dass das menschliche Immunsystem seine Aufgaben besser erfüllen kann, als bei nächtlicher Wachheit (z.B. bei Schlafstörungen oder Schichtarbeit).

Die in dieser Arbeit erbrachten Erkenntnisse könnten in Zukunft im klinischen Alltag, aber auch in der hausärztlichen Versorgung eine wichtige Rolle spielen und sollten mehr in den Fokus geraten, wenn man Therapiepläne für Patienten erstellt, neue Gesundheitseinrichtungen baut oder neue Pläne für Impfschemata oder andere Medikamente entwickelt. Die moderne Medizin hat in den letzten Jahren immer mehr Belege für ein intensives Wechselspiel zwischen Körper und Psyche erbracht. Auch die vorliegende Studie unterstützt diese Annahme, welche in Zukunft größere Beachtung bei der Versorgung von kranken Menschen finden sollte.

7. Literaturverzeichnis

Agnew und Webb, 1972: Measurement of sleep onset by EEG criteria.

Appay et al., 2001: RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology*. 83-87.

Besedovsky et al., 2011: Sleep and immune function. *European Journal of physiology*. 121-137.

Besedovsky et al., 2014a: Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset and numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4. *FASEB Journal*. 67-75.

Besedovsky et al., 2014b: Mineralocorticoid receptor signaling reduce numbers of circulating human naïve t cells and increased their CD62L, CCR7, and CXCR4 expression. *European Journal of Immunology*. 1759-1769.

Besedovsky et al., 2016: Nocturnal sleep uniformly reduces numbers of different T-cell-subsets in the blood of healthy men. *American Journal of Physiology*. 637-642.

Besedovsky et al., 2019: The sleep-immune crosstalk in health and disease. *Physiological Reviews*. 1325-1380.

Bierer et al., 1989: The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. 579-599.

Born et al., 1997: Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *Journal of Immunology*. 4454-4464.

Britschgi et al., 2008: Dynamic Modulation of CCR7 Expression and Function on Naive T Lymphocytes In Vivo. *Journal of Immunology*. 7681-7688.

Campbell et al., 2020: CCR7 Expression and Memory T Cell Diversity in Humans. *Journal of Immunology*. 877-884.

Carskadon et al., 2009: Normal Human Sleep: An Overview. *Principles of Sleep Medicine*. 16-26.

Cossarizza et al., 2017: Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology*. 1584-1797.

Crosland-Taylor, 1953: A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*. 37-38.

Czeisler et al., 1980: Timing of REM sleep is coupled to the circadian rhythm of body temperature in man. *Sleep*. 329-346.

Debes et al., 2005: Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature Immunology*. 889-894.

Dement et al., 1957: The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *Journal of Experimental Psychology*. 339-346.

Depres-Brummer et al., 1997: Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock output in rats. *American Journal of Physiology*. 1891-1899.

Ebert et al., 2005: Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Molecular Immunology*. 799-809.

Enarsson et al, 2004: *Helicobacter pylori* Induces Transendothelial Migration of Activated Memory T Cells. *Infection and Immunity*. 761-769.

Fortier et al., 2011: Circadian variation of the response of T-cells to antigen. *Journal of Immunology*. 6291-6300.

Hemler, 1990: VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annual review of immunology*. 365-400.

Kishimoto et al., 1987: Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell*. 681-690.

Kobayashi et al., 2016: Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation. *Scientific reports*. 1-14.

Labrecque und Cermakian, 2015: Circadian Clocks in the Immune System. *Journal of biological rhythms*. 277-290.

Lange et al., 2011: Sleep after vaccination boosts immunological memory. *Journal of Immunology*. 187, 283-290.

Lee et al., 2018: Endothelial Cell Focal Adhesion Regulates Transendothelial Migration and Subendothelial Crawling of T Cells. *Frontiers in Immunology*.

Lewinsohn et al., 2011: Views of immunology: effector T cells. *Immunological reviews*. 25-39.

Ley et al., 2007: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews – Immunology*. 678-689.

Mahnke et al., 2013: The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell-subsets. *European Journal of Immunology*. 2797-2809.

Marques et al., 2013: Targeting CCL5 in inflammation. *Informa healthcare*.

Martinez-Albert et al., 2024: Sleep promotes T-cell migration towards CCL19 via growth hormone and prolactin signaling in humans. *Brain Behavior and Immunity*. 69-77.

Parrott und Wilkinson, 1981: Lymphocyte locomotion and migration. *Progress in allergy*. 193-284.

Rahman et al., 2006: Introduction to flow cytometry. 16.

Rechtschaffen et al., 1968: A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. *UCLA Brain Information Service/Brain Research Institute*.

Ruiz et al., 2017: Sleep influences the immune response and the rejection process alters sleep pattern: Evidence from a skin allograft model in mice. *Brain, Behavior and Immunity*. 274-288.

Ruoslahti und Pierschbacher, 1987: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 491-497.

Spits et al., 1986: Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells. *Science*. 405-405.

Springer et al., 1987: The lymphocyte function – associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annual review of immunology*. 223-252.

Springer, 1990: Adhesion receptors of the immune system. *Nature reviews – Immunology*. 425-434.

Stanford et al, 2003: The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology*. 791-799.

Stein und Nombela-Arrieta, 2005: Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology*. 1-12.

Tune et al., 2020: Effects of sleep on the splenic milieu in mice and the T cell receptor repertoire recruited into a T cell dependent B cell response. *Brain, Behavior and Immunity – health*.

von Andrian und Mackay, 2000: T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *New England Journal of Medicine*. 1020-1034.

Yan et al., 2019: CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 1-13.

8. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie der Eberhard Karls Universität unter Betreuung von Prof. Dr. Manfred Hallschmid durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Luciana Besedovsky, Studienleitung, mit Beiträgen von Prof. Dr. Jan Born und Prof. Dr. Tanja Lange. Alle humanexperimentellen Schlaflaboruntersuchungen wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Estefania Martinez-Albert, Dr. Nicolas Lutz) von mir in Zusammenarbeit mit Estefania Martinez-Albert, Dr. Nicolas Lutz, Prof. Dr. Luciana Besedovsky und Dr. Hannah Friedrich durchgeführt. Dabei führte ich im Einzelnen folgende Tätigkeiten aus: Rekrutierung der Proband*innen und Planung der Experimente in Abhängigkeit der vorgegebenen Zeiträume, Durchführung des Experiments im Schlaflabor mit Betreuung der Proband*innen, Durchführung der Blutentnahmen und der EEG-Überwachung der Proband*innen sowie eine postexperimentelle EEG-Analyse. Die Experimente im Zelllabor wurden von Estefania Martinez-Albert und Dr. Stoyan Dimitrov durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Estefania Martinez-Albert und mich. Unter „Veröffentlichungen“ ist die Publikation aufgeführt, welche Produkt dieser Arbeit ist. In dieser werde ich als Drittautor genannt. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Kirchberg, den 11.11.2024

Robert Hübener

9. Veröffentlichungen

Diese Arbeit führte zu folgender Publikation, in welcher ich als Zweitautor genannt werde:

Martinez-Albert et al., 2024: Sleep promotes T-cell migration towards CCL19 via growth hormone and prolactin signaling in humans. *Brain Behavior and Immunity*. 69-77.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Hallschmid, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und Unterstützung sowohl bei fachlichen als auch bei organisatorischen Fragen rund um die Doktorarbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Estefania Martinez-Albert, ohne deren mühevollen Geduld und liebevolles Verständnis in dieser beschwerlichen Zeit ein solcher Arbeitsumfang niemals hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, ihre kritischen Betrachtungen, ihre differenzierten Anmerkungen sowie die zweckdienlichen Diskussionen, vor allem aber ihr moralischer Beistand und der menschliche Halt, haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben. Wegen ihrer persönlichen Bindung und Unterstützung gebührt ihr hier mein voller und besonders herauszustellender Dank. Als Erstautorin der bereits genannten Publikation trägt sie maßgeblichen Anteil am Erfolg dieser und jegliche Hochachtung bezüglich der daraus hervorgegangenen Ergebnisse.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Luciana Besedovsky (Studienleitung) und Herrn Dr. Nicolas Lutz, welche sich bei der Planung und Organisation der Studie maßgeblich beteiligt und auch bei der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift mit ihren Ratschlägen und konstruktiver Kritik mitgewirkt haben.

Für die Unterstützung bei den Experimenten im Schlaflabor bedanke ich mich bei Frau Dr. Hannah Friedrich für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Frau, Jasmin Katharina Hübener, für ihre dauerhafte Unterstützung, ihre Rücksichtnahme und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Petra und Johannes Reimund Hübener, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und mich auf diesem in Vergangenheit und Gegenwart ohne Kompromisse unterstützten.

Abschließend danke ich Gott für seine Behütung und Bewahrung in allen Lebenslagen.