

## 4 Probanden und Methoden

### 4.1 Probandenkollektiv

An den Untersuchungen nahmen 25 Probanden teil. Sie wurden durch öffentliche Aushänge oder durch gezieltes Ansprechen vom Versuchsleiter auf die Studie aufmerksam gemacht. Zur Probandenselektion erfolgte ein Informations- und Anamnesegespräch, in dem die Probanden über Inhalt und Ziele der Studie informiert sowie die Ein- und Ausschlußkriterien anhand eines standardisierten Fragebogens kontrolliert wurden.

Einschlusskriterien waren:

- männliches Geschlecht
- Alter zwischen 20 und 30 Jahren

Ausschlusskriterien waren:

- Hinweise auf mangelhaften Ernährungszustand (BMI nach Broca  $<20$  oder  $>25$  oder vegetarische Ernährung)
- Leistungssport (erschöpfendes körperliches Training öfter als 3x pro Woche)
- Zigarettenkonsum von mehr als 5/ Tag
- Hinweise auf das Vorliegen von Alkohol- oder Drogenmissbrauch
- Hinweise auf das Vorliegen akuter oder chronischer Erkrankungen
- Infektionskrankheiten oder Medikamenteneinnahme in den dem Versuchstag vorausgegangenen zwei Wochen
- starke psychische Belastung am Versuchstag (z.B. Prüfung)
- Nadelphobie

Die Probanden wurden angewiesen, am Versuchstag wie gewohnt zu frühstücken, jedoch auf die Einnahme koffein- oder teehaltiger Getränke und Zitrusfrüchte zu verzichten und nicht zu rauchen.

Das in der vorliegenden Studie endgültig untersuchte Probandenkollektiv (n=22)\* setzte sich aus männlichen Studierenden zusammen, bei denen keine Ausschlusskriterien vorlagen. Der Altersmedian lag bei 24 Jahren mit einem Range von 20-28 Jahren.

Alle Versuchsteilnehmer erhielten eine schriftliche Probandeninformation und Einverständniserklärung zur Unterschrift. Nach der Teilnahme an der Studie erhielten sie eine Aufwandsentschädigung in Höhe von € 25,- aus den Mitteln der Forschungsförderung des Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Gegen das Forschungsvorhaben gab es seitens der Ethikkommission des Campus Benjamin Franklin keinerlei Bedenken.

## **4.2 Untersuchungsplan**

### **4.2.1 Untersuchungsablauf**

Die Untersuchungen fanden in der Zeit von September 2003 bis März 2004 statt und wurden in den Räumen des Psychophysiologischen Labors der Abteilung für Psychosomatik und Psychotherapie am Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Das Labor befand sich in schallarmer Umgebung. Die Raumtemperatur wurde im Bereich zwischen 20 und 25°C konstant gehalten und die Luftfeuchtigkeit kontrolliert.

Es wurde ein Zweiraumlabor benutzt, so dass die Probanden während der Untersuchungen alleine im Untersuchungsraum saßen, während der Versuchsleiter im Nebenraum die Geräte zur Erfassung und Aufzeichnung der erhobenen kardiovaskulären Parameter steuerte und

---

\* Von den ursprünglich 25 Probanden, die sich zur Teilnahme an der Studie gefunden hatten, konnten 22 Probanden in die Auswertung mit einbezogen werden. Ein Proband kollabierte während einer Blutentnahme, so dass wir den Versuchsablauf vorzeitig beenden mussten. Bei einem anderen zeigten sich Auffälligkeiten im Blutbild, woraufhin er auf Nachfrage erklärte, zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer „Erkältungskrankheit“ gelitten zu haben. Bei einem dritten Probanden konnten wegen technischer Schwierigkeiten die kardiovaskulären Parameter nicht erhoben werden. Wir entschlossen uns, alle drei Probanden von der Auswertung auszuschließen.

überwachte. Proband und Versuchsleiter konnten über eine Gegensprechanlage miteinander kommunizieren, außerdem war der Untersuchungsraum zusätzlich mittels einer Videokamera aus dem Nebenraum einsehbar.

Vor Untersuchungsbeginn gaben die Probanden ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung. Sie wurden über den wissenschaftlichen Zweck und Ablauf nochmals kurz mündlich informiert und unterzeichneten einen Aufklärungsbogen sowie eine Einverständniserklärung zum Legen eines Venenverweilkatheters.

Um den Einfluss zirkadianer Rhythmen der Kreislaufregulation und der kognitiven Leistungsfähigkeit zu kontrollieren, begannen sämtliche Untersuchungen in der Zeit zwischen 8:30 und 9:30 Uhr. Sämtliche Untersuchungen wurden von demselben Versuchsleiter, dem Verfasser dieser Arbeit, durchgeführt.

Zu Beginn der Vorbereitungsphase (Abbildung 4.1) wurde den Probanden, die zur Versuchsdurchführung in einem bequemen Sessel saßen, ein 18-G-Venenverweilkatheter in eine Unterarmvene auf der Seite der dominanten Hand gelegt und dieser mit einem Mandrin verschlossen. Am Oberarm der nicht-dominanten Seite wurde eine Manschette zur oszillometrischen Bestimmung des Blutdrucks angelegt und vier EKG-Elektroden am Oberkörper der Versuchspersonen aufgeklebt, um die Herzfrequenz ableiten zu können.

Danach startete die eigentliche Untersuchung mit der 25-minütigen Ruhephase 1, während der die Probanden entspannt im Sessel saßen. Nach 20 Minuten wurden die Messungen der kardiovaskulären Parameter gestartet und über fünf Minuten aufgezeichnet. Danach wurde die erste Blutprobe abgenommen, deren Werte die Basalwerte (prä) darstellten.

Direkt im Anschluss daran wurde der Computermonitor, auf dem das Testprogramm ablaufen würde, eingeschaltet und auf einem Tisch in etwa 1m Abstand vor den Probanden positioniert. Der Testablauf und die Handhabung der Computermaus wurden den Versuchspersonen kurz erläutert. Sie wurden instruiert, während der gesamten Untersuchung möglichst ruhig zu sitzen und nicht zu sprechen, um die Untersuchungsergebnisse dadurch nicht zu beeinflussen. Lediglich die dominante Hand durfte frei zur Aufgabenbearbeitung mit der Computermaus benutzt werden. Nach der Unterweisung begann das standardisierte Computer-Testprogramm zur Erzeugung der

mentalen Belastungssituation (s. 4.2.2). Unmittelbar auf den Belastungstest folgend schloss sich die zweite Blutentnahme an, die den Stresswert bildete (Stress).

Der letzte Untersuchungsteil bestand aus einer 20-minütigen Erholungsphase mit einer Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter während der letzten fünf Minuten und einer sich daran anschließenden letzten Blutentnahme (post). Jeweils auf die Blutentnahmen folgend, füllten die Probanden einen standardisierten Fragebogen zur Erfassung des Ärgerzustands aus (s. 4.2.3)

### **4.2.2 Psychophysiologischer Belastungstest**

Zur Induktion der psychischen Belastungssituation unterzogen sich alle Probanden einem mentalen Belastungstest (MANOMETER-Test), der in einem zu diesem Zweck entwickelten standardisierten Computerprogramm vorliegt (STIMULUS-Programm, Johannes & Fischer 1990; Johannes et al., 1995). Das Testprogramm, das die Probanden absolvierten, bestand aus zwei Phasen:

1. **Ruhephase:** Dauer fünf Minuten: Die Probanden erhielten auf dem Monitor die Anweisung: „Bitte sitzen Sie ruhig und entspannt“
  
2. **Manometer-Testphase;** Dauer ca. 10 min., bestehend aus vier Teilen:
  - a. Anleitung
  - b. Übungsphase; erst wenn diese erfolgreich absolviert wurde, startete der MANOMETER-Test
  - c. MANOMETER-Test  
Auf dem Bildschirm erschienen Manometer-Uhren mit jeweils einem Zeiger. Die Probanden sollten entscheiden, ob mindestens einer der Zeiger um mehr als 90° von dem am oberen Bildrand präsentierten Referenzzeiger abwich. Zeigten alle Zeiger in die gleiche Richtung +/- 90° wie der Referenzzeiger, so war die Aufgabe „richtig“ und mit einmaligem Drücken der linken Maustaste zu beantworten. Wich mindestens einer der Zeiger um mehr als 90° ab, war die Aufgabe „falsch“ und musste mit einem rechten Mausklick bestätigt werden („information processing task“ nach Steptoe & Vögele, 1991). Nach

jeder inkorrekten Antwort ertönte im Untersuchungsraum ein lauter akustischer Signalton.

Die Anzahl der Manometer-Uhren, die beurteilt werden sollten, erhöhte sich von anfangs 3 auf bis zu 11 Uhren. Die Geschwindigkeit der Aufgabenstellung variierte während der Untersuchung und war individuell an die Arbeitsgeschwindigkeit der Probanden angepasst: Beantworteten die Probanden die Aufgabe korrekt, reduzierte sich die Zeit, in der die Uhren auf dem Bildschirm sichtbar waren um 30%. Bei wiederholt falschen Antworten verlängerte sich die Präsentationszeit wieder („time pressure task“: Steptoe & Vögele, 1991). Die Probanden sollten so an ihre eigene Leistungsgrenze gebracht werden, ohne dass eine psychologische Sättigung oder Unterforderung mit Langeweile resultierte.

- d. Fünf standardisierte Fragen zum Erleben der Untersuchung (Feedback-Fragen), die mithilfe des Trackballs der Computermaus beantwortet wurden.

### 4.2.3 Psychodiagnostik

#### *State-Trait-Ärgerausdrucksinventar (STAXI)*

Das State-Trait-Ärgerausdrucksinventar (STAXI; Schwenkmezger et al., 1992) in der deutschen Bearbeitung des State-Trait-Anger-Expression-Inventory ist ein kurzes und ökonomisches Instrument zur Erfassung von Ärger und Ärgerausdruck. Es wurde etabliert, um einerseits durch eine standardisierte Messung der emotionalen Komponenten Ärger und Ärgerausdruck im Rahmen von persönlichkeits- und soziopsychologischen Fragestellungen als Messinstrument zu dienen. Andererseits sollte es zur Aufklärung der Bedeutung verschiedener Ärgerkomponenten auf Ätiologie und Verlauf von Erkrankungen mit vermuteten psychosomatischen Aspekten, wie der essentiellen Hypertonie oder der Koronaren Herzerkrankung, beitragen.

Mithilfe der STAXI-Fragebögen können sowohl die Ärgerdisposition (trait-anger) als auch der Ärgerzustand (state-anger) erfasst werden. Das Ausmaß der Ärgerdisposition beschreibt die Tendenz einer Person, ein breites Spektrum von Situationen als frustrierend oder störend wahrzunehmen und durch einen erhöhten Ärgerzustand darauf zu reagieren (Schwenkmezger et al. 1992). Ärgerlichkeit hingegen kann man als emotionalen Zustand definieren, der aus

subjektiven Gefühlen der Irritation, Störung, Spannung und Wut unterschiedlicher Intensität besteht und der mit einer Aktivierung des autonomen Nervensystems einhergeht. Dieses psychologische Konstrukt wird im Kontext von Eigenschaftsmodellen auch als Zustandsärger bezeichnet.

Im Rahmen dieser Studie wurde somit lediglich der zur Erfassung des Zustandsärgers notwendige Teil 1 des STAXI benötigt, da ausschließlich die augenblickliche situative Ärgerlichkeit der Probanden in Intensität und Verlauf von Interesse war. Der 1. Teil des STAXI beinhaltet 10 Items, anhand derer der Proband seine gefühltes Erleben “in diesem Moment” beschreiben soll. Für jedes Item stehen jeweils vier Antwortmöglichkeiten zur Auswahl: “überhaupt nicht” – “ein wenig” – “ziemlich” – “sehr”.

Die Auswertung des Fragebogens geschieht durch Addition der Punktwerte pro Item. Da alle Items unidirektional verrechnet werden, ergibt sich der Rohwert aus der Summe der Itemantwortpunkte, ohne dass Inversionen notwendig sind. Ein hoher Skalenwert spiegelt hierbei eine hohe Ärgerausprägung wieder.

Die Probanden füllten die Fragebögen jeweils im Anschluss an die drei Blutentnahmen vor und direkt nach der akuten Belastungsphase sowie am Ende der Erholungsphase aus (prä, Stress, post).

Für die statistische Auswertung der Rohwerte wurde das Statistik-Programm SPSS für Windows (Version 12.0.1; 2003) benutzt.

#### **4.2.4 Physiologische Parameter**

In der vorliegenden Studie wurden die kardiovaskulären Parameter Blutdruck (systolisch, diastolisch) und Herzfrequenz gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils über 5-Minuten-Intervalle während der Ruhephase 1 (prä) und der Erholungsphase (post) sowie während der ersten fünf Minuten des MANOMETER-Tests unter der mentalen Belastung (Stress) (Abbildung 4.1). Zur Erfassung und Aufzeichnung der kardiovaskulären Parameter diente der Task Force® Monitor (TFM) 3040i, ein speziell für diesen Zweck konzipierter Computer der Fa. CNSystems Medizintechnik GmbH.

### ***Bestimmung des Blutdrucks***

Die nicht-invasive Bestimmung des absoluten Blutdrucks in der A. brachialis erfolgte oszillometrisch am Oberarm der nicht-dominanten Seite. Die Blutdruckmanschette (15 x 52 cm) des TFM wurde auf die vom Hersteller vorgeschriebene Art und Weise angelegt. Die Blutdruckmessungen während der Messphasen erfolgten in 1-Minuten-Intervallen jeweils über fünf Minuten und wurden über den TFM erfasst und aufgezeichnet.

### ***Bestimmung der Herzfrequenz***

Es wurden vier EKG-Elektroden am Oberkörper der Probanden aufgeklebt und die Schlag-zu-Schlag Herzfrequenz mittels EKG-Ableitung nach Goldberger kontinuierlich bestimmt und über den TFM erfasst und aufgezeichnet.

### ***Auswertung der physiologischen Parameter***

Die auf dem TFM aufgezeichneten Messwerte wurden am Ende des Versuchstages in Microsoft Excel-Dateien konvertiert und gespeichert. Für die statistischen Vergleichsuntersuchungen wurden die Daten später nach Messphasen gruppiert und über die Messphasen gemittelt.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistik-Programm SPSS für Windows (Version 12.0.1; 2003) benutzt.

## **4.3 Immunologische Parameter**

Mindestens 30 Minuten vor Beginn des psychophysiologischen Belastungstests wurde den Probanden ein 18 G-Venenverweilkatheter in eine Unterarmvene auf der Seite der nicht-dominanten Hand gelegt. Aus diesem venösen Zugang wurde das Blut zur Bestimmung der immunologischen Parameter zu drei definierten Zeitpunkten gewonnen. Die erste Blutentnahme, deren Werte als Basalwerte dienen (prä), erfolgte in direktem Anschluss an die Ruhephase 1. Die Blutentnahme zur Ermittlung des Stresseffekts (Stress) auf die Immunparameter erfolgte unmittelbar nach Beendigung der MANOMETER-Testphase. Um den Effekt des Stressors im kurzfristigen Verlauf beurteilen zu können, wurde den Probanden 20 Minuten nach Beendigung des Stressors erneut Blut abgenommen (post). Bei jeder der drei Blutentnahmen wurde den Probanden ca. 25ml Blut in der folgenden Reihenfolge abgenommen: Zuerst zwei Heparinröhrchen à 10ml und anschließend ein EDTA-Röhrchen à 4ml.

Für die statistische Auswertung der immunologischen Parameter wurde das Statistik-Programm SPSS für Windows (Version 12.0.1; 2003) benutzt.

### **4.3.1 Differentialblutbild**

Das in den EDTA-Röhrchen gewonnene Blut wurde bis zum Versuchsende bei Raumtemperatur aufbewahrt. Sowohl die absoluten Leukozyten- und Erythrozytenzahlen, das Differentialblutbild, als auch Hämatokrit- und Hämoglobinwert wurden erstellt. Dazu wurde ein automatischer hämatologischer Zellzähler eingesetzt (Cell Dyn 4000, Abbot Diagnostics, Abbott Park, Illinois, U.S.A.).

### **4.3.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus heparinisiertem Vollblut**

Das Heparinblut wurde nach der Blutentnahme bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer bewegt, um eine Agglutination zu verhindern. Zur späteren Isolierung und Untersuchung der Lymphozyten wurden zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus dem heparinisierten Vollblut gewonnen. Diese Zellpopulation enthält neben Monozyten auch B- und T-Lymphozyten und kann mittels Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt werden. Die von uns hierfür angewandte Methode beruht auf den Dichteigenschaften von Ficoll, einem hochpolymeren Zucker mit einer Dichte von 1,077g/ml. Erythrozyten und Granulozyten passieren bei der Zentrifugation die Ficoll-Phase aufgrund ihrer höheren Dichte und sedimentieren am Gefäßboden. Monozyten und Lymphozyten sammeln sich an der Plasma-Gradientenphase, da ihr spezifisches Gewicht weniger als 1,077g/ml beträgt und können so in einer Intermediärphase angereichert werden.

Zur Isolierung der PBMC wurde das heparinisierte Vollblut steril mit PBS/ BSA 1:2 verdünnt. In einer 50ml Falcon®-Tube wurden anschließend 15ml Ficoll vorsichtig und unter Vermeidung von Wirbelbildung mit 35ml des verdünnten Blutes überschichtet und für 30 min. bei 21°C und 2300 Umdrehungen pro Minute entsprechend 1150 g (ohne Bremse) zentrifugiert. Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Zunächst wurde die als weißliche Interphase entstehende PBMC-haltige Intermediärschicht vorsichtig mit einer 10ml Pasteur-Pipette abpipettiert und in ein neues 50ml Teströhrchen

überführt. Danach wurde sie mit PBS/ BSA (4°C) im Verhältnis von 1:3 verdünnt und erneut für 10 Minuten bei 4°C, 300 g und mit eingeschalteter Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Population der PBMC in PBS aufgenommen und zweimal thrombozytenfrei gewaschen (4°C, 10 Minuten bei 300 g). Die Zellen wurden schließlich in 0,5ml RPMI (4°C) resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### **4.3.3 Kryopreservation und Auftauen von Zellen**

Die Lymphozyten wurden zur späteren Untersuchung zeitweise kryokonserviert. Unter Verwendung von DMSO, das als Gefrierschutzmittel die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses verhindert, kann man die Zellverluste begrenzen, insbesondere wenn mit einer definierten Zeitkinetik von -1°C/min eingefroren wird. Außerdem hat sich gezeigt, dass bei T-Lymphozyten bessere Viabilitäten erreicht werden, wenn sie vor der Isolierung noch in der Gesamtheit der PMBC eingefroren werden.

Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die PBMC in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml aufgenommen. Danach wurde jeweils 1ml dieser Zellsuspension in Kryo-Tubes gegeben und in einer speziellen, mit Isopropylalkohol befüllten Einfrierbox auf -80°C gekühlt, wodurch eine gleichmäßige Temperaturreduktion um -1°C/min. gewährleistet wurde. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zur weiteren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen unter Schwenken so lange im Wasserbad (+37°C) erwärmt, bis der Inhalt leicht angetaut war. Durch Zugabe von RPMI (zugesetzt mit 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptokinase) wurden die Zellen vollständig aufgetaut, danach in Röhrchen mit 10 ml RPMI überführt und zweimal gewaschen. Vor der weiteren Verwendung wurden die Zellen erneut gezählt und die Viabilität mithilfe einer Propidiumjodid-(PI-) Färbung im FACS überprüft.

### **4.3.4 Durchflusszytometrie/ FACS**

Die Lymphozyten des peripheren Blutes bestehen aus funktionell heterogenen Untergruppen. Es ist möglich, diese Subpopulationen durch ihre unterschiedliche Expression von

Zelloberflächenproteinen, die man durch spezifische monoklonale Antikörper nachweisen kann, voneinander zu differenzieren. Eine weit verbreitete Methode hierzu stellt die Durchflusszytometrie dar, mit der entsprechend markierte Zellen detektiert und gezählt werden können.

Das Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers wird im Folgenden kurz dargelegt: Die in einer Pufferlösung als gemischte Zellpopulation vorliegenden Zellen werden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten spezifischen Antikörpern behandelt und dadurch markiert. Über eine Pumpe wird ein Luftdruck auf einen Behälter mit Trägerflüssigkeit ausgeübt, so dass ein konstanter Flüssigkeitsstrom durch die Messküvette erzeugt wird. Durch den Druckaufbau werden die Zellen zusammen mit der Trägerflüssigkeit in eine Messküvette transportiert, wo durch hydrodynamische Fokussierung ein laminarer Probenstrom entsteht. Über eine Düse werden die Zellen in feinen Tröpfchen einzeln und mit einer Genauigkeit von weniger als 1  $\mu\text{m}$  am Messpunkt vorbeigeleitet.

Der Flüssigkeitsstrahl passiert dabei das monochromatische Licht eines Laserstrahls, das beim Auftreffen auf Zellen und intrazelluläre Partikel gestreut wird. An Zellen gebundene Fluoreszenzfarbstoffe hingegen werden zur Lichtemission angeregt. Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht und leiten diese Signale digitalisiert an einen Computer zur Analyse weiter. Die Messung des gestreuten Lichts liefert Informationen über die Größe und Granularität der Zellen. Durch die Messung der Fluoreszenz können Aussagen über die Bindung markierter monoklonaler Antikörper und in Folge dessen über die zellulären Oberflächenproteine gemacht werden. In FACS mit Sortierfunktion wird die in Aerosolform überführte Trägerflüssigkeit elektrisch positiv oder negativ geladen. Je nach Fluoreszenzeigenschaften werden die Zellen aus dem Flüssigkeitsstrom in einem elektrostatischen Feld über Ablenkplatten ladungsabhängig in verschiedene Auffangbehälter geleitet.

Moderne Durchflusszytometer besitzen die Fähigkeit, mehrere verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper gleichzeitig zu detektieren, so dass Zellpopulationen, für die ein bestimmter spezifischer Antikörper charakteristisch ist, noch weiter unterteilt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vierfach-FACS (BD FACSCalibur™; BD Biosciences, San José, USA) eingesetzt.

### 4.3.5 Färbung der Zellen

Für die Isolierung und Subtypisierung der Lymphozyten anhand der Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinrezeptoren und anderen T-Zell-Markern auf ihrer Zelloberfläche wurden mit Allophycocyanin (APC), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP) fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper verwendet (Tabelle 4.1).

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezug von
CD3 (FITC)	S4.1	IgG2a	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
CD4 (APC)	SK 3	IgG1 kappa	BD Biosciences, San José, USA
CD8 (PerCP)	SK1	xIgG1 kappa	BD Biosciences, San José, USA
CD45RA (FITC)	HI100	IgG2bx	BD Pharmingen, Heidelberg
CD56 (PE)	B159	IgG1 kappa	BD Pharmingen, Heidelberg

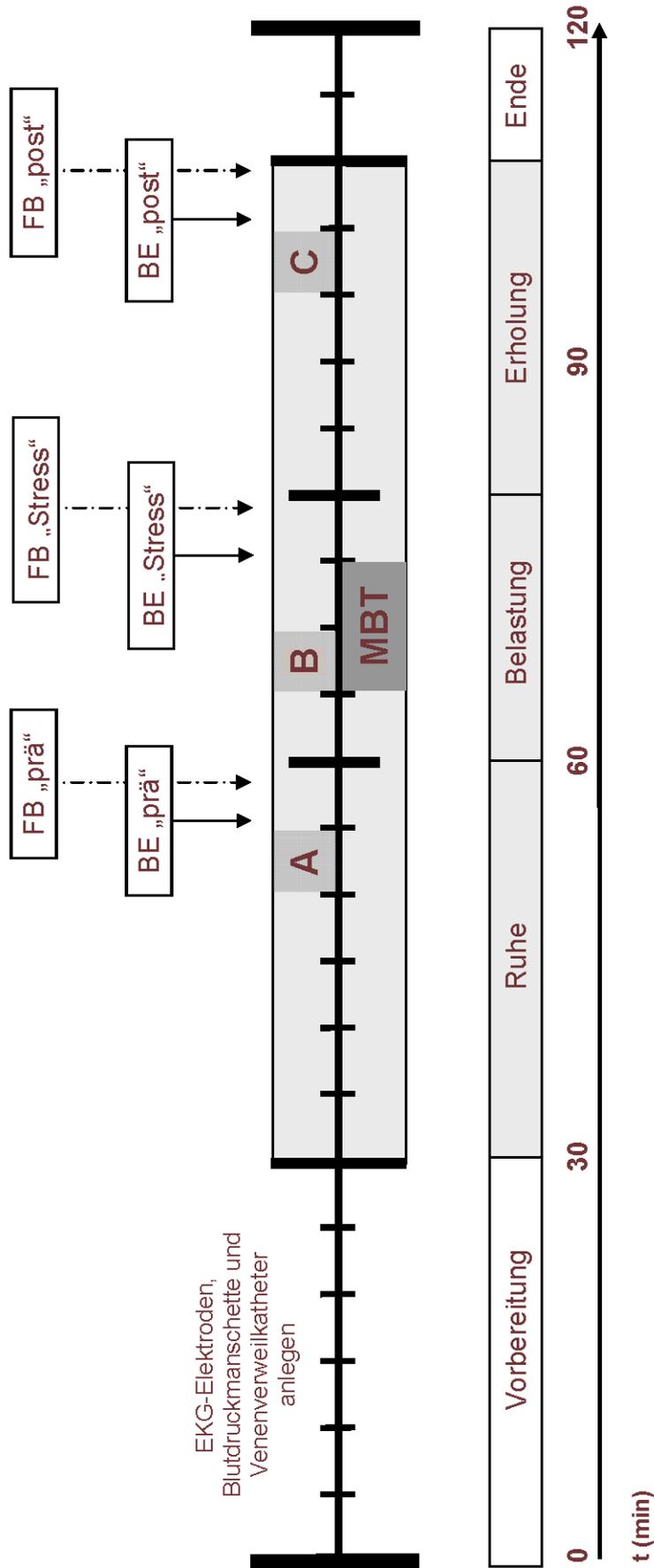
**Tabelle 4.1.: Antikörper zur Färbung von Oberflächenmolekülen auf den Lymphozyten**

Zur Überprüfung der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf der Lymphozytenoberfläche wurden die Zellen indirekt gefärbt. Dazu wurden die PBMC mittels muriner anti-human-CCR7-IgM-AK gefolgt von Biotin-konjugierten anti-Maus IgM-AK (BD Biosciences, San José, USA) und Streptavidin-PE (Immunotech, Marseille, Frankreich) behandelt.

Um die T-Lymphozyten auf ihre Expression intrazellulärer Effektorproteine zu überprüfen, wurde eine Ko-Färbung mit anti-Granzym-B-AK und anti-Perforin-AK (BD Biosciences) durchgeführt. In einem ersten Schritt erfolgte die Fixierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mithilfe von FACS Lysing Solution. Anschließend wurden die Zellen mittels Permeabilizing Solution permeabilisiert und die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit den entsprechenden Effektorprotein-Antikörpern gefärbt.

Abbildung 4.1:

## Übersicht über den Versuchsablauf



- BE: Blutentnahme
  - FB: Fragebogen (STAXI)
  - prä: Ausgangswert (Ende der Ruhephase)
  - Stress: Stresswert (direkt nach dem Belastungstest)
  - post: Erholungswert (Ende der Erholungsphase)
- MBT: Mentaler Belastungstest**
- A: Blutdruck- & Herzfrequenzmessung (Ausgangswert „prä“)
  - B: Blutdruck- & Herzfrequenzmessung (Stresswert „Stress“)
  - C: Blutdruck- & Herzfrequenzmessung (Erholungswert „post“)