

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Circadiane Uhr im Immunsystem

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Diplom-Ingenieurin für Biotechnologie (FH)  
Maren Keller

geboren in Görlitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. Kramer  
2. Prof. Dr. S. Brown  
3. Prof. Dr. med. Th. Kamradt

Datum der Promotion: 31.10.2008



## Zusammenfassung

Tageszeitliche Rhythmen sind bei einer Vielzahl von immunologischen Parametern und Funktionen bekannt. Diese Phänomene wurden aber bislang in der Immunologie vernachlässigt. Beispiele für tageszeitliche Rhythmen im Immunsystem sind: circadiane Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Bakterien oder unterschiedlich circadiane Symptome bei Erkrankungen wie Rheumatische Arthritis und Asthma. Daher ist die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen circadianer Uhr und Immunsystem von besonderer Bedeutung für klinische Diagnosen und pharmakologische Therapien. Obwohl das Wechselspiel zwischen innerer Uhr und immunologischen Phänomenen für die Medizin offensichtlich ist, wurde es in der Literatur lediglich beschrieben. Über den zugrunde liegenden Mechanismus indes ist fast nichts bekannt.

In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob das Immunsystem – wie andere periphere Organe auch – eine circadiane Uhr besitzt, welche die Immunfunktionen direkt in den Organen steuert. Mehrere Kriterien für die Existenz einer funktionell relevanten circadianen Uhr im Immunsystem konnten hier nachgewiesen werden:

(i) In der Milz und in den Lymphknoten von Mäusen werden die Uhrgene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  über zwei Tage circadian exprimiert. Die Phasen und Amplituden der Oszillationen sind vergleichbar mit anderen peripheren Geweben wie Lunge, Leber oder Niere.

(ii) Diese circadianen Oszillationen bestehen für mehrere Tage in der Milz, den Lymphknoten, Peritonealmakrophagen und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) bei einer *ex vivo*-Kultivierung von Organen oder Zellen von *PER2::LUC*-Mäusen bzw. *Per1::Luc*-Ratten. Durch die Abkopplung der Gewebe/Zellen von systemischen Zeitgeber Signalen während der Kultivierung wurde gezeigt, dass die Immun-Uhr eigenständig exprimiert wird und nicht systemisch getrieben wird.

(iii) Diese potenzielle Immun-Uhr reguliert möglicherweise immunologische Funktionen. Hinweise dafür, liefern einerseits die circadiane Rhythmik der Gesamtzellzahl sowie der Zellzahl von Subpopulationen wie Makrophagen, B- und T-Zellen der Milz, andererseits die circadiane Oszillation der Zytokinsekretion nach der Stimulation von Milzzellen mit LPS. Während rhythmische Immunfunktionen, wie Zytokinsekretionen, meist mit der circadianen Sekretion von Kortisol in Verbindung gebracht wurden, konnte in adrenaletomierten Mäusen gezeigt werden, dass sowohl die circadiane Oszillation der Zellzahl als auch die circadiane Zytokinsekretion von TNF $\alpha$  und IL-6 in Abwesenheit von Kortisolrhythmen weiter bestehen bleiben.

Darüber hinaus werden in dieser Arbeit Hinweise und Vernetzungen aufgezeigt, die auf eine molekulare Verbindung zwischen circadianer Uhr und Immunsystem auf Immunzellebene hindeuten. Dazu wurde die Genexpression von Makrophagen zu zwei circadianen Zeitpunkten mit Hilfe von Microarrays untersucht. Die Expressionsdaten liefern Hinweise auf eine mögliche Regulation entlang des Toll-like-Rezeptor 4 –Signalweges durch die circadiane Uhr.

Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Idee eines intrinsisch circadianen Uhrwerks in Immunzellen, das als Regulator für Immunfunktionen agiert. Das Wissen über circadian regulierte Gene und Immunfunktionen kann zum weiteren Verständnis beitragen, wie und in welchem Umfang die innere Uhr das Immunsystem beeinflusst.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Circadiane Uhren .....	1
1.2 Terminologie der Chronobiologie .....	3
1.3 Suprachiasmatischer Nukleus (SCN) als Hauptschrittmacher in Säugetieren .....	4
1.4 Molekularer Mechanismus .....	5
1.5 Mechanismen zur Synchronisation mit der Umwelt – Entrainment .....	9
1.6 Periphere Uhren und ihre Funktionen .....	10
1.6.1 Aufklärung des circadianen Expressionsmuster in peripheren Uhren mittels Microarrays .....	14
1.7 Tageszeitliche Rhythmen im Immunsystem .....	15
1.8 Makrophagen, Toll-like-Rezeptor 4 und Zytokine .....	18
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Material</b> .....	<b>25</b>
3.1 Reagenzien .....	25
3.2 RNA-Marker für die Gelelektrophorese .....	25
3.3 Puffer und Lösungen .....	26
3.4 Reagenzien für die Zellkultur .....	26
3.5 Zellkultur-Medien .....	27
3.6 Zelllinien .....	28
3.7 Tiere .....	28
3.8 Plasmide .....	29

---

3.9	Primer und Sonden für quantitative PCR.....	29
3.10	Enzyme .....	30
3.11	Antikörper und Blockierreagenzien .....	31
3.12	Kits .....	31
3.13	Enzym-Linked-Immunsorbent Assay (Elisa) .....	31
3.14	Geräte .....	32
3.15	Spezielle Materialien .....	32
3.16	Software .....	33
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
4.1	Versuchstiere und deren Haltung.....	34
4.2	Isolierung von primären Immunzellen .....	35
4.2.1	Milzentnahme für die Präparation von primären Milzzellen.....	35
4.2.2	Isolierung von primären Milzzellen.....	35
4.2.3	Isolierung von Peritoneal-Makrophagen mittels Peritoneallavage .....	36
4.2.4	Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	36
4.3	Organentnahme und Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben und Zellen.....	37
4.3.1	Entnahme von Milz und Lymphknoten für die anschließende Isolierung von Gesamt-RNA .....	37
4.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Milzgewebe.....	37
4.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Lymphknoten .....	37
4.3.4	Gesamt-RNA-Isolierung von primären Milzzellen und RAW 264.7 Zellen .....	38
4.3.5	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration .....	38
4.3.6	Elektrophorese von RNA in Agarosegelen.....	39
4.4	Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	39
4.4.1	Reverse Transkription .....	39
4.4.2	Quantitative PCR .....	40

---

4.5	Zellbiologische Methoden .....	42
4.5.1	Kultivierung von RAW 264.7 Zellen.....	42
4.5.2	Kryokonservierung der Zellen .....	43
4.5.3	Synchronisierung der Zellen .....	43
4.5.4	Stabile Transfektion von RAW 264.7 Zellen.....	44
4.5.5	Herstellung und Aufkonzentrierung des Lentivirus.....	45
4.5.6	Transduktion von Zellen oder Geweben mit Lentiviren.....	46
4.5.7	Echt-Zeit-Messung der Biolumineszenz von Geweben und Zellen.....	47
4.5.8	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	48
4.5.9	Stimulation mit LPS.....	48
4.5.10	Stimulation von primären Milzzellen mit Concanavalin A.....	49
4.6	Immunologische Methoden .....	50
4.6.1	Durchflusszytometrie.....	50
4.6.2	Färbung von Zelloberflächenmolekülen .....	50
4.6.3	Bestimmung der Anzahl der Zellen einer Immunpopulation in der Milz über 24 h mittels Durchflusszytometrie .....	51
4.6.4	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (Elisa) .....	51
4.6.5	Sortierung von Immunzellen.....	53
4.7	Auswertung der Laufrad-Aktivität .....	56
4.8	Statistische Auswertung der Zeitreihen.....	56
4.9	Expressionsanalyse mittel DNA-Arrays .....	56
4.9.1	Microarrays .....	56
4.9.2	Transkriptionsanalyse von Makrophagen mittels Affymetrix-Chip.....	58
4.9.3	Auswertung der Chipdaten.....	59
4.9.4	Überprüfung der Array-Daten mittels quantitativer PCR .....	60
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
5.1	Circadiane Uhrgen-Oszillation von Geweben des Immunsystems .....	61
5.1.1	Circadiane Uhrgen-Oszillation in der Milz und in den Lymphknoten.....	61



---

5.2	Autonome Oszillation von Immungeweben.....	64
5.2.1	Transfektion und Transduktion von Immunzellen und –geweben.....	64
5.2.2	Circadiane Oszillation von RAW 264.7 Zellen.....	65
5.2.3	<i>Ex vivo</i> Oszillation von Organen und Zellen des Immunsystems in PER2::LUC-Mäusen und in <i>Per1::Luc</i> -Ratten .....	67
5.3	Gesamtzellzahl und Zell-Zusammensetzung in der Milz.....	70
5.3.1	Circadiane Variation der Gesamtzellzahl in der Milz.....	70
5.3.2	Circadiane Variation der CD11b <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> -Population in der Milz.....	72
5.3.3	Circadiane Variation der CD19 <sup>+</sup> -Population in der Milz.....	74
5.3.4	Circadiane Variation der CD90.2 <sup>+</sup> -Population in der Milz.....	76
5.4	Stimulation von Immunzellen .....	78
5.4.1	Circadiane TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion von primären Milzzellen nach LPS-Stimulation .....	79
5.4.2	Sekretion von TNF $\alpha$ von Peritonealmakrophagen nach LPS- Stimulation .....	80
5.4.3	IFN $\gamma$ -Sekretion nach Stimulation mit Concanavalin A.....	81
5.5	Abkopplung der Zellen von körpereigenen Signalen bei der Stimulation.....	82
5.5.1	Stimulation einer primären Lang-Zeit-Milzzellkultur mit LPS.....	83
5.5.2	Circadiane TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation in adrenalektomierten Mäusen .....	84
5.5.3	Circadiane Sekretion von TNF $\alpha$ nach Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS.....	86
5.5.4	IFN $\gamma$ -Sekretion nach Concanavalin A-Stimulation in primären Milzzellen aus adrenalektomierten Mäusen .....	88
5.5.5	Normalisierte TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion mit Hilfe der Gesamt-Zellzahl...	89
5.6	Genexpression in sortieren Immunzellpopulationen .....	91
5.6.1	Uhrgenexpression in B- und T-Zellen.....	91
5.6.2	Uhrgenexpression in CD11b <sup>+</sup> -Zellen.....	94
5.6.3	Genexpression in CD11b <sup>+</sup> -Zellen.....	95

<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>101</b>
6.1	Circadiane Uhrgen-Oszillation in Geweben des Immunsystems .....	102
6.2	Autonome Oszillation in Immunzellen .....	103
6.3	Circadiane Variation der Gesamtzellzahl und Zell-Zusammensetzung in der Milz .....	105
6.3.1	Circadianer Rhythmus der Gesamtzellzahl in der Milz.....	105
6.3.2	Circadiane Oszillation der Makrophagenanzahl.....	107
6.3.3	Circadiane Oszillation der Anzahl der B-Zellen.....	108
6.3.4	Circadiane Oszillation der Anzahl der T-Zellen .....	109
6.4	Stimulation von Immunzellen .....	111
6.4.1	Circadiane Zytokinsekretion von primären Milzzellen nach Stimulation mit LPS .....	112
6.4.2	TNF $\alpha$ -Sekretion von Peritonealmakrophagen nach LPS-Stimulation ....	113
6.4.3	IFN $\gamma$ -Sekretion von primären Milzzellen nach Concanavalin A-Stimulation .....	114
6.5	Abkopplung der Zellen von körpereigenen Signalen bei der Stimulation.....	115
6.5.1	Stimulation einer primären Lang-Zeit-Milzzellkultur mit LPS.....	115
6.5.2	Circadiane TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen nach Stimulation mit LPS .....	116
6.5.3	Circadiane Sekretion von TNF $\alpha$ nach Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS.....	117
6.5.4	IFN $\gamma$ -Sekretion nach Concanavalin A-Stimulation von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen .....	118
6.6	Globale Genexpression in CD11b <sup>+</sup> -Zellen .....	118
6.7	Mögliche Mechanismen, über welche die circadiane Uhr die Zytokinsekretion steuern könnte .....	120
6.8	Die Rolle der circadianen Uhr im Immunsystem .....	122
6.9	Ausblick.....	123
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>

---

<b>Danksagung .....</b>	<b>141</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>142</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>143</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocortikotropin
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Motiv
Bmal1/BMAL1	CLOCK-Brain, Muscle Arnt-like-1
BSA	Rinderserumalbumin
CCG/ccg	Uhr-kontrollierte Gene (Clock Controlled Genes)
CD	Cluster of Differentiation
CKI	Caseinkinase I $\epsilon$ / $\delta$
Clock/CLOCK	“Circadian Locomotor Output Cycle Kaput“
CREB	Cyclic AMP Response Element Binding Protein
Cry/CRY	Cryptochrom
CT	Circadiane Zeit (Circadian time)
Cyc	Cycle
d	Tag oder Drosophila
Dbp/DBP	“Albumin D-Element Binding Protein“
Dbt/DBT	Doubletime
DD	konstante Dunkelheit (dark/dark)
DMEM	“Dulbecco’s modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E4BP4/E4bp4	“Adenovirus E4 Promotor Binding Protein 4“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Rinderserum
Frq	Frequency
h	Stunde oder human
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxydase)
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LD	Licht-Dunkel (light/dark)

---

LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luziferase
m	murin
mRNA	„messenger“RNA
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor kappa B)
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Per/PER	Period
RGC	retinale Ganglienzellen
RHT	retino-hypothalamischer Trakt
RNA	Ribonukleinsäure
ROR	“Retinoic Acid-related Orphan Receptor“
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SCN	Suprachiasmatischer Nukleus
TAK1	TGF- $\beta$ aktivierten Kinase 1
TAB	TAK1 bindende Proteine
TGF	Transforming growth factor
Tim/TIM	Timeless
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6
U	“Unit“
UV	Ultraviolett
Vri	Vrille
Wc/WC1 und 2	“White Collar“ 1/2
wt	wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZT	„Zeitgeber“-Zeit (Zeitgeber time)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Terminologie der Chronobiologie.....	3
Abbildung 1-2: Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr in Säugetieren . ....	7
Abbildung 1-3: Synchronisation der zentralen und der peripheren Oszillatoren.....	11
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des TLR4-Komplex mit seinen Komponenten zur Erkennung von LPS. ....	20
Abbildung 1-5: Vereinfachtes Model der LPS induzierten Signalwege.....	22
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes eines circadianen Versuches.....	34
Abbildung 4-2: Analyse von Transkriptionsleveln mittels Microarrays.....	57
Abbildung 4-3: Expressionsanalyse von Makrophagen mittels Mircoarray.....	58
Abbildung 5-1: Die circadianen Uhrgene <i>Per2</i> und <i>Rev-Erb<math>\alpha</math></i> werden in der Milz und den Lymphknoten rhythmisch exprimiert. ....	62
Abbildung 5-2: Das Uhrgen <i>Bmal1</i> wird nicht signifikant circadian in der Milz exprimiert.. ....	63
Abbildung 5-3: Die Uhrgene <i>Per2</i> und <i>Rev-Erb<math>\alpha</math></i> oszillieren in der Zelllinie RAW 264.7.....	66
Abbildung 5-4: Die circadiane Uhr im Immunsystem ist ein autonomer Oszillator. ....	67
Abbildung 5-5: Ein autonomer Oszillator existiert in Immunzellpopulationen. ....	69
Abbildung 5-6: Die Gesamtzellzahl in der Milz unterliegt einer circadianen Oszillation.. ....	71
Abbildung 5-7: CD11b <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> -Zellen (Makrophagen) oszillieren sowohl in ihrem relativen Anteil in der Milz als auch in ihrer absoluten Anzahl. ....	72
Abbildung 5-8: CD19 <sup>+</sup> -Zellen (B-Zellen) oszillieren in ihrer absoluten Zellzahl in der Milz, jedoch nicht in ihrer relativen Anzahl. ....	75
Abbildung 5-9: CD90.2 <sup>+</sup> -Zellen (T-Zellen) oszillieren in ihrer relativen Zellzahl in der Milz, jedoch nicht in ihrer absoluten Anzahl.....	77
Abbildung 5-10: TNF $\alpha$ und IL-6 werden von primären Milzzellen nach LPS-Stimulation circadian sekretiert.....	79
Abbildung 5-11: TNF $\alpha$ wird von peritonealen Makrophagen nach LPS-Stimulation nicht signifikant circadian sekretiert. ....	80
Abbildung 5-12: Die Sekretion von IFN $\gamma$ nach Stimulation mit Concanavalin A von primären Milzzellen unterliegt keiner signifikanten circadianen Oszillation.....	82
Abbildung 5-13: TNF $\alpha$ wird nach LPS-Stimulation einer primären Milzzellkultur nicht signifikant circadian sekretiert.. ....	84
Abbildung 5-14: Im Laufradverhalten bestehen keine Unterschiede zwischen unoperierten und adrenalektomierten Mäusen. ....	85
Abbildung 5-15: Ein Makrophagen-intrinsisches Uhrwerk reguliert die TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation.....	85

---

Abbildung 5-16: TNF $\alpha$ wird nach der Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS circadian sekretiert.....	87
Abbildung 5-17: IFN $\gamma$ wird nach Stimulation mit Concanavalin A von primären Milzzellen aus adrenalektomierten Mäusen nicht circadian sekretiert.....	88
Abbildung 5-18: Normalisierte TNF $\alpha$ - und IL-6-Level nach Stimulation von primären Milzzellen mit LPS.....	90
Abbildung 5-19: In sortierten B-Zellen und T-Zellen gibt es keine signifikant unterschiedliche Uhrgenexpression zu den Zeitpunkten CT10 und CT22.....	92
Abbildung 5-20: In CD19 <sup>+</sup> CD90.2 <sup>-</sup> -Zellen existiert ein signifikanter Unterschied in der Uhrgenexpression zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22.....	93
Abbildung 5-21: In sortierten CD11b <sup>+</sup> -Zellen gibt es eine unterschiedliche Uhrgenexpression zu den Zeitpunkten CT10 und CT22.....	94
Abbildung 5-22: Effekte der circadianen Uhr auf die differentielle Genexpression in CD11b <sup>+</sup> Zellen (Makrophagen).....	98
Abbildung 5-23: In sortierten CD11b <sup>+</sup> -Zellen existiert eine Expression der <i>Lbp</i> -, <i>Irak4</i> - und <i>Tlr4</i> -Gene zu den Zeitpunkten CT10 und CT22.....	100

# 1 Einleitung

## 1.1 Circadiane Uhren

Jeder Organismus unterliegt aufgrund der Erdrotation einem täglichen Wechsel von Tag und Nacht. Durch die periodisch sich wandelnden Licht- und Temperaturverhältnisse verändert sich auch das Nahrungsangebot und die Gefährdung durch Feinde nimmt zu oder ab. Um sich an diese schwankenden Umweltbedingungen anpassen zu können, haben die meisten Organismen einen internen Mechanismus entwickelt, der ihnen hilft, die Tageszeit zu bestimmen: die circadiane Uhr (*circa dies*, lat. ungefähr ein Tag). Diese Uhr ermöglicht es den Organismen, periodisch wiederkehrende Licht- und Temperaturverhältnisse zu antizipieren, was sich im Laufe der Evolution als Vorteil erwies.

Circadiane Uhren richten sich in lichtsensitiven Organismen nach dem Tag-Nacht-Zyklus und unterliegen daher einem Rhythmus, dessen Periode ungefähr 24 Stunden beträgt. Sie werden durch Umwelteinflüsse wie Licht oder Temperatur jedoch lediglich „justiert“ bzw. synchronisiert. Ihre generelle Existenz im Organismus sowie ihre Periodizität sind aber von diesen äußeren Einflüssen unabhängig, weil sie genetisch determiniert sind.

Circadiane Uhren steuern endogene Rhythmen, nach denen wiederum bestimmte biologische Prozesse im Organismus ablaufen. Sie regulieren dadurch viele rhythmische Abläufe im Körper: angefangen von der molekularen Ebene bis hin zu physiologischen Parametern, z. B. der tageszeitlich variierenden Körpertemperatur sowie bestimmten Bewegungsaktivitäten von Nagetieren oder den Schlaf-Wach-Rhythmus beim Menschen [54].

Darüber hinaus gibt es Beispiele aus der Flora, die zeigen, dass viele Pflanzen ihre Blüten zu unterschiedlichen Tageszeiten öffnen oder schließen. Auf der Basis solcher Beobachtungen stellte Carl von Linné eine Blumen-Uhr zusammen, von der er behauptete, dass daran die Zeit abgelesen werden könne. Circadiane Rhythmen sind bis jetzt in vielen Organismen von Prokaryonten bis zu höheren Säugetieren beschrieben worden und reflektieren die Existenz einer intrinsischen Uhr, die rhythmische Vorgänge im Organismus steuert.

Erste Experimente, die zeigten, dass circadiane Rhythmen nicht nur durch Licht oder Temperatur vorgegeben, sondern von einem inneren Mechanismus gesteuert werden, führte 1729 der Franzose Jean Jacques d'Ortous de Mairan durch [46]. Er untersuchte die



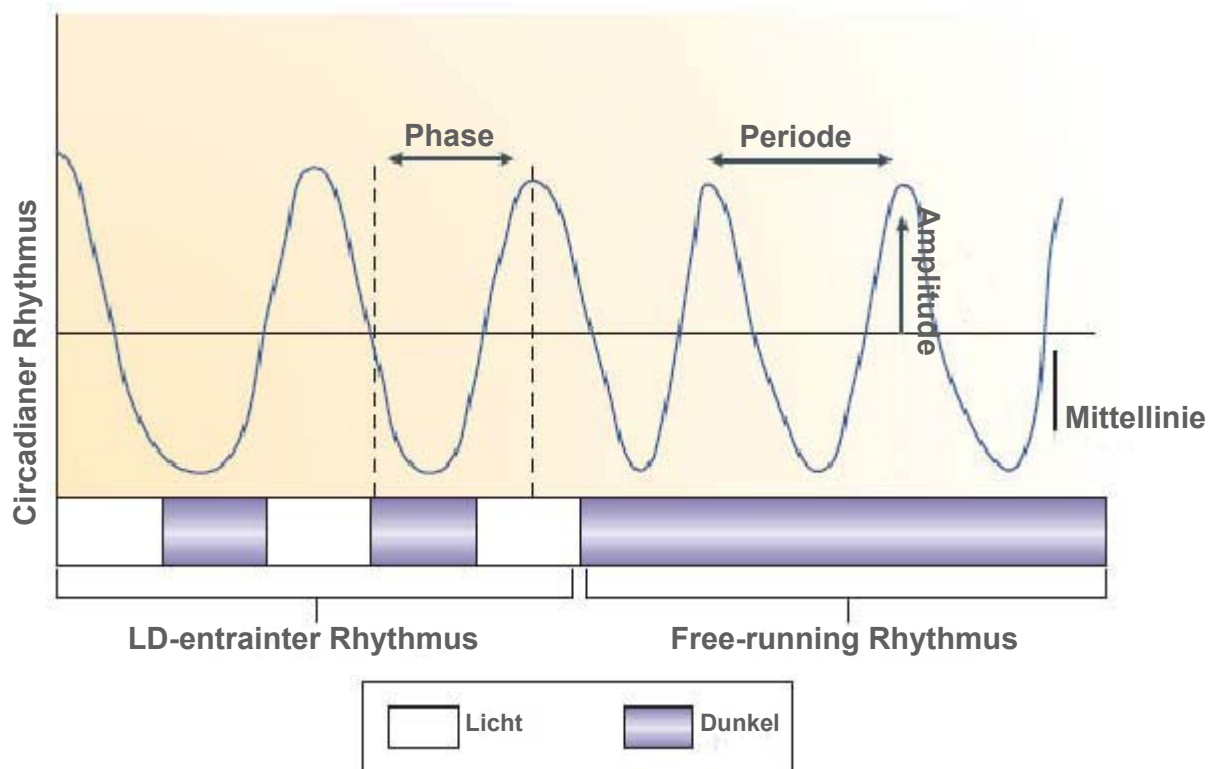
Blattbewegung der Mimose und fand heraus, dass sich das tägliche Öffnen und Schließen der Blätter auch in absoluter Dunkelheit in einem kaum veränderten 24-Stunden-Zyklus fortsetzt. Als Ursache dafür führte er einen ihm unbekanntem Umweltfaktor an, was später widerlegt werden konnte. Die Tatsache, dass die periodischen Änderungen auch unter konstanten Bedingungen stattfinden, gilt heute als zentrales Kriterium für das Vorhandensein einer circadianen Uhr. Erst rund 200 Jahre später (1932) konnte von E. von Bünning der Beweis erbracht werden, dass die Ausbildung der circadianen Uhr und deren Eigenschaften genetisch determiniert sind [28]. Er stellte fest, dass nach der Kreuzung von Pflanzen mit einer unterschiedlichen Periodenlänge eine intermediäre Periodenlänge zu beobachten ist. Im Jahre 1967 wurde von Pittendrigh dazu der genetische Beweis in Insekten erbracht [150]. Konopka und Benzer [101] konnten als erste zeigen, dass ein einzelnes Gen Einfluss auf den circadianen Rhythmus hat, indem sie eine circadiane Mutation in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifizierten. Sie nannten den Locus „period“, da die periodische Bewegungsaktivität in diesen Mutanten verändert vorlag. Eine annähernde Aufklärung der genetischen Komponenten der circadianen Uhr erlangte man erst mit molekulargenetischen Methoden in den 90er Jahren. Von 1995 bis 1999 wurden eine Reihe von Genen in der Fruchtfliege identifiziert wie *Timeless (tim)*, *Clock (clk)*, *Cycle (cyc)*, *Doubletime (dbt)*, *Cryptochrome (cry)* und *Trille (vri)* [22,98,132,169]. Für die meisten *Drosophila*-Gene wurden Orthologe in Säugetieren gefunden wie die Period-Genen *mPer1*, *mPer2* und *mPer3*, zwei Cryptochrom-Genen *mCry1* und *mCry2*, sowie *Clock* und *Bmal1* (Ortholog zu *Cycle*) und *Casein Kinase 1* (Ortholog zu *Doubletime*) [6,98,190,195,220]. Durch molekulare, biochemische und physiologische Methoden und anhand von Untersuchungen der lokomotorischen Aktivität von Nagetieren wurden folgende universelle Eigenschaften der circadianen Uhr aufgeklärt:

Merkmale der circadianen Uhr:

1. Circadiane Rhythmen besitzen eine endogene Periodenlänge von zirka 24 Stunden.
2. Die circadiane Uhr wird durch rhythmische äußere Stimuli, sogenannte Zeitgeber wie z. B. Licht und Temperatur, synchronisiert (Entrainment).
3. In Abwesenheit von periodisch wiederkehrenden Einflüssen persistiert die circadiane Rhythmik für eine unbegrenzte Zeit weiter.
4. Der circadiane Rhythmus ist zellautonom, d. h. jede Zelle besitzt die notwendigen Komponenten zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der circadianen Uhr.
5. Die Periode der circadianen Uhr ist temperaturkompensiert, d. h. Änderungen der Außentemperatur über einen großen Bereich beeinflussen nicht die Periode.

## 1.2 Terminologie der Chronobiologie

Biologische Prozesse im Organismus können Rhythmen mit einer unterschiedlichen Periodenlänge aufweisen. Diese Rhythmen unterliegen einer Wellenform und besitzen dementsprechend Maximum-zu-Maximum-Intervalle. Moleküle, Zellen oder Gewebe, die bei der Rhythmusgebung involviert sind, werden als Oszillatoren bezeichnet. Einige davon weisen eine Periode von ungefähr 24 Stunden auf, weshalb die von ihnen generierten Rhythmen circadiane Oszillationen genannt werden. Die Terminologie dieser Oszillationen ist in Abbildung 1-1 dargestellt.



**Abbildung 1-1:** Terminologie der Chronobiologie. Weitere Erläuterungen siehe Text. Nach Bell-Pederson *et al.* [20].

Jede Oszillation kann mit Hilfe der Phase, Periode und Amplitude näher beschrieben werden. Ein dominanter Zeitgeber für die meisten Organismen ist der Licht-Dunkel-Rhythmus (LD). Durch die Aufnahme von Umweltreizen, wie Licht, kann sich der circadiane Oszillator auf die lokale Zeit einstellen. Dabei nimmt der Rhythmus mit einem Umweltreferenzpunkt (Licht oder Dunkelheit) eine stabile Phase ein. Die Phase beschreibt somit die zeitliche Lage eines Punktes auf der Rhythmuskurve im Verhältnis zum Zeitgeber. Als Periode wird das Zeitintervall bezeichnet, welches der Oszillator benötigt, um einen kompletten Zyklus zu durchlaufen. Als Amplitude einer Oszillation wird die maximale Oszillationsauslenkung von der mittleren Oszillation verstanden. Wenn der endogene Rhythmus auf einen exogenen 12-Stunden-Licht-

Dunkel-Rhythmus abgestimmt ist, beträgt die Periode 24 Stunden. Werden Organismen unter bestimmten LD-Bedingungen gehalten, spricht man von der Zeitgeber-Zeit (ZT). Fällt der Zeitgeber weg (DD), spricht man von dem „Free-running Rhythmus“ und der Circadianen Zeit (CT).

### **1.3 Suprachiasmatischer Nukleus (SCN) als Hauptschrittmacher in Säugetieren**

In einzelnen Lebewesen ist das circadiane System sehr unterschiedlich organisiert. Während in Einzelzell-Organismen wie Prokaryonten und Cyanobakterien jede Zelle ein Einzeloszillator ist, der verschiedene Prozesse reguliert, können Mehrzell-Organismen mit verschiedenen Geweben/Organen die Funktion in unterschiedlichen Zelltypen aufteilen, um gewebespezifische Rhythmen zu koordinieren und zu präzisieren. Pflanzen und Pilze besitzen in vielen Zellen circadiane Uhren, ohne dass ein übergeordneter Taktgeber bis heute identifiziert wurde. Da viele Prozesse im Säugetierorganismus (z. B. Melatoninausschüttung, Körpertemperatur, Kortisolabgabe) tageszeitlichen Rhythmen unterliegen, wurde vermutet, dass diese Oszillationen ebenfalls von einer endogenen Uhr gesteuert werden. Eine Spezialisierung und Zentralisierung eines Hauptschrittmachers im Zentralen Nervensystem (ZNS) wurde daraufhin ausgemacht. Dennoch besitzen viele periphere Organe und Gewebe ebenso eine Innere Uhr [14]. In *Drosophila* befindet sich das Schrittmacherzentrum zum Beispiel in einer kleinen Gruppe von 5 – 6 bilateralen symmetrischen Neuronen (sLNvs) nahe der optischen Loben [59,183]. Diese Neuronen erhalten Lichtinformationen über einen retinalen Photorezeptor im Auge und durch extra-retinale Photorezeptoren im Gehirn. Da diese Tiere zudem lichtdurchlässig sind, haben auch deren periphere Uhren einen direkten Zugang zu den Lichtinformationen und sind dadurch in der Lage, sich direkt mit dem Licht zu synchronisieren [145,151].

In Säugetieren konnte ein Bereich im vorderen Hypothalamus ausgemacht werden, der als circadianer Hauptschrittmacher fungiert. 1972 zeigten zwei Forschergruppen unabhängig voneinander, dass es zu einem Verlust des circadianen Rhythmus kommt, wenn Teile dieser Hirnregion in Ratten entfernt werden [127,186]. Diese Region wird als suprachiasmatischer Nukleus (SCN) bezeichnet. Er ist paarig angelegt und befindet sich oberhalb des optischen Chiasmas. Bei Mäusen besteht er aus einer Ansammlung von zirka 10000 heterogenen Neuronen. Aufgrund seiner Architektur wird der SCN in einen dorsomedialen („shell“) und in einen ventrolateralen („core“) Teil unterteilt [128,203]. Durch weitere Läsionsstudien und Transplantationsversuche konnten die Eigenschaften des SCN näher charakterisiert werden. So führt etwa die Zerstörung der Neuronen des SCN im Goldhamster zum Verlust der

circadianen Rhythmen in der Nahrungsaufnahme, Aktivität, Körpertemperatur und Sekretion von Hormonen wie Prolaktin, Melatonin, Wachstumshormon und Kortison [122]. Auf der Verhaltenssebene (Lauf- und Trinkverhalten) können diese Rhythmen durch Re-Transplantation von fetalem SCN-Gewebe wieder hergestellt werden. Das Tier nimmt dabei den Phänotyp des Spendertieres an [162,181]. Jedoch können auf diesem Weg nicht alle Rhythmen wieder hergestellt werden, wie die rhythmische Sekretion von Hormonen wie Kortikosteroide und Melatonin und die Rhythmen der Körpertemperatur [122]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Weiterleitung der Projektion auf der Retina zum SCN über den retinohypothalamischen Trakt für die Synchronisation durch externe Zeitgeber wichtig ist [126].

Dass der SCN ein autonomer Oszillator ist, bewies schon 1979 Inouye, indem er zeigte, dass Neurone des SCN *in vivo* ihre circadiane elektrische Aktivität beibehalten, während diese in anderen Gehirnregionen zerstört wurden [90]. Später konnte beobachtet werden, dass jedes einzelne SCN-Neuron die Fähigkeit hat, die Phasenlänge an veränderliche äußere Einflüsse anzupassen [208]. Gleiche Ergebnisse erzielte man mit SCN-Explantaten von transgenen Mäusen, die unter der Kontrolle des *Per1*-Promotors ein *Luziferase*-Reporter gen exprimieren [212]. Damit wurde gezeigt, dass die Neuronen des SCN eine selbsterhaltene molekulare und physiologische Oszillation generieren können. Dabei spielt die Kopplung zwischen den SCN-Neuronen eine wichtige Rolle bei der Synchronisation des Oszillators [112].

Zusammengefasst zeigt der SCN folgende Eigenschaften eines endogenen circadianen Hauptschrittmachers:

1. Der SCN fungiert als übergeordneter Hauptschrittmacher, da durch Läsionen desselben viele circadiane Rhythmen im Organismus eliminiert werden.
2. Läsionen des Input-Signalweges des SCN verhindern das Anpassen an Umgebungssignale.
3. Der SCN ist ein autonomer circadianer Oszillator, dessen Zellen miteinander gekoppelt sind und so ein einheitliches Outputsignal generieren.

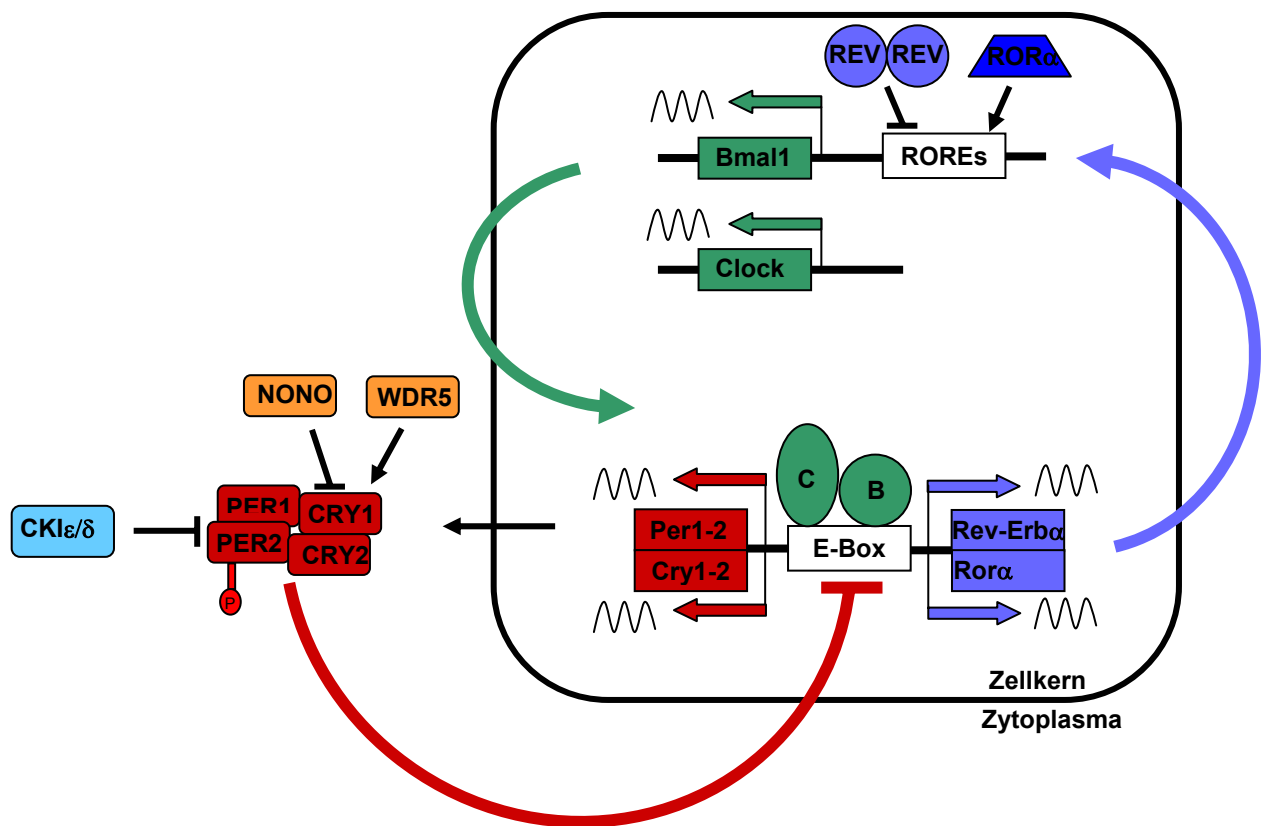
## 1.4 Molekularer Mechanismus

Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr in Cyanobakterien, Pilzen, Insekten und Säugetieren ist in den letzten Jahrzehnten gut untersucht worden. Interessanterweise teilen sich alle Organismen einen gleichen grundlegenden Mechanismus, der aus positiven und negativen Elementen besteht. Innerhalb jeder Zelle kann so ein circadianer Rhythmus durch eine autoregulatorische transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleife generiert werden,

die ungefähr 24 Stunden beträgt. Der augenscheinlichste Unterschied zwischen den Organismen ist in den Komponenten zu sehen, die den Rhythmus erzeugen.

In Cyanobakterien sind beispielsweise drei Gene an der Ausbildung der circadianen Uhr beteiligt: *kaiA*, *kaiB* und *kaiC* [70,92]. Dieselben Gene regulieren ebenso die Zellteilung in diesen Einzellern. In *Neurospora crassa* (einzelliger Pilz) bilden ebenfalls nur drei Komponenten die Rückkopplungsschleife aus. Das negative Element ist dabei *Frequency (frq)*, die positiven Elemente bilden *White collar 1* und *2 (wc-1, wc-2)* [55]. Im Gegensatz dazu, benötigt das Drosophila-System mehr Gene zur Generation einer circadianen Oszillation, die in fast allen Organen/Geweben der Fliege exprimiert werden: *Period (per)*, *Timeless (tim)*, *Clock (clk)* und *Cycle (cyc)* [78].

In Säugetieren bestehen die positiven aktivierenden Elemente aus den Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 und die negativen repressierenden Elemente aus den drei *Period*-Genen (*Per*) und den zwei *Cryptochrom*-Genen (*Cry*). Die beiden positiven Transkriptionsfaktoren CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) und BMAL1 (CLOCK-Brain, Muscle Arnt-like-1; auch MOP3 genannt) [27,67,97] besitzen basic helix-loop-helix (bHLH) und PAS- (Per-Arnt-Sim) Domänen, die für die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig sind. Sie formen zusammen Heterodimere, die zur Aktivierung der Transkription der *Per*-Gene sowie der *Cryptochrom*-Gene führen. Dazu binden die Heterodimere CLOCK:BMAL1 an DNA-Promotor-Elemente, an sogenannte E-Box-Enhancer-Elemente, welche durch die kanonische Nukleotid-Sequenz CACGTG gekennzeichnet sind [67]. Diese E-Boxen befinden sich in allen *Per*- und *Cry*-Promotorregionen [199]. Nach der Translation kommt es im Zytoplasma zu einer Komplexbildung aus dem PER- und CRY-Protein. Mit Hilfe der Caseinkinase I $\epsilon$  bzw. I $\delta$  werden sie phosphoryliert. Die phosphorylierten Komplexe translozieren wieder zurück in den Kern und inhibieren als negative Regulatoren ihre eigene Transkription durch die Hemmung der Aktivität von CLOCK/BMAL1. Dabei bindet der PER/CRY-Komplex an den bereits bestehenden Komplex aus CLOCK:BMAL1-Heterodimer und E-Box-Sequenz. Hier tritt besonders CRY als negativer Regulator in direkter Interaktion mit CLOCK und/oder BMAL1 hervor [104,140,206]. Als Ergebnis kommt es zur Inhibition der Transkription der *Per*- und *Cry*-Gene, wodurch im weiteren Verlauf die mRNA und Proteinmengen der *Per*- und *Cry*-Gene im Zytoplasma sinken. Auch im Zellkern nimmt die Konzentration der PER- und CRY-Proteine durch Abbauprozesse kontinuierlich ab, sodass die Inhibition von CLOCK:BMAL1 schließlich aufgehoben wird und ein neuer Zyklus beginnen kann (siehe Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2:** Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr in Säugetieren [167,173]. Der Uhrmechanismus besteht aus positiven und negativen Transkriptions- Translations- Rückkopplungsschleifen. CLOCK (C, grün) und BMAL1 (B, grün) bilden Heterodimere und aktivieren die Transkription der *Per*-, *Cry*-, *Rev-Erbα*- und *Rorα*-Gene durch die Bindung an E-Box-Enhancer-Elemente. Die mRNA dieser Uhr gene wird im Zytoplasma translatiert. PER- und CRY-Proteine bilden einen Komplex und PER wird von den Kinasen CKI $\epsilon/\delta$  phosphoryliert. Diese aktivierten PER-CRY-CKI $\epsilon/\delta$ -Komplexe translozieren wieder zurück in den Zellkern und binden an die CLOCK/BMAL1-Komplexe an der DNA. Dadurch wird die Transkription von *Per* und *Cry* gehemmt. Eine weitere Rückkopplungsschleife wirkt durch *Rev-Erbα* (blau) und *Rorα* (blau). Die Proteine REV-ERB $\alpha$  inhibieren die Transkription von *Bmal1*, wogegen ROR $\alpha$  aktivierend wirkt. Durch die Hemmung der PER-CRY-Komplexe wird auch die Transkription von *Rev-Erbα* und *Rorα* inhibiert, wodurch es im weiteren Verlauf wieder zu einer Aktivierung von *Bmal1* kommt (durch die Aufhebung der Hemmung von REV-ERB $\alpha$  an ROR-Elemente) und ein neuer Zyklus beginnen kann.

In der Clock-Mutante *Clock* $\Delta$ 19, dessen Mutante das 19tes Exon fehlt, kommt es zwar zu einer Heterodimerisierung mit BMAL1 und zur Bindung an die DNA, aber zu keiner Aktivierung der Transkription [67]. Die lokomotorische Aktivität dieser Mutante zeigt einen circadianen Rhythmus mit einer veränderten Periode von 28 Stunden und keinen völligen Verlust der rhythmischen Bewegungsaktivität (Arrhythmizität) [205]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *Clock* für eine circadiane Oszillation sowohl auf mRNA-Ebene als auch für die lokomotorische Aktivität nicht essentiell notwendig ist [47]. Eine Hypothese besagt zudem, dass ein anderer Transkriptionsfaktor die Funktion von *Clock* kompensiert. Dieser Transkriptionsfaktor könnte *Npas2* (Neuronal PAS domain protein 2) sein, der ebenfalls mit *Bmal1* heterodimerisieren und aktivierend durch die Bindung an E-Boxen wirken kann [48]. *Npas2* konnte bis jetzt im SCN nicht nachgewiesen werden, sondern nur in anderen Hirnregionen wie dem Vorderhirn [165].

In einer weiteren regulatorischen Rückkopplungsschleife aktiviert das CLOCK:BMAL1-Heterodimer neben der *Per*- und *Cry*-Transkription auch die Transkription der nukleären „orphan“ Rezeptor-Gene *Rev-Erb $\alpha$*  und *Rora* [157,171]. Die Proteine REV-ERB $\alpha$  und ROR $\alpha$  konkurrieren anschließend um die Bindung an ROR-Elementen (Retinoic Acid-related Orphan Receptor Response Elements) im *Bmal1*-Promotor. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder derselben Protein-Familie von ROR ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) und REV-ERB ( $\alpha$  und  $\beta$ ) in der Lage sind, die Transkription von *Bmal1* über ROR-Elemente zu regulieren [73]. RORs aktivieren die Transkription von *Bmal1* [3], wogegen REV-ERBs die Transkription hemmen [157]. Somit inhibiert REV-ERB $\alpha$ , im Gegensatz zu PER/CRY, seine eigene Transkription indirekt durch die Bindung an ROR-Elementen im *Bmal1*-Promotor und unterdrückt damit die Expression des eigenen Aktivators. Durch die Inhibition von CLOCK:BMAL1 durch PER:CRY-Komplexe wird auch die Aktivierung der *Rev-Erb $\alpha$* -Synthese abgeschaltet, was im weiteren Verlauf zu einer erneuten Aktivierung von *Bmal1* führt (siehe Abbildung 1-2).

Für die Regulation des „Uhrwerks“ sind nicht nur die Interaktionen der Transkriptionsfaktoren verantwortlich, auch post-translationale Mechanismen, wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung, spielen eine wichtige Rolle. Für die Ausbildung einer Oszillation ist eine ausreichend große zeitliche Verzögerung zwischen Bildung und Akkumulation der Proteine im Zytoplasma und ihrer Aktivität im Zellkern notwendig, die über solche Mechanismen reguliert werden. Dabei spielt die Phosphorylierung bei der Regulation der circadianen Uhr eine wichtige Rolle. Proteine werden durch die Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau markiert. Die Aminosäuren Serin und Threonin der Uhr-Proteine werden von den Casein-Kinasen CK1 $\epsilon$  und CK1 $\delta$  phosphoryliert [115]. CK1 $\epsilon$  phosphoryliert PER1 und PER2, wogegen CK1 $\delta$  PER1, PER2, CRY1, CRY2 und BMAL1 *in vitro* phosphorylieren kann [4,56].

Dabei wird die Existenz von funktionellen Phosphorylierungsstellen postuliert, die unterschiedliche Effekte auf die Stabilität, Aktivität und Lokalisation des Proteins und damit auf die Periode ausüben können [204]. Ebenso wurde die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MAPK für die *in vitro*-Phosphorylierung von BMAL1 beschrieben [170]. Weiterhin ist BMAL1 als Substrat für Sumorylierungen bekannt [32]. Rhythmische Histon-Acetylierungen steuern die Transkription an circadian regulierten Promotoren [58]. Diese translationalen Uhrprotein-Modifikationen tragen signifikant zur Präzision der circadianen Uhr bei, da sie die Stabilität und Kernlokalisation der Uhrgene beeinflussen. Dabei ist eine koordinierte Aktivität der verschiedenen Enzyme wie Kinasen und wahrscheinlich auch Phosphatasen für einen zeitlich organisierten Ablauf der 24-Stunden-Kinetik des Uhrwerks sehr wichtig.

Dieser zeitliche Ablauf sieht wie folgt aus: *Per* und *Cry* zeigen eine robuste circadiane Oszillation sowohl in ihrer mRNA- als auch in ihrer Proteinmenge mit einem Maximum in der Mitte der subjektiven Lichtperiode. BMAL1 dagegen zeigt eine circadiane Oszillation mit einem Maximum um Mitternacht (CT18) im SCN, deren Amplitude aber wesentlich kleiner ist als bei PER und CRY. *Clock* zeigt in fast allen Geweben weder in seinen Transkripten noch in seinen Proteinen eine circadiane Oszillation. Das zeitliche Muster der Uhrgenexpression ist jedoch in jedem Organ/Gewebe unterschiedlich, weshalb der circadianen Uhr in peripheren Organen auch verschiedene Funktionen zugeordnet werden können.

In letzter Zeit wurden immer mehr Gene gefunden, die eine Rolle in der Feinregulierung der circadianen Uhr spielen. So wurden das RNA-bindende-Protein NONO und das Histon-Methyl-Transferase-bindende-Protein WDR5 gefunden, die für die Geschwindigkeit der circadianen Uhr verantwortlich sind [25]. Mit dem CLOCK-Interacting Protein, Circadian (CIPC) wurde ein Protein charakterisiert, welches ein weiterer Inhibitor der CLOCK-BMAL1-Aktivität ist und damit einen zusätzlichen Regulator der negativen Rückkopplungsschleife darstellt [218]. Weiterhin wurde mit dem F-Box-Protein FBXL3 ein Protein gefunden, das für die Degradation der CRY-Proteine und damit neben anderen Molekülen für die Steuerung der Periodenlänge verantwortlich ist [29,69,180].

## **1.5 Mechanismen zur Synchronisation mit der Umwelt – Entrainment**

Die circadiane Uhr besitzt eine Periode von ungefähr 24 Stunden. Wegen dieser „Ungenauigkeit“ ist es wichtig, diese Uhr immer neu „einzustellen“, um eine Synchronisation des Organismus mit der Umwelt zu gewährleisten. Bei Säugetieren ist nur der SCN in der Lage, auf äußere Lichtsignale zu reagieren und seine Phase entsprechend danach auszurichten (Entrainment). Für das Photo-Entrainment wird die Lichtinformation durch elektrische Signale



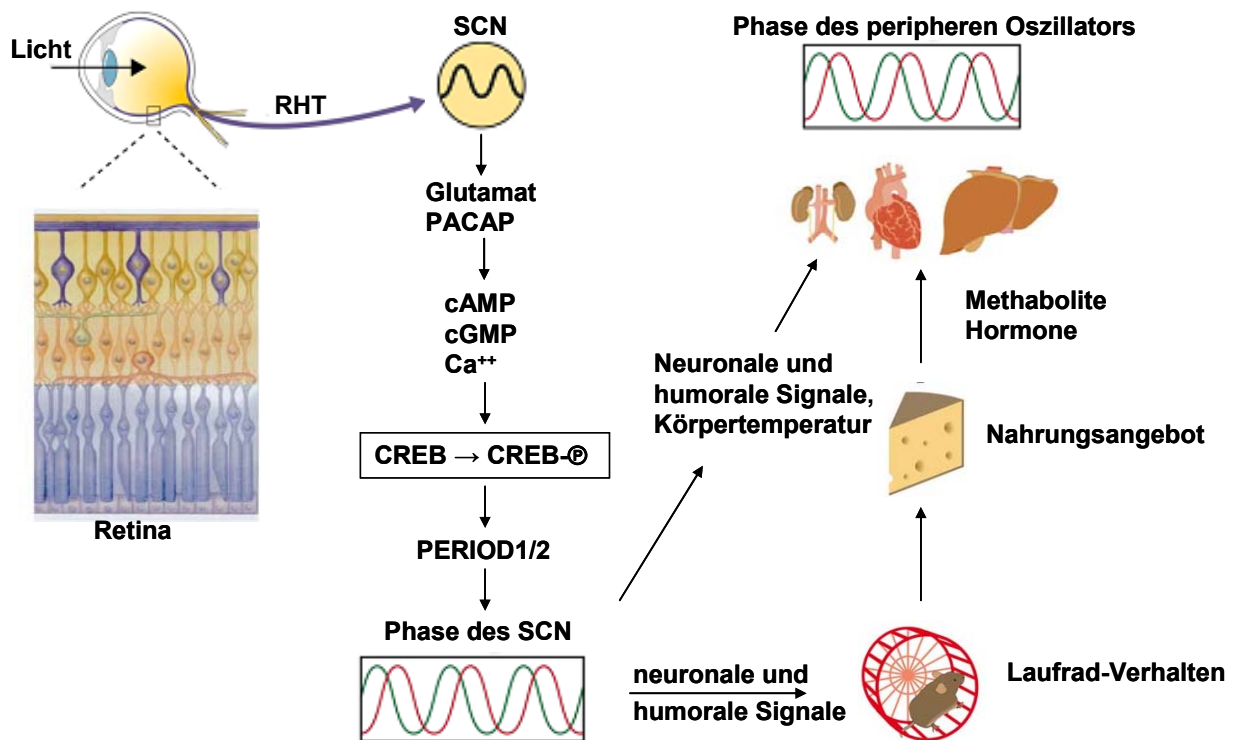
von der Retina zum ventrolateralen Teil des SCN über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) geleitet. Doch die klassischen Photorezeptoren in Säugetieren – Stäbchen und Zapfen – sind nicht allein am Entrainment beteiligt, da visuell blinde Mäuse ein normales Verhalten auf Licht zeigen [63]. Die Identifikation eines neuen Photopigments stellte sich als schwierig heraus. Mit Melanopsin wurde ein möglicher Botenstoff gefunden, der spezifisch in den retinalen Ganglienzellen (RGC) exprimiert wird [158,159]. Diese Melanopsin-enhaltenden RGCs besitzen Axone, die den RHT ausmachen, welche die Photosignale zum SCN leiten [71,77,81]. Doch Melanopsin-Knockout-Mäuse können immer noch mit äußeren Licht-Dunkel-Rhythmen synchronisieren [144,168]. Nur Mäuse, die weder Melanopsin noch ein funktionierendes Stäbchen-Zapfen-System besitzen, verlieren die Fähigkeit, auf äußere Lichtreize zu reagieren. Demnach sind sowohl klassisch visuelle Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) als auch das nicht-visuelle Melanopsin „circadiane Photorezeptoren“, die für ein Entrainment erforderlich sind.

Als Reaktion auf Licht werden die Neurotransmitter Glutamat und PACAP („pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“) vom RHT freigegeben. Diese stimulieren über Rezeptoren die SCN-Neuronen und bewirken damit die Ausschüttung von Kalziumionen. Infolge dessen werden weitere Protein-Kinasen aktiviert (Protein Kinase A und C, MAP-Kinase) und es kommt zur Phosphorylierung von CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding Protein). Weitere Signale verursachen die Induktion der Uhrgene *Per1* und *Per2* [6,177] (siehe Abbildung 1-3). Dieser Mechanismus funktioniert aber nur bei Lichtpulsen während der subjektiven Nacht, da Mäuse während der Lichtphase kaum auf weitere Lichtpulse reagieren können. Bei einer Applikation des Lichtpulses in der frühen Nacht verzögert sich der circadiane Oszillator („delay“) und es kommt am Folgetag zu einem verspäteten Beginn der Aktivität. Wird der Lichtpuls dagegen während der späten Nacht gegeben, beschleunigt sich der Oszillator („advance“) und es kommt zu einem verfrühten Beginn der Aktivität. Mutationen in *Per1* und *Per2* zeigen, dass diese Gene wichtig für das normale Entrainment sind, und dass sie Zielgene des Licht-Induktionsweges sein könnten. *Per1*-Mutanten zeigen keinen „advance“, während *Per2*-Mutanten keinen „delay“ machen können [7].

## 1.6 Periphere Uhren und ihre Funktionen

Entscheidend für die Generierung der circadianen lokomotorischen Aktivität ist die Existenz des SCNs. Doch nicht nur dort gibt es eine circadiane Expression der Uhrgene. Ursprünglich glaubte man, dass ein circadianer Schrittmacher in nur wenigen spezialisierten SCN-Zellen existiert. 1996 gelang aber der Arbeitsgruppe um G. Tosini und M. Menaker die erste direkte Demonstration eines circadianen Oszillators in Säugetieren, der außerhalb des SCN lokalisiert

ist. Es wurde gezeigt, dass die neurale Retina eine stabile Rhythmik in der Melatonin synthese aufweist, welche durch Lichteinfluss verändert werden kann [198]. Eine circadiane Genexpression konnte ebenfalls in primären und immortalisierten nicht-neuralen Rattenfibroblasten gefunden werden [16]. Danach wurden in fast allen peripheren Organen circadiane Uhren nachgewiesen [214].



**Abbildung 1-3:** Synchronisation der zentralen und der peripheren Oszillatoren. Der zentrale Schrittmacher im SCN wird durch Licht-Dunkel-Rhythmen synchronisiert. Dieser koordiniert wiederum periphere Oszillatoren durch Verhaltensrhythmen, neuronale und humorale Signale (Details siehe Text) nach Schibler 2006 [172].

Der Fakt, dass Uhrgene circadian exprimiert werden, reicht aber nicht allein für die Existenz einer circadianen Uhr in diesen Organen aus. Die rhythmische Genexpression könnte auch von zyklisch ausgeschütteten Hormonen wie z. B. Kortisol getrieben werden, deren Sekretion vom SCN gesteuert wird. Eine eindeutige Identifikation einer unabhängigen circadianen Oszillation ist bei einer weiterhin rhythmischen Genexpression unter konstanten Bedingungen gegeben, bei einer Abkopplung aller systemischen Faktoren. Durch die Kultivierung von Geweben *in vitro* konnte man diese Bedingungen schaffen. Unter der Verwendung von transgenen Ratten, die unter der Kontrolle eines *Per1*-Promotors ein *Luziferase*-Gen exprimieren, ergab sich die Möglichkeit, die Expression des Uhrgens *Per1* in

Echtzeit auszulesen [214]. In Lunge, Leber, Niere und Skelettmuskulatur wurden circadiane Biolumineszenz-Rhythmen gefunden, die aber nach zirka sieben Tagen ausdämpfen, während in kultivierten SCNs eine Rhythmik über einen Zeitraum von 32 Tagen und länger beobachtet werden konnte. Diese Daten deuten daraufhin, dass periphere Oszillationen weniger robust sind als die Oszillationen im SCN. Konträr dazu konnten in PER2::LUZIFERASE (PER2::LUC) knock-in-Mäusen robuste Oszillationen in peripheren Organen über 20 Zyklen gefunden werden, die sich in der Amplitude ähnlich wie der SCN verhielten [216]. Die Phase und auch die Periode dagegen sind gewebespezifisch, z. B. besitzt die Kornea nur eine Periode von 22,2 Stunden und erreicht ihr *Per2*-Maximum ungefähr zwei Stunden nach dem SCN. Die Niere wiederum besitzt eine Periode von 24,8 Stunden und erreicht ihren *Per2*-Peak vier Stunden nach dem SCN. Auch in SCN-läsionierten Mäusen persistieren periphere Oszillationen *ex vivo*, doch sowohl die Phasen der Organe desselben Tieres, als auch die Phasen der Organe unterschiedlicher Tiere desynchronisieren [188,216]. Damit scheint sich die Rolle des SCN für die innere Uhr einiger peripherer Gewebe auf deren Phasenkoordination zueinander und zum SCN zu beschränken. Bei einem leberspezifischen Knockout der circadianen Uhr oszillieren 90 Prozent aller vorher rhythmischen Gene in der Leber nicht mehr, was darauf hinweist, dass sie von einer lokalen zellulären Uhr und nicht vom SCN gesteuert werden [102].

Obwohl periphere Gewebe dieselbe Periodizität und die gleichen grundlegenden molekularen Mechanismen wie der SCN zeigen, müssen also Unterschiede zwischen den Geweben bestehen [214]. Periphere Uhren oszillieren zwar in einer autonomen Weise, aber sie werden durch einen zentralen Schrittmacher (SCN) koordiniert. Doch wie funktioniert die Synchronisation der peripheren Organe?

Die Organisation des circadianen Gesamtablaufs erfolgt in hierarchischer Weise über den SCN, der periphere Organe/Gewebe synchronisiert und sie damit an die Umwelt anpasst. Periphere Organe wiederum regulieren lokale physiologische Rhythmen über „clock-controlled-genes“(ccgs) [143]. Molekulare Mechanismen der peripheren Uhren, die weitestgehend mit denen im SCN vergleichbar sind, unterscheiden sich nur in der Art ihrer Synchronisation. Während der SCN durch Licht synchronisiert wird, müssen periphere Uhren in Säugetieren über chemische und/oder neuronale Signalwege oder durch die Körpertemperatur synchronisiert werden, im Gegensatz zur Fruchtfliege oder dem Zebrafisch, deren periphere Uhren lichtsensitiv sind. Periphere Uhren unterliegen dabei einer Phasenverzögerung von vier bis zwölf Stunden hinter dem SCN. Diese Verschiebung könnte einen Hinweis auf die Zeitspanne geben, die die Signale benötigen, um vom SCN zu der Peripherie zu gelangen [221]. Eine Vielzahl an Substanzen kann in kultivierten Fibroblasten eine circadiane Oszillation der Genexpression induzieren, die nukleäre Hormonrezeptoren (Glukokortikoidrezeptor, retinoic acid receptor), G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Tyrosinkinaserzeptoren und Ca<sup>2+</sup>-Kanäle

aktivieren können [15,173,211]. Auch die gering schwankende Oszillation der Körpertemperatur kann periphere Organe synchronisieren [26].

Bis zum heutigen Stand der Forschung ist die genaue molekulare, neuronale und/oder humorale Steuerung der peripheren Oszillatoren durch den SCN unklar geblieben. Der wahrscheinlich wichtigste Zeitgeber, unabhängig vom SCN, von peripheren Oszillatoren ist die Verfügbarkeit von Futter. Werden zum Beispiel nachtaktive Nager für mehr als eine Woche ausschließlich tagsüber gefüttert, dann kehrt sich die Phase der circadianen Genexpression in der Leber als auch in Pankreas, Herz, Skelettmuskel, Niere und Lunge komplett um und wird vom SCN entkoppelt [43]. Auch extreme Phasenverschiebungen des Licht-Dunkel-Zyklus können zu Entkopplungen zwischen Peripherie und SCN führen. Während die Neuronen des SCN unmittelbar auf einen veränderten Hell/Dunkel-Zyklus reagieren, scheinen die Zellen der peripheren Gewebe (z. B. Leber und Niere) einer Art „Jet-Lag“ zu unterliegen.

Weiterhin können Neurotransmitter und neurosekretorische Faktoren an der Synchronisation der Peripherie beteiligt sein. Zwei mögliche Übermittler konnten bislang identifiziert werden: die Neuropeptide Transforming-growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) und Prokineticin-2 (PK2) [18,38,103]. Beide Peptide werden circadian im SCN exprimiert und unterdrücken nach Infusion in den dritten Ventrikel das Laufradverhalten. Im Gegensatz zu Verhaltensrhythmen benötigen endokrine Rhythmen eine neurale Verbindung vom SCN zu den peripheren Organen [75,134]. Aus diesem Grund wird bei einer SCN-Läsion auch die circadiane Sekretion von Adrenocortikotropin (ACTH) und Kortisol unterbunden [122,127,193], was auf eine neurale Verbindung vom SCN zur Nebennierenrinde hinweist. Dabei scheinen neurale Efferenzen über das autonome Nervensystem zu existieren [18].

Auch humorale Faktoren können Signaltransduktionswege, welche molekulare Oszillatoren in Zellen peripherer Gewebe beeinflussen, stimulieren. Rhythmisch sekretierte Hormone wie Kortisol und Melatonin können auch das Immunsystem beeinflussen [31,182]. Kortisol [15] und Melatonin [68,185] wurden bereits näher als mögliche Synchronisationssignale beschrieben. Kortisol nimmt dabei eine besondere Rolle für die circadiane Synchronisation des Immunsystems ein, da diesem Hormon die Regulation vieler rhythmischer Immunfunktionen zugeschrieben wird. Neben Kortisol und Melatonin gibt es noch weitere Mediatoren, die sowohl eine Rhythmik als auch potenzielle immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, wie Dehydroepiandrosteron, Östrogen, Progesteron, Testosteron, Adrenocortikotropin (ACTH), Vasopressin,  $\beta$ -Endorphin, Prolactin und Thyroidea-stimulierendes Hormon [21]. Diese Mediatoren sind somit potenzielle Zeitgeber, die die Oszillation und Funktion von Immunzellen beeinflussen können. Ebenso synchronisiert die Leber in Abwesenheit von z. B. Glukokortikoid-Hormonen viel schneller zu dem rhythmischen Nahrungsangebot als in Anwesenheit [108]. Das heißt, Hormone sind einerseits in der Lage periphere Oszillatoren über eine Beeinflussung der Transkription der Uhrgene zu synchronisieren [15] und können gleichzeitig als Inhibitor der

Dissoziation zwischen zentraler Uhr (SCN) und peripheren Organen fungieren. Auf der anderen Seite scheinen Hormone wie Insulin für die Synchronisation der Leber überflüssig zu sein [45].

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Synchronisation der peripheren Oszillatoren scheint die Existenz der „clock-controlled-genes“ (ccgs) zu sein. Als ccgs werden Gene bezeichnet, deren Expression durch die circadiane Uhr kontrolliert wird, die aber selbst nicht für das Fortbestehen der Oszillation notwendig sind. Diese Gene setzen die synchronisierten molekularen Oszillationen in lokale Rhythmen um. Die Regulation ihrer Genexpression kann auf transkriptioneller, translationaler sowie post-transkriptioneller bzw. post-translationaler Ebene erfolgen. Zu diesen Genen gehören z. B. *Dbp* (Albumin D-Element binding Protein) und *E4bp4*.

Zusammenfassend synchronisiert der SCN periphere Organe in direkten oder indirekten Weise über vielzählige neuronale, humorale und andere Signalwege. Die Synchronisationswege sind dabei vermutlich gewebespezifisch.

### **1.6.1 Aufklärung des circadianen Expressionsmuster in peripheren Uhren mittels Microarrays**

Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden bislang verschiedene Gewebe aus Maus und Ratte auf ihr circadianes Gen-Expressionsmuster hin untersucht [102,124,137,143,187,201]. Die Daten aus diesen Experimenten zeigen ein circadianes Muster der Genexpression, das hunderte von Genen des SCN sowie peripherer Organe einschließt. Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse, dass zirka zwei bis zehn Prozent aller untersuchten Gene eine circadiane Oszillation in ihren RNA-Leveln zeigen, wobei die circadiane Genexpression gewebespezifisch ist und jedes Organ ein unterschiedliches Set an oszillierenden Transkripten besitzt [49]. So konnte in zwei unterschiedlichen Leberstudien gezeigt werden, dass von den Genen, die im SCN rhythmisch exprimiert werden, lediglich fünf Prozent in der Leber oszillieren [143,201]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Arbeitsgruppe um Storch *et al.* die in Herz und Leber zirka 8 bis 10 Prozent der untersuchten Gene periodisch exprimiert fanden, wobei lediglich 52 Gene in beiden Geweben circadian exprimiert werden [187].

In vielen Fällen scheinen oszillierende Gene für eine Reihe von entscheidenden Schlüsselfunktionen der Organe zu kodieren [49]. Es konnte gezeigt werden, dass Transkription, Translation, Protein-Stoffwechsel, Zell-Zyklus, Apoptose, Vesikel-Transport, Ionen-Transport, Signaltransduktion und Metabolismus in vielen spezifisch limitierenden Schritten von der circadianen Uhr kontrolliert werden. Die Maxima der Expression dieser Schlüssel-Transkripte sind untereinander zeitlich abgestimmt, sodass die circadiane Regulation verschiedenster Gene scheinbar koordiniert verläuft [143]. Ein Vergleich der circadianen Transkription zwischen *Drosophila melanogaster* und Säugetieren zeigte, dass die circadiane

Kontrolle verschiedener Schlüsselfunktionen wie z. B. der Häm-Biosynthese (*Alas1*), Cholesteroll-Stoffwechsel (*HMGCoA-Lyase*), Energiestoffwechsel (*Hexokinase*) in der Evolution über 600 Millionen Jahre konserviert wurde [39,120].

Eine besondere Rolle in der direkten circadianen Regulation eines Gens kommt den E-Box-enhancer-Elementen zu. Sie können unter einer direkten transkriptionellen Kontrolle von CLOCK:BMAL1-Heterodimeren stehen und werden deshalb auch als „clock controlled gens erster Ordnung“ bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist *Dbp*. Doch die meisten ccgs werden durch indirekte Wege kontrolliert, da sie keine E-Boxen aufweisen.

Verschiedene Organe wie der SCN, Leber, Herz und Muskel sowie Fibroblasten wurden bislang mit Hilfe der Microarray-Technik auf ihre lokalen circadianen Genexpressionen untersucht. Eine globale Untersuchung der circadian regulierten Prozesse im Immunsystem ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Die erzielten Ergebnisse würden Hinweise auf die lokale Funktion der circadianen Uhr in Hinsicht auf die Regulation der Immunfunktionen liefern.

## 1.7 Tageszeitliche Rhythmen im Immunsystem

Eine tageszeitlich unterschiedliche Ausprägung von Symptomen einer Erkrankung weist auf eine Verbindung zwischen der circadianen Uhr und Erkrankungen hin [80]. Zum Beispiel verspüren Patienten mit rheumatischer Arthritis am frühen Morgen die größten Schmerzen, verbunden mit Steifheit und Schwellung der Gelenke [42]. Menschen mit Asthma haben zur Nachtzeit ein Maximum an Beschwerden [119,191]. Aber auch kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod oder Cerebralinfarkte zeigen sich verstärkt in den Morgenstunden [130]. Umgekehrt können sich aber auch Erkrankungen auf die lokomotorische Aktivität und damit auf das circadiane System auswirken. So zeigte eine Untersuchung in *Drosophila* ein verändertes Verhalten dieser Tiere nach einer Infektion mit Streptokokken. Ihre lokomotorische Aktivität wird arrhythmisch [179]. Weiterhin sind Fliegen, die eine Mutation in einem Period- oder Timeless-Gen besitzen, sensitiver auf eine Infektion [109]. Außerdem ist ein Effekt von Lipopolysaccharid (LPS) auf das Laufradverhalten von Mäusen beschrieben worden [117]. Dabei kommt es in der frühen Nacht zu einer Phasenverschiebung – zu einem Delay – wie durch Licht induziert. Eine jüngste Arbeit zeigt den Effekt von dem Tumornekrosefaktor alpha ( $TNF\alpha$ ) auf die circadiane Uhr. Dabei wurde die Expression von E-Box-getriebenen Uhrgenen durch  $TNF\alpha$  supprimiert [35].

Auch bleiben Folgen, wie z. B. Schlafprobleme und Depressionen nach Langstreckenflügen oder Schichtarbeit nicht aus, weil die Uhr aus ihrem Takt gerät. Aber auch Hinweise auf eine circadiane Veränderung innerhalb des Immunsystems [161] sind Beispiele einer „entgleisten“ circadianen Uhr. Lösungen solcher Probleme setzen ein besseres

Verständnis der inneren Uhr im Immunsystem voraus. Einen weiteren Hinweis auf die Existenz der circadianen Uhr im Immunsystem liefert die Untersuchung an *Bmal1*-Knockout-Mäusen, bei denen eine veränderte Entwicklung der B-Zellen beobachtet werden konnte [189].

Obwohl sich eine Vielzahl von Arbeiten mit immunologischen rhythmischen Phänomenen beschäftigt, ist die molekulare Verknüpfung zwischen der circadianen Uhr und dem Immunsystem noch unklar. Im Moment ist bekannt, dass Zellen des Immunsystems wie periphere Blutzellen, Knochenmarkzellen, die Zellen der Milz sowie natürliche Killerzellen eine circadiane Uhrexpression aufweisen [11,23,37,66,213]. Weiterhin ist die tageszeitlich unterschiedliche Anzahl von Zellen im humanen sowie murinen Blut schon lange bekannt. Viele Arbeiten sind allerdings unter Licht-Dunkel-Bedingungen durchgeführt worden, wodurch eine Beeinflussung von Licht und den davon induzierten Signalwegen nicht ausgeschlossen werden kann. Es konnte bis jetzt festgestellt werden, dass die Gesamtzellzahl im Blut von Mäusen oszilliert und ihr Maximum bei ZT6-10 erreicht [96,138], wobei die Schwankung von dem jeweiligen Mausstamm und dem Geschlecht abhängig ist [72,135]. Außerdem wurde der Einfluss von Kortisol, das rhythmisch sekretiert wird, auf die Gesamtzellzahl untersucht. Dabei verschwand nach dem Wegfall von Kortisol auch die Rhythmik der Gesamtzellzahl [96].

Ebenso wie die Gesamtzellzahl oszillieren unter Licht-Dunkelbedingungen T- und B-Zellen im Blut von Mäusen. Ihr Maximum erreichen sie und ihre jeweiligen Subpopulationen zu Beginn der Ruhephase [96,147]. Nur natürliche Killerzellen erreichen in Ratten ihr Maximum am Ende der Aktivitätsphase (ZT21) [147]. Das Maximum an natürlicher Killerzellaktivität besitzen sie allerdings bei ZT16 [61]. Lediglich eine Arbeit zeigt die Zellzahlverhältnisse im Blut von Ratten unter circadianen Bedingungen [50], wobei die Phase der Leukozyten ungefähr mit der unter Licht-Dunkelbedingungen übereinstimmt. Eine andere Arbeit zeigte in Clock-Mutanten eine leicht veränderte Oszillation der weißen Blutzellen sowie der Lymphozyten und neutrophilen Zellen [138]. Auch in Lymphknoten und Milz wurden tageszeitliche Untersuchungen zur Gesamtzellzahl und einzelnen Immunpopulationen unternommen [57,91,96]. In der Arbeit von Kawate *et al.* [96] zeigt die Gesamtzellzahl eine tageszeitliche Schwankung mit einem Maximum bei ZT8. Jedoch wurden in der Milz keine tageszeitlichen Schwankungen in dem prozentualen Anteil von T- und B-Zellen [106] oder nur eine sehr geringe Oszillation [96] gefunden. Die Gruppe um Jiménez *et al.* konnte in der Milz von Ratten eine tageszeitliche Oszillation von T-Zellen mit einem Maximum bei ZT1, aber keine Oszillation für B-Zellen zeigen [91]. Phagozytierende Zellen zeigen dagegen eine Rhythmik mit zwei Maxima [96].

Auch im humanen Blut wurde eine tageszeitliche Variation in der Gesamtzellzahl festgestellt [2]. Dabei unterscheidet sich der Zeitpunkt des Maximums von tag- zu nachtaktiven Organismen um zirka zwölf Stunden [2,82,96] und liegt bei nacht- sowie bei tagaktiven Tieren meist in der jeweiligen Ruhe- oder Schlafphase [152]. Ebenso konnte in der relativen und der

absoluten Zahl der T- und B-Zellen eine Rhythmizität nachgewiesen werden mit einem Maximum in der Mitte der Ruhephase [2,24]. Phagozytierende Zellen zeigen im Blut von Menschen keine Oszillation [2]. Andere Arbeiten dagegen zeigen allerdings eine Rhythmik der Zellzahl von Monozyten [24,192].

Eine circadiane Untersuchung, d. h. unter Dunkel/Dunkel-Bedingungen, der Gesamtzellzahl in der Milz und einzelne Immunpopulationen in diesem Gewebe ist bis jetzt nicht erfolgt und soll Teil dieser Arbeit sein.

Die temporale Organisation der Zellen im Blut oder in der Milz könnte eine wichtige Rolle für Immunzellfunktionen haben. Tatsächlich variiert die Anfälligkeit von Nagetieren oder Menschen auf Infektionen tageszeitlich [60,76,87,155,176]. Dabei zeigt zum Beispiel die Überlebensrate von LPS-infizierten Mäusen eine dramatische Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Verabreichung. Bei ZT9 ist die Sterberate am höchsten, wogegen bei ZT18 fast alle Mäuse überleben [76]. In *Per2*-Knockout-Mäusen wiederum verschwindet der Rhythmus der Sterberate und fast alle Mäuse überleben die Infektion [113]. Diese tageszeitliche Oszillation der Immunfunktion scheint auf einem systemischen oder zellulären Level reguliert zu sein. Das Phänomen könnte mit der tageszeitlich unterschiedlichen Phagozytoseaktivität [84,100] oder mit der unterschiedlichen Expression der Toll-like-Rezeptoren (TLR) [64] zusammenhängen. Die Phagozytoseaktivität und die Expression des TLR4 sind in der Ruhephase am höchsten. Die Ausschüttung von Zytokinen auf ein Stimulanz (LPS, Tetanustoxin u.a.) unterliegt ebenso einer tageszeitlichen Regulation. Dabei wird unter anderem die unterschiedliche Zytokinabgabe ( $\text{TNF}\alpha$ , Interleukin 1, Interleukin 6) mit der veränderlichen Körpertemperatur in Verbindung gebracht [164,217]. Weiterhin wird die Abgabe von Zytokinen mit dem Schlaf in Zusammenhang gebracht [24,51,116,202]. Bislang wurde die Zytokinantwort auf Stimulanzen nur unter Licht-Dunkel-Bedingungen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Untersuchung unter circadianen Bedingungen durchgeführt werden.

Viele Arbeiten postulieren zudem eine Abhängigkeit der Zytokinsekretion von dem immunmodulatorischen Mediator Kortisol [42,83,86,148,149,175]. So wurde z. B. bei der rhythmischen Abgabe von Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) auf ein Tetanustoxin im humanen Blut eine Regulation durch Kortisol behauptet [148]. Eine weitere Arbeit in dem gleichen System zeigt eine tageszeitlich unterschiedliche Zytokinabgabe nach der Stimulation mit LPS und begründet dies ebenso mit der rhythmischen Kortisolabgabe [86].

Eine Hypothese besagt zudem, dass periphere Organe durch humorale und/oder neurale Substanzen synchronisiert werden können [15,139]. Die tägliche Oszillation der Kortisolsekretion der Nebennierenrinde wird von der hypothalamischen hypophysären Nebennierenachse, die wiederum vom SCN kontrolliert wird, reguliert [127]. Deshalb wird auch für das Immunsystem angenommen, dass seine Funktionen durch Kortisol getrieben werden, da die circadiane Sekretion von Kortisol von der hypothalamischen Hypophysenachse



kontrolliert wird. Das Immunsystem interagiert außerdem auf verschiedenen Stufen mit dem neuroendokrinen System einschließlich seiner autokrinen, parakrinen, endokrinen und neuralen Mechanismen. Einige der neuroendokrinen Mediatoren verstärken die Immunantwort, wie Prolaktin, während andere die Intensität der Immunantwort kontrollieren, wie z. B. Kortisol.

Glukokortikoide wie Kortisol, wirken auf nahezu alle Zelltypen bei einer Entzündung mit einem markanten Effekt auf Zell-Trafficking, Zell-Zell-Interaktion und Kommunikation durch lösliche Mediatoren. Zusätzlich koordinieren sie Transkriptionsfaktoren, Aktivator-Proteine und andere Agenzien, was zu einer Regulation von Genaktivitäten führt. Weiterhin wurde beschrieben, dass sie die  $TNF\alpha$ -Antwort nach einer LPS-Stimulation reduzieren können [94].

Oszillationen im Immunsystem können auch von Melatonin-Rhythmen hervorgerufen werden, die die Immunzellen beeinflussen [12]. Melatonin wird in der Zirbeldrüse synthetisiert und hat zwei circadiane Funktionen. Es spielt eine zentrale Rolle in der Feinabstimmung des circadianen Rhythmus und in saisonalen Veränderungen. Sein Maximum im Blut erreicht es bei allen Organismen während der Nacht. Eine funktionelle Verbindung zwischen Zirbeldrüse und Immunsystem wurde schon in verschiedenen Spezies durch unterschiedliche Experimente gefunden. Auch besitzen Immunzellen einen Rezeptor für Melatonin und können es sogar selbst synthetisieren [33,34].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Zellen des Immunsystems durch Schlaf, durch Hormonspiegelveränderungen (z. B. immunmodulatorisch wirksames Melatonin und Kortisol) und durch Körpertemperaturzyklen beeinflusst werden können. Bislang wurde angenommen, dass Immunsystem-Phänomene durch humorale Faktoren zentral gesteuert werden. Die alternative Hypothese, dass viele dieser circadianen immunologischen Rhythmen von einer zell-autonomen Uhr innerhalb der Immunzellen (wie in Leber, Niere, Herz etc. gezeigt) gesteuert werden, wurde bisher kaum untersucht. Dem nachzugehen ist Gegenstand dieser Arbeit. Lediglich zwei Veröffentlichungen deuten auf eine molekulare Verbindung zwischen dem Immunsystem und der circadianen Uhr hin [118,123]. Dabei ist die Aufklärung der circadianen Regulation des Immunsystems wichtig für das Verständnis des Ablaufs einer Immunerkrankung und deren darauf folgende Behandlung.

## **1.8 Makrophagen, Toll-like-Rezeptor 4 und Zytokine**

Makrophagen sind Teil der mononukleären Leukozyten und über den ganzen Körper verteilt. Sie stammen aus dem Knochenmark und können nach ihrer Reifung und der nachfolgenden Aktivierung verschiedene morphologische Formen annehmen. Der erste Zelltyp nach Verlassen des Knochenmarkes im peripheren Blut ist undifferenziert und wird Monozyt genannt. Nach dem Auswandern einer solchen Zelle ins Gewebe reift sie und wird zu einer Makrophagen. Die

Morphologie von Monozyten/Makrophagen ist sehr heterogen. Sie variieren in ihrer Größe, Granularität und ihrer Kernmorphologie und sind deshalb schwer von anderen Zellen zu unterscheiden. In der Milz sind sie in allen Kompartimenten zu finden (rote und weiße Pulpa, Marginalzone) und besitzen entsprechend ihrer Lokalisation verschiedene Eigenschaften.

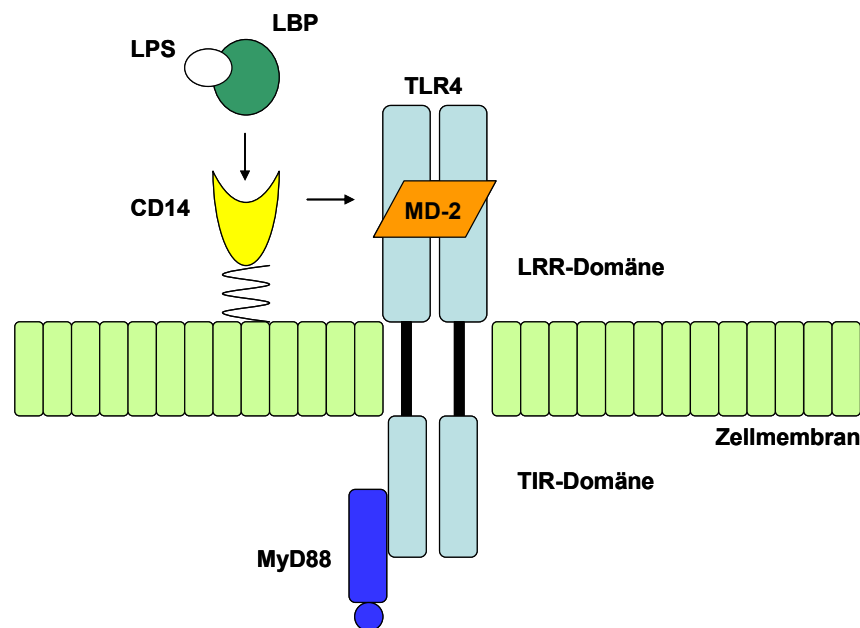
Reife Makrophagen sind relativ langlebige Zellen, hoch phagozytierend und anpassungsfähig in ihrer Antigenantwort. Die Funktionen im Gewebe sind homöostatisch. Die Zellen regulieren das lokale und systemische Milieu durch diverse Plasmamembranrezeptoren und verschiedene sekretierende Produkte. Speziell heißt das: Sie phagozytieren fremde Partikel, wie Mikroorganismen und Makromoleküle einschließlich Antigene oder eigenes Gewebe, das verletzt oder tot ist. Zusätzlich produzieren sie Zytokine, die weitere Zellen rekrutieren, sowie Stoffe, die dazu dienen, Mikroorganismen abzutöten und Entzündungen in Schach zu halten. Damit haben Makrophagen eine zentrale Funktion im angeborenen Immunsystem und spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. Gleichzeitig sind Makrophagen die wichtigsten „Aufräumzellen“ des Körpers. Sie phagozytieren apoptotische Zellen, Zelltrümmer, oxidierte Lipoproteine und andere Abfallprodukte der normalen Physiologie eines Organismus.

Die Interaktion mit Pathogenen führt in Makrophagen zu einer Induktion von verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren, wie  $\text{TNF}\alpha$ , Interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-8 und Chemokine wie KC-1. Die Produktion dieser Mediatoren wird von Toll-like-Rezeptoren (TLR) vermittelt [65,207]. Die ersten dieser Rezeptoren wurden in *Drosophila melanogaster* gefunden [8,79]. Das erste Säugetierhomolog im Menschen wurde 1997 von Medzhitov *et al.* gefunden [121]. Im Moment sind 13 Toll-like-Rezeptoren in der Maus und zehn im Menschen bekannt [142]. Eine grundlegende Eigenschaft dieser Rezeptoren ist, dass sie einen extrazellulären Leucin-reichen Teil (LRR, leucin rich repeats) und eine cytoplasmatische Region besitzen, die aufgrund der großen Ähnlichkeit mit dem Interleukin 1-Rezeptor auch Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) genannt wird. Jeder TLR erkennt ein spezifisches Muster von mikrobiellen Komponenten, ist ligandspezifisch und benutzt einen unterschiedlichen Signalweg zur Weiterleitung. Einer der wichtigsten TLR ist der TLR4. Er wird hauptsächlich auf Monozyten/Makrophagen, aber auch in geringem Maße auf dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. Der TLR4 erkennt LPS, was ein Bestandteil der Zellwand von Gram-negativen Bakterien ist. Der TLR4 wurde entdeckt durch positionelles Klonieren des Gens *Lps* in den LPS-unsensiblen Mausstämmen C3H/HeJ und C57BL/10ScCr [153,160] und anschließend durch eine TLR4-knockout-Maus bestätigt [88].

Der Mechanismus der LPS-Erkennung durch den TLR4 ist komplex und benötigt mehrere zusätzliche Komponenten. Die für die LPS-Erkennung notwendigen Komponenten sind in Abbildung 1-4 dargestellt.

LBP (LPS-binding Protein) ist ein Serumprotein, das LPS-Monomere bindet. Das LBP-gebundene LPS wird daraufhin zu CD14 transferiert [210]. CD14 ist ein an der Plasmamembran

verankertes Glykoprotein, dem der cytoplasmatische Teil fehlt. Dadurch kann es keine Signale selbstständig in die Zelle weiterleiten. CD14 wird hauptsächlich auf Makrophagen/Monozyten und neutrophilen Zellen exprimiert. In manchen Zelltypen, wie z. B. Endothelzellen, die kein membranständiges CD14 exprimieren, ersetzt lösliches CD14 (sCD14) die Signalbrücke für die Oberflächenerkennung des LPS-LBP-Komplexes [209]. Eine weitere Komponente des LPS-Rezeptorkomplexes ist MD-2 [178]. MD-2 ist ein kleines extrazelluläres Protein, dessen Transmembranregion fehlt und auf der Zelloberfläche mit der Ektodomäne von TLR4 assoziiert ist. Obwohl dessen genaue Funktion noch nicht bekannt ist, weiß man, dass MD-2 für die LPS-Erkennung durch den TLR4 unentbehrlich ist [174].



**Abbildung 1-4:** Schematische Darstellung des TLR4-Komplexes mit seinen Komponenten zur Erkennung von LPS. Zirkulierendes LBP bindet an LPS und transferiert es zu CD14. Dieses Molekül hilft bei der Beladung des LPS-Rezeptorkomplexes, welcher aus dimerisiertem TLR4 und aus extrazellulärem MD-2 besteht. Danach erfolgt die Aktivierung des MyD88-abhängigen oder des MyD88-unabhängigen Signalwegs.

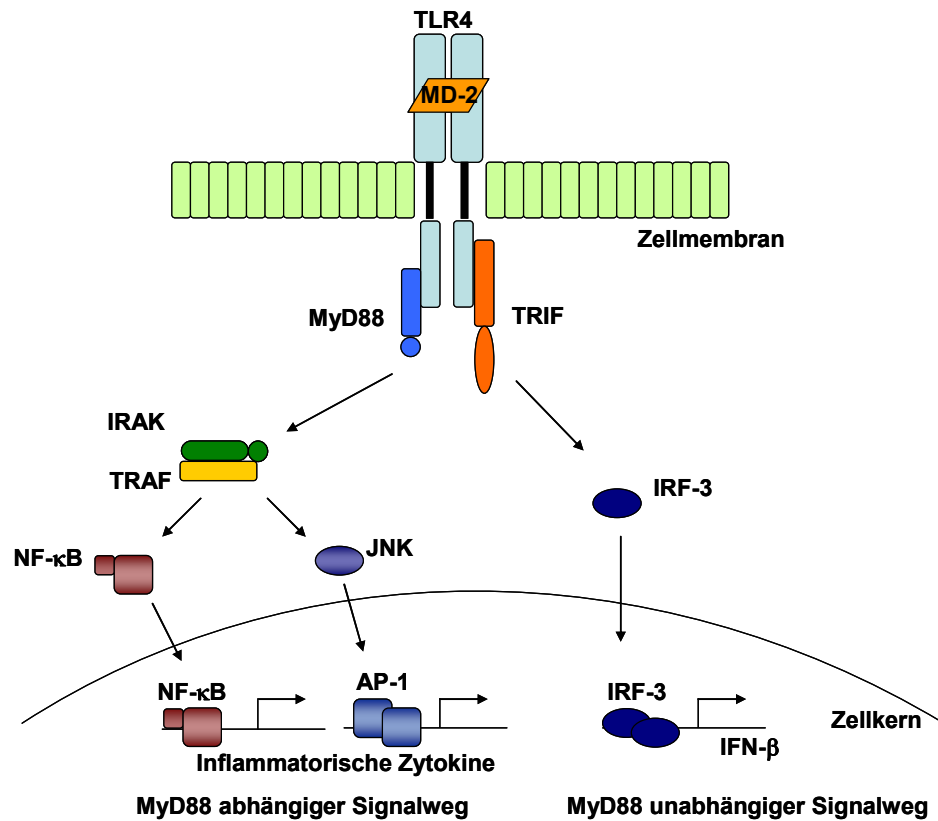
Die Aktivierung der Signaltransduktionswege durch TLR führen zu einer Induktion von verschiedenen Genen, die in der Immunabwehr fungieren, wie inflammatorische Zytokine, Chemokine, MHC- und kostimulatorische Moleküle. Der TLR4 kann dafür zwei unterschiedliche Signalwege benutzen: den MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Weg (MyD88 myeloid differentiation factor 88) (siehe Abbildung 1-5).

Das MyD88-Molekül besitzt eine TIR-Domäne am C-terminalen Teil und eine „Death-Domäne“ am N-terminalen Teil. Über diese „Death-Domäne“ ist MyD88 außerdem mit der TIR-

Domäne des TLR4 assoziiert. Nach Stimulation mit LPS rekrutiert MyD88 die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase 4 (IRAK4) durch Interaktion der „Death-Domänen“ der beiden Moleküle. Daraufhin wird die Phosphorylierung von IRAK1 ermöglicht. Phosphorylierte IRAK1 dissoziiert vom Komplex und assoziiert mit TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor associated factor 6). Dieser Molekülkomplex interagiert mit dem membrangebundenen assoziierten Komplex der TGF- $\beta$  aktivierten Kinase 1 (TAK1) und zwei TAK1 bindenden Proteinen (TAB), TAB1 und TAB2. Der dadurch neu gebildete Komplex wiederum führt zur Aktivierung von zwei Signalwegen, die einerseits in der Aktivierung von JNK (c-Jun N-terminal Kinase) enden oder zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Beide Wege führen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF $\alpha$ . Der Signalweg über NF- $\kappa$ B erfolgt über die Ubiquitinierung von TRAF6 und die Aktivierung des TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2-Komplexes. Die Phosphorylierung von TAK1 und TAB2 bewirkt die Dissoziation des Komplexes von der Membran ins Zytosol und den Abbau von IRAK1. TAK1 wiederum phosphoryliert I $\kappa$ B-Kinasen (IKK). Die aktivierten IKKs induzieren daraufhin die Phosphorylierung mit anschließendem Abbau von I $\kappa$ B, was zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (siehe Abbildung 1-5).

Bei dem MyD88-unabhängigen Signalweg führt die Stimulation von LPS zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3, der wiederum IFN- $\beta$  induziert. Doch bei diesem Signalweg werden im Gegensatz zu dem MyD88-abhängigen Signalweg keine inflammatorischen Zytokine gebildet [95]. Er ist daher für die vorliegende Arbeit unerheblich.

Die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems, sich vor bakteriellen Infektionen zu schützen, ist essentiell für die erste Verteidigung des Wirtsorganismus. Proinflammatorische Zytokine, die eine kritische Rolle bei der Entzündungsantwort spielen, sind TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-12 [74]. TNF $\alpha$  ist der wichtigste Mediator der Wirtsabwehr gegen Gram-negative Bakterien. Bei der Immunantwort kann TNF $\alpha$  sehr schnell produziert werden und erreicht seine maximale Ausschüttung bereits nach 1,5 Stunden [194]. Bei einer lokalen Infektion, die zur lokalen Freisetzung von TNF $\alpha$  führt, kommt es zum Einströmen von Flüssigkeiten, Zellen und Proteinen, die bei der Abwehrreaktion beteiligt sind, in das infizierte Gewebe. Bakterien werden phagozytiert, Blutgefäße lokal verschlossen und der Erreger wird mit der Lymphe in lokale Lymphknoten gespült. Dabei bewirkt die lokale Ausschüttung von TNF $\alpha$  schützende Effekte. Bei einer systemischen Infektion, z. B. im Blut, können dieselben Mechanismen, die eine lokale Infektion erfolgreich in Schach halten, katastrophale Folgen haben. Dabei setzen Makrophagen an vielen Stellen des Körpers, z. B. in Leber, Milz und Lunge TNF $\alpha$  frei. Diese Erkrankung wird Sepsis (Blutvergiftung) genannt. Bei einem septischen Schock löst TNF $\alpha$  eine verbreitete intravaskuläre Blutgerinnung aus, was schließlich zum Multiorganversagen und zum Tod führt, hervorgerufen durch ungenügende Blutversorgung.



**Abbildung 1-5:** Vereinfachtes Model der LPS-induzierten Signalwege. Der TLR4 wird durch LPS stimuliert. Dadurch werden zwei unterschiedliche Signalwege induziert, ein MyD88-abhängiger und unabhängiger Signalweg. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den IRAK/TRAF-Signalweg, wird über den Adapter MyD88 induziert und führt zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Die zeitlich spätere Aktivierung von TRIF und IRF-3 über den MyD88 unabhängigen Signalweg führt zur Produktion von IFN- $\beta$ .

Makrophagen/Monozyten setzen nach Bakterienkontakt neben TNF $\alpha$  auch noch andere Zytokine frei. Dazu gehört z. B. Interleukin 6 (IL-6), welches früher auch Interferon- $\beta$ 2 genannt wurde [85,133]. Dieses Zytokin hat durch die Art seiner komplexen Regelung und Funktion eine Schlüsselrolle beim Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität zu Mechanismen der erworbenen Immunität innerhalb eines Entzündungsprozesses [93]. Die Transkription wird unter anderem über die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen), HSF1 und HSF2 (Hitzeschockfaktor 1 und 2) reguliert. Verschiedene Formen werden durch posttranslationale Mechanismen (Splicing, Glykosylierung, Phosphorylierung) erzeugt, deren biologische Bedeutung noch ungeklärt ist [62]. Interleukin-6 wird als Lymphozyten stimulierender Faktor angesehen und wirkt in der Leber als Aktivator der Akute-Phasen-Proteine.

## 2 Zielsetzung

Zurzeit ist unklar, ob das Immunsystem über eine circadiane Uhr verfügt. Es gibt jedoch Indizien, die auf die Existenz einer circadianen Uhr und auf deren Funktion hinweisen: (i) Die Anzahl der Leukozyten im Blut von Ratten unterliegt einer circadianen Oszillation [50]. (ii) *Per2*-defiziente Mäuse sind resistenter gegenüber einem LPS-induzierten toxischen Schock als Wildtyp-Mäuse des gleichen Stammes [113]. (iii)  $\text{IFN}\gamma$ - und  $\text{IL-1}\beta$ -Level nehmen in *Per2*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach LPS-Stimulation ab, während die Levels von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IL-10 wie bei Wildtyp-Mäusen sind [113]. (iv) *Bmal1* ist für die B-Zellentwicklung notwendig [189]. (v) Die Phagozytoseaktivität von peritonealen Zellen oder Makrophagen ist tageszeitlich unterschiedlich [84,100]. Des Weiteren ist bekannt, dass Immunreaktionen z. B. der Beginn von Entzündungserkrankungen einer tageszeitlichen Variation unterliegen. Der molekulare Mechanismus dieser immunologischen tageszeitlichen Beobachtungen ist jedoch noch ungeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Rolle der circadianen Uhr bei der Steuerung von Immunfunktionen zu untersuchen. Zunächst muss dabei der Beweis erbracht werden, dass das Immunsystem ein funktionelles, molekulares Uhrwerk besitzt. Dazu ist es notwendig, mittels quantitativer PCR die Expressionsmuster der Uhrgene *Per2*, *Bmal1* und *Rev-Erb $\alpha$*  in den Organen des Immunsystems über die Zeit zu bestimmen und auf eine Rhythmizität hin zu prüfen. Des Weiteren soll untersucht werden, ob das Uhrwerk im Immunsystem selbst getrieben funktioniert, oder ob direkte bzw. indirekte Signale (wie z. B. Kortisol-Rhythmen) vom SCN benötigt werden. Für diese Untersuchung muss ein geeignetes Modellsystem gefunden werden.

Als nächstes gilt es, die Rolle der circadianen Uhr in speziellen Immunfunktionen zu untersuchen. Geklärt werden soll dabei, ob es eine circadiane Oszillation der Zytokinproduktion von murinen Milzzellen gibt. Dafür werden primäre Milzzellen durch LPS-Stimulation dazu angeregt, Zytokine (z. B.  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6) zu produzieren. Weiterhin soll geprüft werden, ob diese Zytokinabgabe von Kortisolrhythmen abhängig ist. Dazu werden primäre Milzzellen von adrenaletomierten Mäusen verwendet. Als eine weitere Immunfunktion soll die Anzahl von Immunzellen in der Milz von Mäusen, in Abhängigkeit von Zeit und Kortisol, untersucht werden. Dazu werden ausgesuchte Immunzellpopulationen der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ein weiteres Ziel ist die Untersuchung der circadianen Genexpression in einer Immunzellpopulation. Dabei soll geklärt werden, welche Gene durch die circadiane Uhr in ihrer Expression circadian reguliert werden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf Genen, die möglicherweise bei der LPS-Stimulation und der darauf folgenden Zytokinantwort, d. h. im TLR4-Signalweg, reguliert sein könnten. Makrophagen werden dafür an zwei circadianen Zeitpunkten mittels Magnetic cell sorting (MACS) aus primären murinen Milzzellen separiert. Die aus den Makrophagen extrahierte RNA wird nach reverser und in vitro Transkription in Biotin-markierte cRNA umgeschrieben und auf dem Mikroarray, der das gesamte Genom der Maus umfasst, hybridisiert. Mit dieser Mikroarray-Technologie kann das Expressionslevel von Tausenden von Genen simultan untersucht werden. Die Ergebnisse geben ein umfassendes Bild des molekularen Zustands der Makrophagen zu einem bestimmten circadianen Zeitpunkt, die Hinweise und Rückschlüsse zu tageszeitlichen Immunfunktionen zulassen.

## 3 Material

### 3.1 Reagenzien

Alle Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma oder Roth bezogen. Ausnahmen sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

**Tabelle 3-1:** Zusätzlich verwendete Substanzen und Chemikalien mit Bezugsquelle

Substanz	Firma
0,1 M Dithiothreitol (DTT, 0,1 M)	Invitrogen
2x Loading Dye Solution (für RNA Elektrophorese)	Fermentas
5x First Strand Puffer	Invitrogen
10x PCR Puffer	Applied Biosystems
Agarose	SERVA
dNTPs, je 10 mM	NEB Biolabs
Ether	J.T.Baker
Protaminsulfat	Sigma
Random Heptadecamere, 50 µM	MWG
Random Hexamere, 50 µM	MWG

### 3.2 RNA-Marker für die Gelelektrophorese

**Tabelle 3-2:** RNA-Marker

Name	Hersteller
RNA ladder, High Range (6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200 bp)	Fermentas



### 3.3 Puffer und Lösungen

- 10 x PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1 l Wasser, autoklavieren)
- Puffer für die Durchflusszytometrie (0,1 % NaN<sub>3</sub>, 1 % FCS in 1 l PBS, sterilfiltrieren)
- 4 % PFA-Lösung (0,8 g Paraformaldehyd in 18 ml PBS lösen, auf 56 °C erhitzen, Zugabe von 2 M NaOH bis vollständiges Auflösen erreicht, 2 ml 10 x PBS, pH-Wert 7,4; sterilfiltrieren)
- 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA ad 1 l Wasser, pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, nach dem autoklavieren gelb)
- Coating Puffer B (0,86 g NaHCO<sub>3</sub>, 1,06 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, in 200 ml Wasser lösen, pH-Wert 9,4)
- Blocking Puffer (1 g BSA in 200 ml PBS lösen, pH-Wert 7,4)
- Standardpuffer (1 g BSA, 0,2 ml Tween 20 in 200 ml PBS lösen, pH-Wert 7,4)
- 10x Waschpuffer (90 g NaCl, 10 ml Tween 20 in 1000 ml PBS lösen, pH-Wert 7,4)
- Stopplösung (2 N Schwefelsäure: 49 ml Wasser, 1 ml konz. Schwefelsäure)
- 3 % Essigsäurelösung
- MACS-Puffer (0,3722 g EDTA, 2,5 g BSA in 0,5 l PBS, pH-Wert 7,2, sterilfiltrieren)
- Easy sep Medium (10 ml FCS, 0,5 ml von 1 M EDTA in 500 ml PBS, sterilfiltrieren)
- CaCl<sub>2</sub>-Lösung (222 g in 1 l Wasser)
- steriles Wasser, gepuffert mit 2,5 M HEPES, pH-Wert 7,2
- HEPES-gepufferte Saline (8 g NaCl, 0,38 g KCl, 0,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g HEPES, 1 g Glukose ad 500 ml Wasser, pH-Wert 7,05 )

### 3.4 Reagenzien für die Zellkultur

**Tabelle 3-3:** Verwendete Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
RPMI 1640, mit 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin	Biochrom AG
Phenolrotfreies RPMI 1640	GIBCO
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Blastizidin	Invitrogen
Puromycin	Invitrogen

*Fortsetzung auf nächster Seite*

*Fortsetzung*

Bezeichnung	Hersteller
HEPES	Roth
DMEM	Sigma
Trypsin	Biochrom AG
Hypaque-Ficoll (Dichte 1,083 g/ml)	Sigma
EDTA	Sigma
Leuchtkäfer-Luziferin	Promega
Dexamethason	Sigma
Trypanblaulösung (0,4 %)	Sigma
Lipopolysaccharid von E.coli, serotyp R515 (Re)	Alexis
Concanavalin A (Con A)	Sigma
Ara C (Cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranosid)	Fluka
L-Mimosin	Sigma
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Opti-MEM® I	Invitrogen

### 3.5 Zellkultur-Medien

Die verwendeten Medien für das „Milzmedium“ sind im Diagnostik-Labor des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité auf einen sehr geringen Endotoxingehalt getestet worden. Bei diesem Test wird zu 1 ml Medium 50  $\mu$ l Patientenblut gegeben und die freigesetzte TNF $\alpha$ -Konzentration gemessen. Diese wird mit einem kommerziellen Elisa (Immilight) bestimmt. Der Wert muss bei unter 30 pg/ml TNF $\alpha$  liegen.

Milzmedium	500 ml RPMI 1640 50 ml hitzeinaktiviertes FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Glutamin
Medium für Kryo-Konservierung	90 % FCS 10 % DMSO

Phenolrot-freies Milzmedium	86,2 ml phenolrotfreies RPMI 1640 10 ml hitzeinaktiviertes FCS 1 ml Penicillin/Streptomycin 2,8 ml HEPES
CM (Vollmedium)	500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 14 ml 1M HEPES

### 3.6 Zelllinien

**Tabelle 3-4:** Verwendete Standardzelllinien

Zelllinie	Herkunft
RAW 264.7	murine Makrophagen, gewonnen aus einem Abelson-Leukämie-Virus induzierten Tumor [163]
293T	humane embryonische Nierenzellen, eine Variante der HEK293 Zellen

### 3.7 Tiere

**Tabelle 3-5:** verwendete Mäuse- und Rattenstämme

Art und Stamm	Bezugsquelle	Alter
C57BL/6 Mäuse	Bundesinstitut für Risikobewertung	10 – 13 Wochen
Adrenaletomierte C57BL/6 Mäuse	Charles River Laboratories	10 – 13 Wochen
PER2::LUC, C57BL/6 Mäuse [216]	Zur Verfügung gestellt von Dr. Joe Takahashi, Northwestern University, IL, USA	8 – 16 Wochen
<i>Per1::Luc</i> , japanische Wistar Ratten [214]	Zur Verfügung gestellt von Dr. Hajime Tei, University of Tokyo, Japan	8 – 10 Wochen

### 3.8 Plasmide

**Tabelle 3-6:** Verwendete Expressionsvektoren

Plasmid	Beschreibung
pEF-DEST51	Destinationsvektor des Gateway-Systems von Invitrogen, enthält Sequenz für Blastizidinresistenz
pGL3_E6S	circadianer Luziferasereportervektor; unter der Kontrolle des SV40-Promotors, der mit sechs abgeleiteten E-Boxen aus dem <i>mPer1</i> -Promotor kombiniert ist, wird die Leuchtkäfer-Luziferase exprimiert [204]
pMD2G	enthält Sequenz für Hüllprotein bei der Virusproduktion
pSpax	Verpackungsplasmid zur Virusproduktion
pABpuro-E6F	Plasmid enthält Sequenz für <i>Luziferase</i> , die unter der Kontrolle des SV40 Promotors, kombiniert mit sechs E-Boxen exprimiert wird; Puromycinresistenz
pABpuro-BluF	Plasmid enthält Sequenz des <i>Bmal1</i> -Promotors, der die Luziferaseexpression kontrolliert; Puromycinresistenz

### 3.9 Primer und Sonden für quantitative PCR

Die in Tabelle 3-7 verwendeten Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Die Sonden sind 5'FAM- und 3'TAMRA-markiert. Die in Tabelle 3-8 verwendeten Primer wurden teilweise von der Firma Qiagen (QuantiTect Primer) bezogen und wurden für die SYBR Green-PCR verwendet.

**Tabelle 3-7:** Verwendete Primer bei der quantitativen PCR

Gene	Sequenz in 5' → 3'Richtung
<i>Gapdh</i>	forward TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	revers CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
	Sonde CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
<i>Per2</i>	forward ATGCTCGCCATCCACAAGA
	revers GCGGAATCGAATGGGAGAAT
	Sonde ATCCTACAGGCCGGTGGACAGCC

Fortsetzung nächste Seite

*Fortsetzung*

Gene	Sequenz in 5' → 3'Richtung
<i>Rev-Erb<math>\alpha</math></i>	forward AGGTGGTAGAGTTTGCCAAACAC revers CACCATCAGCACCTCAAAGGT Sonde TCCGTGACCTTTCTCAGCACGACCA
<i>Bmal1</i>	forward ATGCAGAACACCAAGGAAGGA revers CCGACGCCTCTTTTCAATCT Sonde CTGTGGGCCTCCCTTGCATTCTTG

**Tabelle 3-8:** Verwendete Primer für die quantitative PCR mit SYBR Green

Gene	Sequenz in 5' → 3'Richtung
<i>Gapdh</i>	forward TGTGTCCGTCGTGGATCTGA revers CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
<i>Per2</i>	forward ATGCTCGCCATCCACAAGA revers GCGGAATCGAATGGGAGAAT
<i>Rev-Erb<math>\alpha</math></i>	forward AGGTGGTAGAGTTTGCCAAACAC revers CACCATCAGCACCTCAAAGGT
<i>Lbp</i>	forward CCTCTACCCTGATGTCAA revers TCGTGGAGCTGAATATGCCTT
<i>Irak4</i>	forward CCGTAATGCCTATGCCGA revers CATGGAACGAAAAGCTGTGGAA
<i>Tlr4</i>	forward TTTGGGGAGGAAGAAAGG revers AAGGTGAAAGCAGAAATGTGT

**3.10 Enzyme****Tabelle 3-9:** Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Konzentration	Verwendung	Firma
RNase Inhibitor	40 U/ $\mu$ l	Reverse Transkription	Fermentas
SuperScript RNase H- Reverse Transkriptase	200 U/ $\mu$ l	Reverse Transkription	Invitrogen
AmpliTaq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ l	Quantitative PCR	Applied Biosystems
DNase I	2 U/ $\mu$ l	RNA-Isolierung	Ambion
DNase I	2,72 U/ $\mu$ l	RNA-Isolierung	QIAGEN

### 3.11 Antikörper und Blockierreagenzien

**Tabelle 3-10:** Verwendete Antikörper und Blockierungsreagenzien

Bezeichnung	Klon	Hersteller
anti-Fcγ-Block IgG		Deutsches Rheumaforschungszentrum Jackson Immuno Research
anti-CD11b-FITC	M1/70	eBioscience
anti-CD14-APC	Sa2-8	eBioscience
anti-CD19-PerCP-Cy5.5	1D3	BD Pharmingen
anti-CD90.2-FITC	30-H12	BD Pharmingen
anti-CD45R (B220) Micro Beads	RA3-6B2	Miltenyi Biotech GmbH
anti-CD90.2 (Thy 1.2) Micro Beads	30-H12	Miltenyi Biotech GmbH

### 3.12 Kits

**Tabelle 3-11:** verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
RNAlater™	QIAGEN	Aufbewahrung der Gewebe
RiboPure™ Kit	Ambion	RNA-Isolierung
RNeasy® Minikit	QIAGEN	RNA-Isolierung
FITC Selection Kit	CellSystems	Isolierung von CD11b <sup>+</sup> Zellen
2x SYBR® GREEN PCR Mastermix	Applied Biosystems	Quantitative PCR

### 3.13 Enzym-Linked-Immunosorbent Assay (Elisa)

**Tabelle 3-12:** Verwendete Elisas

Bezeichnung	Hersteller
TNF $\alpha$ Elisa	Biosource
IFN $\gamma$ Elisa	Biosource
IL-6 Elisa	eBioscience

### 3.14 Geräte

**Tabelle 3-13:** verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Anthos Reader 2001 (Elisaplatenreader)	Anthos Labtech Instruments
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5403	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Photometer, Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Elektrophoresevorrichtung	Biorad
Thermocycler	HYBAID
Lumi Imager	
Photomultipliertube, HC135-11MOD	Hamamatsu, Japan
FACSCalibur	BD, Deutschland
Magneten mit Ständer	Miltenyi Biotech GmbH
Magnet	CellSystems

### 3.15 Spezielle Materialien

**Tabelle 3-14:** verwendete spezielle Materialien mit Bezugsquelle

Bezeichnung	Hersteller
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Maxisorp (Mikrotiterplatte)	Nunc
Cellstrainer, 100 µm, 40 µm	BD Falcon
UVette®	Eppendorf
Millicellmembran	Millipore
LS Columns	Miltenyi Biotech GmbH

### 3.16 Software

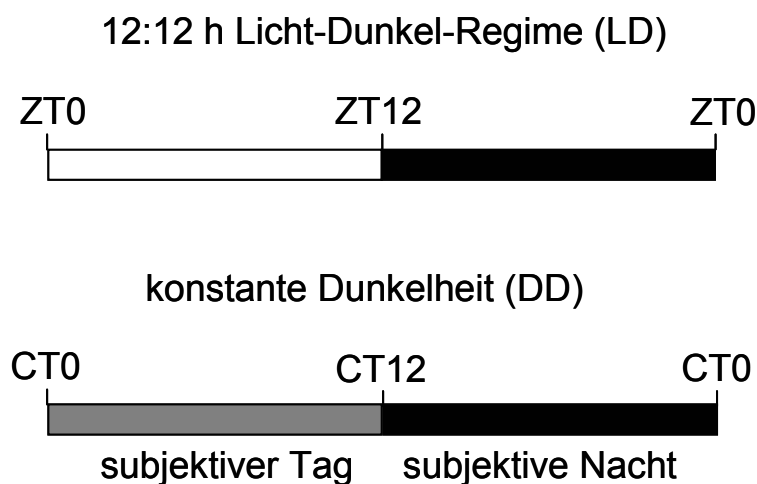
- Clocklab, Actimetrics, Wilmette, IL, USA
- Primer Express® 2.0 Software, Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA
- ABI Prism 7000 SDS v1.2x System Software, Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA
- FCS express V3, De Novo Software, Ontario, Canada
- CircWave V1.4, [www.rug.nl/biologie/onderzoek/onderzoekgroepen/chronobiologie](http://www.rug.nl/biologie/onderzoek/onderzoekgroepen/chronobiologie)



## 4 Methoden

### 4.1 Versuchstiere und deren Haltung

C57BL/6 Mäuse und adrenaletomierte Mäuse [36] wurden einzeln in Käfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Adrenaletomierte Mäuse, in denen kein Kortisol mehr nachweisbar ist, bekamen 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung anstatt Wasser. Zusätzlich beinhalteten die Käfige Laufräder, mit denen die Aktivität der Mäuse mit einem Computerprogramm (Clocklab) aufgezeichnet werden konnte. Dieses Computerprogramm nimmt auch das in den Schränken herrschende Lichtregime durch einen Lichtsensor auf. Die Mäuse wurden mindestens zwei Wochen in einem Lichtregime von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (LD) gehalten. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die Tiere vor den Experimenten in vollständige Dunkelheit überführt (DD). In Abbildung 4-1 ist schematisch der Ablauf eines circadianen Experimentes dargestellt.



**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes eines circadianen Versuches. Mäuse werden zwei Wochen unter einem 12:12 h Licht-Dunkel-Regime (LD) gehalten. Anschließend werden die Tiere in konstante Dunkelheit (DD) überführt. Der frühere Lichtzyklus wird als subjektiver Tag und die vorangegangene Dunkelphase als subjektive Nacht bezeichnet. ZT bezeichnet die Zeitgeber-Zeit und CT die Circadiane Zeit.

PER2::LUC Mäuse [216] wurden in der Hilltop Animal Facility an der Washington Universität in St. Louis in Einzelkäfigen unter einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Diese Mäuse exprimieren ein PER2::Luziferase-Fusionsprotein anstatt des Uhrproteins PER2. Dennoch verfügen diese Tiere über ein normales circadianes System. Durch Gewebeexplantate der Tiere können die circadianen Eigenschaften der Gewebe und Zellen durch Messung der Biolumineszenz analysiert werden.

*Per1::Luc*-Ratten [214] wurden ebenfalls in der Hilltop Animal Facility an der Washington Universität in St. Louis in Einzelkäfigen unter einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Diese Ratten exprimieren unter dem *Per1*-Promotor Luziferase, wodurch die circadianen Eigenschaften von Geweben und Zellen durch Messung der Biolumineszenz verfolgt werden können.

## **4.2 Isolierung von primären Immunzellen**

### **4.2.1 Milzentnahme für die Präparation von primären Milzzellen**

C57BL/6 Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Das Fell wurde durch Besprühen mit Alkohol desinfiziert und an der Bauchseite mit einer Schere geöffnet. Die Bauchhöhle wurde durch einen Schnitt unterhalb des Rippenbogens auf der linken Seite der Maus geöffnet, die Milz mit einer Pinzette entnommen und zur weiteren Verwendung in eiskaltem Milzmedium gelagert.

### **4.2.2 Isolierung von primären Milzzellen**

Zur Gewinnung von primären Milzzellen wurde jede Milz einzeln mit einer Schere zerschnitten und anschließend separat durch engmaschige (100 µm und 40 µm) Zellsiebe (Cellstrainer) mit Hilfe eines Plastikstempels gedrückt und getrennt weiterverarbeitet. Dadurch wurde das Bindegewebe entfernt und eine Vereinzelnung der Zellen erreicht. Nach einer Zentrifugation (6 min, 4 °C und 300xg) wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt, auf die entsprechende Zellkonzentration eingestellt und weiterverarbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte standardmäßig im Inkubator unter folgenden Bedingungen: 37 °C und 5,0 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Luft.

Erforderte der Versuchsaufbau eine Abtrennung der Erythrozyten wurden die primären Milzzellen einer Wasserlyse unterzogen. Dazu wurden die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert und maximal für 30 s inkubiert. Die Lyse wurde mit Milzmedium abgestoppt. Entstandene Zellklumpen wurden mit Hilfe eines Zellsiebes entfernt.

### 4.2.3 Isolierung von Peritoneal-Makrophagen mittels Peritoneallavage

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Fell wurde mit Alkohol besprüht. Danach wurde mit einer Schere und Pinzette auf der Bauchseite ein kleiner Einschnitt in die Oberhaut gesetzt. Das Fell wurde danach mit den Fingern langsam in Richtung Seiten gezogen, damit der Bauchraum frei liegt. Das Spülen erfolgte mit kaltem Milzmedium (zirka 3 - 5 ml je nach Mausgröße). Das Medium wurde vorher in eine Spritze mit relativ dicker Kanüle aufgezogen. Mit der Kanüle wurde vorsichtig in das Peritoneum gestochen und das kalte Medium fast vollständig in den Bauchraum gegeben. Die Kanüle blieb anschließend im Bauchraum stecken, während dieser vorsichtig mit der Hand massiert wurde, damit sich die Zellen ablösen (zirka 1 - 2 Minuten). Die Kanüle wurde danach mit der Öffnung nach unten gedreht und das Medium wurde wieder ganz vorsichtig heraus gesaugt. Die Rückgewinnung des Mediums erfolgte ohne Verletzung des Darms. Vor dem Versuch wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in Milzmedium aufgenommen und kultiviert wurden.

### 4.2.4 Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Blut von *Per1::Luc*-Ratten wurde 1:1 mit PBS (mit 1 mM EDTA) verdünnt und vorsichtig über 5 ml Hypaque-Ficoll bei Raumtemperatur überschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen höherer Dichte die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während sich eine Mischung aus mononukleären Zellen (Monozyten, B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen), die PBMCs, in der Interphase ansammeln.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 400xg und Raumtemperatur ohne Aktivierung der Zentrifugationsbremse. Die Interphase zwischen Plasma und Ficoll wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette isoliert. Die PBMCs wurden anschließend zweimal mit PBS + 1 mM EDTA gewaschen (5 min bei 300xg) und zur Messung der Biolumineszenz verwendet.

## **4.3 Organentnahme und Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben und Zellen**

### **4.3.1 Entnahme von Milz und Lymphknoten für die anschließende Isolierung von Gesamt-RNA**

C57BL/6 Mäuse wurden in 3 h bzw. 6 h Intervallen durch Inhalation von Ether betäubt und getötet. Anschließend wurden die Organe mit 1x PBS perfundiert bis zur vollständigen Hellfärbung der Organe. Die Milz und inguinalen Lymphknoten wurden entnommen und 24 h bei 4 °C mit RNAlater inkubiert. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung.

### **4.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Milzgewebe**

Die Isolierung von RNA aus Milzgewebe erfolgte mit Hilfe des RiboPure™ Kits von Ambion. In RNAlater vorinkubierte Milzstücke (max. 50 mg) wurden in einen vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff bedeckt und mit einem Pistill zerstoßen. Das Gewebe muss während der gesamten Prozedur ständig gefroren sein. Das zerstoßene Gewebe wurde in 20fachem Volumen RNAwiz aufgenommen. Dieser Puffer enthält Phenol und ein RNase inhibierendes Reagenz. Die Probe wurde durch wiederholtes Aufziehen in einer Spritze homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde Chloroform dazugegeben, gemischt und durch Zentrifugation in organische und wässrige Phasen separiert. Die wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde nach Dekantieren mit Ethanol versetzt. Durch eine anschließende Zentrifugation wurde die RNA auf eine Säule gebunden. Die Säule wurde dreimal mit unterschiedlichen Waschpuffern gewaschen, die zur Spülung und Entfernung von Fremdstoffen diente. Die gereinigte RNA wurde mit einem auf 75 °C erhitzten Elutionspuffer von der Säule eluiert. Anschließend erfolgte ein DNase I-Verdau.

Die Konzentration der RNA wurde mit dem Photometer durch Messung des Quotienten von OD 260/280 nm bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde durch das Auftrennen der RNA im Agarosegel ermittelt.

### **4.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Lymphknoten**

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von QIAGEN. Der Lymphknoten wurde in einen vorgekühlten Mörser gegeben, mit flüssigem Stickstoff bedeckt und mit einem Pistill zerstoßen. Das Gewebe war dabei ständig gefroren. Die Probe wurde in einem Lysepuffer

aufgenommen. Dieser enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol und ein hoch denaturierendes Guanidine-Isothiocyanat, welches RNasen inaktiviert. Zum Homogenisieren wurde die Probe mehrfach durch eine Spritze gezogen. Danach wurde Ethanol zugegeben, um die Bindung der RNA an die Säule zu unterstützen. Durch Zentrifugation erfolgte die Bindung der Nukleinsäure an die Membran in der Säule. Im Anschluss erfolgte der DNase-Verdau auf der Säule. Die nachfolgende Waschung befreite die RNA von Salzen, Metaboliten und von anderen makromolekularen Zellkomponenten. Zum Schluss wurde die RNA mit Wasser eluiert.

Durch Messung im Photometer und Bildung des Quotienten von OD 260/280 nm wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde durch das Auftrennen der RNA im Agarosegel ermittelt.

#### **4.3.4 Gesamt-RNA-Isolierung von primären Milzzellen und RAW 264.7 Zellen**

Die Isolierung von RNA aus primären Milzzellen (einschließlich einzelner aufgereinigter Immunpopulationen wie CD11b<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> und CD90.2<sup>+</sup>) und RAW 264.7 Zellen erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben. Das Pellet der Zellen wurden nach Zentrifugation mit dem RLT-Puffer, welcher vorher mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurde, lysiert und zusätzlich durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Spritze homogenisiert. Die weiteren Schritte entsprechen der RNA-Isolierung aus Lymphknoten.

#### **4.3.5 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann mittels UV-Spektroskopie ermittelt werden, da die konjugierten Doppelbindungen in den aromatischen Ringen der Basen ultraviolettes Licht absorbieren. DNA und RNA zeigen ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 257 nm. Verunreinigungen wie Proteine und andere aromatische Substanzen absorbieren auch bei dieser Wellenlänge. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt jedoch nicht bei 260 nm sondern bei 280 nm. Deshalb kann durch eine Referenzmessung und Verhältnisbildung der Absorptionswerte bei 280 nm die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Der Quotient aus 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

Die Extinktion von 1 OD (optischen Dichte) bei 260 nm entspricht für RNA einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ , für doppelstängige DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ .

### 4.3.6 Elektrophorese von RNA in Agarosegelen

Bei der Gelelektrophorese werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wandern kleinere Nukleinsäuren schneller als größere Moleküle im Gel auf Grund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode und werden dementsprechend aufgetrennt.

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1,2 % Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen. Das Gel setzte sich folgendermaßen zusammen: 0,6 g Agarose, 37 ml Wasser und 5 ml zehnfacher MOPS-Puffer. Diese Mischung wurde in einem Mikrowellenherd bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Nach der Abkühlung der Lösung auf zirka 60 °C wurden 4,25 ml Formaldehyd zugegeben, die Lösung in die Apparatur gegossen und zirka 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sie erstarrte.

Die RNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer bestimmt. Anschließend wurden je 0,5 µg RNA mit 2-fach konzentriertem Ladepuffer (Loading Dye Solution, enthält Ethidiumbromid) versetzt. Der Molekulargewichtsmarker und die RNA wurden danach 10 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Das Gel wurde mit den Proben und dem RNA-Marker RNAladder beladen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur in 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer bei 80 V zirka 1,5 h durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Durchlicht im Lumi-Imager.

## 4.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 4.4.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese Enzyme benötigen wie DNA-Polymerasen Primer für den Beginn der DNA-Synthese. Ausgangspunkt für die Reverse Transkriptase ist ein freies 3'-OH-Ende an einem gepaarten Nukleotid. Dies kann alternativ durch drei Methoden generiert werden:

1. am Poly-A-Schwanz der mRNA lagern sich oligo-dT-Primer an und von dort kann die cDNA umgeschrieben werden
2. ein Gemisch von Random-Hexameren oder Random-15mere bindet an verschiedenen Stellen innerhalb der mRNA
3. ein spezifischer anti-sense Primer bindet an einer bestimmten (definierten) Sequenz innerhalb der mRNA

Für die reverse Transkription wurden Random Hexamere und Random 15-mere [184] eingesetzt und das Enzym Superscript II verwendet. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 aufgeführt.

**Tabelle 4-1:** Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Reagenzien	Volumen in $\mu\text{l}$
RNA (250 ng - 2000 ng)	X
5x First Strand Puffer	10
dNTPs (je 10 mM)	1
Random Hexamere (50 $\mu\text{M}$ )	5
Dithiothreitol (DTT, 0,1 M)	5
Superscript RNase H <sup>-</sup> (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0,25
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5
Wasser	Ad 50

**Tabelle 4-2:** Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkription

Zeit [min]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Prozess
10	25	Annealing
50	37	Elongation
15	70	Denaturierung

#### 4.4.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR dient dem spezifischen Nachweis von gesuchter Ziel-RNA, wobei das Testprinzip auf einer normalen Polymerase-Kettenreaktion beruht. Zusätzlich zu den genspezifischen Primern werden Sonden verwendet, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und am 3'-Ende liegenden Quencher markiert sind. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten Sonde durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt.

Zum Zeitpunkt der Anlagerung der PCR-Primer bindet auch die Sonde an die cDNA. Die *Taq*-Polymerase besitzt neben ihrer DNA-Polymeraseaktivität auch noch eine 5'-, 3'-Exonucleaseaktivität. Bei der Neustrangsynthese schneidet die *Taq*-Polymerase durch ihre 5'-, 3'-Exonucleaseaktivität die Sonde in kleine Fragmente, wodurch es zu einer räumlichen Loslösung des Reporters vom Quencher kommt, sodass die Reporterfluoreszenz freigesetzt

werden kann. Diese steigende Reporterfluoreszenz wird gemessen, wobei deren Intensität in der Summe direkt proportional zur Zahl der neu gebildeten DNA-Stränge ist (Quantifizierung).

Die Primer und die 5'-FAM-3'-TAMRA-gelabelten Sonden wurden mit der Primer Express 2.0 Software nach den Richtlinien von Applied Biosystems generiert.

Es wurden 3-fach-Bestimmungen von jeder Probe durchgeführt. Zusätzlich wurden für jedes analysiertes Gen zwei Negativ-Kontrollen auf die Platte aufgetragen. Die optimale Verdünnung der cDNA wurde durch vorherige Versuche mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die optimale Primer- und Sondenkonzentration wurde vorher durch Titration ermittelt. Die Steigung der Standardkurve stimmte dabei mit der Steigung des konstitutiv exprimierten Gens überein.

Für die quantitative PCR wurde ein optimierter selbst hergestellter Mastermix verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 4-3 dargestellt ist.

**Tabelle 4-3:** Reaktionsansatz für die quantitative PCR für die Bestimmung der Uhr gene

Reagenzien	<i>Gapdh</i>	<i>Per2</i>	<i>Rev-Erb<math>\alpha</math></i>	<i>Bmal1</i>
10x Reaktionspuffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Glycerin (20 %)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
dNTPs (je 10 mM)	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
AmpliTaq (5 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
Forward Primer	300 nM	900 nM	300 nM	900 nM
Revers Primer	300 nM	900 nM	300 nM	900 nM
Sonde	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM
cDNA	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Wasser	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Die Reaktionsansätze wurden in eine 96-Well-Platte pipetiert und mit einer Folie (Optical Adhesive Covers) verschlossen. Anschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Die Messung erfolgte im ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet (Siehe Tabelle 4-4):



**Tabelle 4-4:** Reaktionsbedingungen für die quantitative PCR

Zeit und Temperatur		Zyklenzahl
2 min	50 °C	1
10 min	95 °C	1
15 s	95 °C	40
1 min	60 °C	
4 °C		1

Über die Analyse-Funktion der Software wurde der Detektionsschwellenwert (Ct-Wert) bestimmt. Zur Bestimmung der Transkriptlevel der untersuchten Gene wurde die Differenz ( $\Delta\text{CT}$ ) aus den Ct-Werten der konstitutiv exprimierten Gene (Gapdh) und des Zielgens gebildet. Zusätzlich wurde auf einen weiteren internen Wert normalisiert ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ) und dieser in die Gleichung  $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$  eingesetzt. [9,114]. Voraussetzung bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden PCR-Reaktionen, die durch Vorversuche getestet wurde.

## 4.5 Zellbiologische Methoden

### 4.5.1 Kultivierung von RAW 264.7 Zellen

RAW 264.7 Zellen wurden in Milzmedium bei 37 °C, 5 % CO<sup>2</sup> kultiviert. Zur Passagierung, die in der Regel 2 bis 3-mal pro Woche erfolgte, wurden die adhären wachsenden Zellen mit einem Zellscripper von der Kultivierungsfläche gekratzt. Die Weiterkultivierung der Zellen erfolgte in frischem Milzmedium, die zuvor 1/5 bis 1/3 gesplittet und/oder in einer bestimmten Zellkonzentration für verschiedene Experimente ausgesät wurden.

#### 4.5.1.1 Kultivierung von RAW 264.7 Zellen mit Proliferationshemmern

Die Zellteilung von RAW 264.7 Zellen wurde durch die Zugabe der Proliferationshemmers Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid und Mimosin verhindert. Beide Proliferationshemmer haben keinen Einfluss auf die circadiane Uhr, da eine Zellteilung nicht notwendig für eine circadiane Uhrexpression ist [16]. RAW 264.7 Zellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid und 250  $\mu\text{M}$  Mimosin kultiviert.

### 4.5.2 Kryokonservierung der Zellen

Unter Kryokonservierung (*kryo* <griech.> für Kälte) versteht man das Einfrieren und Lagern von Zellen bei tiefen Temperaturen in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Durch spezielle Kryokonservierungsverfahren können auf diese Weise Zellen über lange Zeiträume ohne Beeinträchtigung ihrer Lebensfähigkeit gelagert werden. Während der Kryokonservierung ruhen alle biologischen Vorgänge – nach dem Auftauen werden sie wieder aktiv.

Um eine Schädigung der Zellen durch Kristallbildung und partielle Dehydration im Zytoplasma zu schützen, gibt man sogenannte Kryoprotektiva (z. B. Glycerin oder Dimethylsulfoxid) in die einzufrierende Probe. Diese Kryoprotektiva dringen aufgrund ihrer geringen Molekülgröße in die Zellen ein und ersetzen einen Teil des intrazellulären Wassers. Gleichzeitig bewirken sie eine Gefrierpunktniedrigung der Lösung. Die Schutzwirkung beruht unter anderem darauf, dass hohe Salzkonzentrationen erst bei tieferen Temperaturen erreicht werden, sodass die Zellschrumpfung verringert wird. Da sie zusätzlich die Eiskristallisationskinetik verlangsamen, wird auch die Neigung zur intrazellulären Eisbildung geringer. Ein gravierender Nachteil der Kryoprotektive ist, dass sie in den notwendigen Konzentrationen in der Regel toxisch sind und daher nach dem Auftauen kosten- und zeitaufwendig aus den Zellen ausgewaschen werden müssen.

Für die Kryokonservierung wurden die expandierten RAW 267.4 Zellen in der Kulturflasche mit PBS gewaschen und mit dem Zellschaber von der Kulturoberfläche abgekratzt. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und 5 min bei 4 °C und 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das resuspendierte Zellpellet auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann in Medium für die Kryokonservierung aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden anschließend in -20 °C vorgekühlten Einfrierboxen gestellt und für mindestens 2 h bei -80 °C gelagert. Durch das Isopropanol in den Einfrierboxen wird eine langsame Abkühlung der Zellen von 1 bis 2 °C pro Minute ermöglicht. Die Zellen wurden anschließend zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Die eingefrorenen Zellen wurden zum Auftauen mit 1 ml warmem FCS versetzt und das Kryoröhrchen im warmen Wasser geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend in eine Kulturflasche überführt und mit Milzmedium versetzt. Nachdem die Zellen über Nacht adherieren konnten, wurde ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt.

### 4.5.3 Synchronisierung der Zellen

Viele Zellen besitzen die molekularen Voraussetzungen für eine funktionale circadiane Uhr. Diese bewirken ein circadianes Verhalten, das weitestgehend dem Verhalten der Hauptuhr im

SCN entspricht. *In vivo* wird angenommen, dass periphere Organe und ihre circadiane Uhr durch einen Haupttaktgeber mit Hilfe von humoralen oder neuronalen Signalen synchronisiert werden. Durch die Synchronisation dieser peripheren Organe oszillieren die Zellen in einer einheitlichen Phase und Periode. In der Zellkultur (*ex vivo*) fehlt dieser Haupttaktgeber. Die Zellen schwingen deshalb mit ihrer eigenen endogenen Periode. Diese kleinen Periodenunterschiede bewirken mit der Zeit eine Desynchronisation der Zellpopulation und die Oszillation der Gesamtpopulation kann dadurch schlecht ausgelesen werden. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Zellen vor einem Experiment zu synchronisieren. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Vielzahl von Substanzen zur Synchronisierung geeignet sind, wie z. B. Serum, Forskolin, Dexamethason und Endothelin. Die Synchronisierung erfolgt dabei über eine „immediate early“-Induktion der Uhrgene *Per1* und/oder *Per2*. Mit dieser Induktion wird die Phase der Zellen neu eingestellt und die Zellen synchronisiert.

Die Zellen wurden durch die Behandlung von 1  $\mu\text{M}$  Dexamethason für zwei Stunden synchronisiert. Nach der Inkubation wurde ein Mediumwechsel mit entsprechenden Medien für die nachfolgenden Experimente durchgeführt.

#### 4.5.4 Stabile Transfektion von RAW 264.7 Zellen

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung heterologer DNA (in Eukaryontenzellen) durch endozytotische Prozesse der Zelle. Die Gene, die auf dieser zirkulären DNA (Vektor) liegen, werden in der Zelle durch zelluläre Enzyme in Proteine übersetzt.

Bei der stabilen Transfektion kommt es zu einem zufälligen Einbau des Expressionsvektors in die chromosomale DNA der Zielzelle. Der übertragene Vektor wird im Gegensatz zur transienten Transfektion nicht abgebaut, sondern bei jeder Zellteilung verdoppelt und an die Tochterzellen weitergegeben. Diese behalten dadurch die Fähigkeit, das gewünschte Protein über einen langen Zeitraum hinweg zu exprimieren. Um transfizierte Zellen von nicht-transfizierten Zellen zu unterscheiden wird ein Selektionsmarker, z. B. eine Antibiotikaresistenz, zusätzlich mit eingebracht. Für das Einschleusen von Nukleinsäuren können verschiedene Methoden angewendet werden: mechanische (z. B. Mikroinjektion), physikalische (z. B. Ultraschall und Elektroporation), chemische (z. B. Kalziumphosphatpräzipitation und kationische Lipide) und biologische (z. B. Retroviren). Für die Transfektion von RAW 267.4 Zellen wurde die Lipofektion mit dem kationischen Lipid „Lipofectamin 2000“ durchgeführt. Das Verfahren mit kationischen Lipiden beruht darauf, dass bei der Mischung von DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Chlorid) und Phospholipiden positiv geladene Liposomen entstehen, die an die negativ geladene DNA binden. Die dabei entstehenden Komplexe werden von den Zielzellen durch Endozytose aufgenommen. Das Verhältnis von

Lipid/DNA, die Konzentration der Komplexe und die Inkubationsdauer müssen jeweils von Zelllinie zu Zelllinie optimiert werden.

Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag in antibiotikafreiem Medium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden die beiden einzubringenden Plasmide (pEF-DEST51 und pGL3\_E6S) in unterschiedlichen Konzentrationen in 150 µl Optimem miteinander gemischt. Insgesamt wurde jeweils eine Menge von 1200 ng linearisierter DNA transfiziert. Pro Ansatz wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß 3 µl Lipofectamin 2000 in 150 µl Optimem zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die DNA/Optimem-Lösung und die Lipofectamin/Optimem-Lösung wurden in einem 1:1-Verhältnis gemischt und anschließend 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde dann zu den Zellen gegeben (je 300 µl pro Well). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit dem Selektionsmarker Blastizidin, der alle 2 bis 3 Tage wiederholt wurde.

Die resultierende Zelllinie exprimiert Luziferase unter circadian regulierten E-Boxen. Das circadiane Verhalten dieser Zelllinie kann durch Messung der Biolumineszenz in einem Luminometer verfolgt werden.

#### **4.5.5 Herstellung und Aufkonzentrierung des Lentivirus**

Um in Zellen ein Reporterkonstrukt zur Auslesung der Luziferase einzubringen, gibt es außerdem noch die Möglichkeit der Transduktion von Zellen mit Hilfe von Lentiviren. Dazu muss ein geeigneter Lentivirus hergestellt werden.

293T Zellen wurden am Vortag in 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen ausgesät und mit CM-Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden wie in Tabelle 4-5 angegeben die Helferplasmide und der virale Vektor gemischt und mit einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung (2 M) und HEPES-gepuffertem Wasser auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde in einem weiteren Reaktionsgefäß 500 µl 2fach mit HEPES gepufferte Saline vorgelegt und unter einem ständigen Blasenstrom tropfenweise der DNA-Mix hinzugegeben. Diese Mischung wurde für 10 s mit dem Vortexer gemischt, bevor die Lösung exakt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurde diese Lösung tropfenweise zu den Zellen in das Medium gegeben und die Kulturschale vorsichtig vor und zurück bewegt. Nach einer 24-stündigen Inkubation erfolgten ein Waschschriff mit PBS und ein Mediumwechsel. Zur Gewinnung der im Überstand befindlichen Viruspartikel wurde das Medium nach weiteren 24 h geerntet und die Zellkulturschale mit frischem Medium nochmals 24 h inkubiert. Dieser Überstand wurde wiederum geerntet und mit dem ersten Überstand vom Vortag vereinigt. Im Anschluss wurde der Überstand durch einen Filter mit 0,2 - 0,4 µm Porengröße gegeben und 5 min bei 300xg zentrifugiert, um eventuelle Zellen und Debris zu entfernen.

**Tabelle 4-5:** Mengen der eingesetzten Helferplasmide bei der Herstellung von Lentiviren

Helferplasmid	Menge
Coding Plasmid pABpuro-E6F oder Coding Plasmid pABpuro-BluF	15 µg
Verpackungs-Plasmid pSpax	10 µg
Hüll-Plasmid pMD2G	6 µg

Zur Aufkonzentrierung der Lentiviren wurde die Lösung für 90 min bei 28.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Viruspellet in 1 ml RPMI Medium gelöst, indem es bei 4 °C über Nacht geschüttelt wurde. Wenn keine Aufkonzentrierung des Lentivirus erfolgte, wurde die Lösung aliquotiert, da ein häufiges Auftauen und Einfrieren zum Verlust von infektiösem Virus führt. Die Aliquots wurden bei –80 °C gelagert.

Der Lentivirus exprimiert Luziferase nun unter der Kontrolle des E-Box-kontrollierten SV40-Promotors oder unter einem *Bmal1*-Promotorfragment.

#### 4.5.6 Transduktion von Zellen oder Geweben mit Lentiviren

Unter Transduktion versteht man die Übertragung fremder DNA in Zellen durch Viren. Ursprünglich wurde dieser Begriff verwendet, um den Transport von DNA durch Bakterienviren in Bakterien zu beschreiben.

Folgende Zellen und Gewebe wurden mit dem Lentivirus transduziert: RAW 267.4 Zellen, primäre Peritonealmakrophagen, primäre Milzmakrophagen, primäre Milzzellen, Milz- und Lebergewebe. Dabei verlief die Infektion von Zellen/Gewebe immer nach dem gleichen Protokoll: die Zellen wurden in einer 35 mm Kulturschale ausgesät. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde das Medium durch virushaltiges Medium ausgetauscht. Dem neuen Medium wurden zur Unterstützung des Infektionsprozesses 2 µl Protaminsulfat zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens sechs Stunden. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiterkultiviert. Für die Selektion der infizierten Zellen erfolgte eine Inkubation mit Puromycin. Die infizierten Zellen exprimieren nun LUZIFERASE unter der Kontrolle von E-Boxen oder des Uhrgenpromotorfragments *Bmal1*.

#### 4.5.7 Echt-Zeit-Messung der Biolumineszenz von Geweben und Zellen

Die Aufnahme der Biolumineszenzdaten der Luziferaseaktivität der Milzstücke, Lymphknoten, Peritonealmakrophagen und PBMCs von PER2::LUC-Mäusen bzw. *Per1::Luc*-Ratten erfolgte in Kooperation mit Dr. Ute Abraham an der Washington University in St. Louis, USA.

Die transgenen und knock-in-Tiere, wurden betäubt und 2 h vor Ende des Lichtzyklus getötet. Sowohl Milz als auch inguinale Lymphknoten von PER2::LUC-Mäusen und *Per1::Luc*-Ratten wurden entnommen. Ein kleines Stück der Milz und vollständige Lymphknoten wurden auf einer Millicellmembran mit 1 ml DMEM und 0,1 mM Leuchtkäfer-Luziferin kultiviert [1]. Peritonealmakrophagen von PER2::LUC-Mäusen und PBMCs von *Per1::Luc*-Ratten wurden wie beschrieben entnommen und in DMEM mit 10 % Serum und 0,1 mM Luziferase ebenfalls auf einer Millicellmembran kultiviert. Für die Dauer der Datenaufnahme wurde die Probe in 35 mm großen Petrischalen mit einem Deckel und Schmierfett luftdicht verschlossen und in einem Photomultipliertube (HC135-11MOD, Hamamatsu, Japan) bei 37 °C im Dunklen kultiviert. Die Biolumineszenz wurde in 1-min-Intervallen für 5 bis 7 Tage aufgenommen.

Die Biolumineszenz und damit das circadiane Verhalten von transfizierten RAW 264.7 Zellen oder von transduzierten Zellen/Geweben mit einem Lentivirus wurde mit Hilfe des Reportergens *Luziferase* bestimmt. Vor der Messung erfolgte eine Synchronisierung der Zellen mit Dexamethason oder ein weiterer Mediumwechsel. Für die Messung wurde Phenolrot-freies mit Luziferin supplementiertes Medium verwendet. Die 35-mm-Kulturschale wurde mit einer atmungsaktiven Folie abgedichtet. Anschließend wurde das Kulturgefäß in einen Luminometer gestellt, der sich in einem Inkubator befand. Die Biolumineszenz wurde für mindestens fünf Tage aufgenommen.

##### 4.5.7.1 Auswertung der Biolumineszenzdaten

Die Rohdaten der Biolumineszenzmessung wurden trendeliminiert. Dazu wurde von dem jeweiligen Rohdatenwert der gleitende Mittelwert dividiert. Das bedeutet, für jeden einzelnen Datenzeitpunkt wurde der Mittelwert von den Rohdaten eines ganzen Tages (24 h) errechnet, indem von jedem Datenzeitpunkt aus alle Rohdaten der zwölf vorangegangenen sowie der zwölf nachfolgenden Stunden zusammengefasst wurden und daraus der Durchschnitt bzw. der Mittelwert gebildet wurde. Die auf diese Weise für alle einzelnen Datenzeitpunkte errechneten Mittelwerte bilden insgesamt den sogenannten gleitenden Mittelwert. Der jeweilige Rohdatenwert wurde durch den gleitenden Mittelwert dividiert. Das Ergebnis daraus wurde graphisch dargestellt.

#### 4.5.8 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer Trypanblau-Lösung verdünnt, um tote Zellen von lebenden zu unterscheiden. Das Trypanblau dringt in geschädigte Zellen ein und färbt diese Zellen ein, die dann unter dem Mikroskop blau erscheinen. Von dieser Mischung wurden wiederum 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die durchscheinenden lebenden Zellen innerhalb der 16 Quadrate (= 4 Großquadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen auf ihre Vitalität überprüft werden. Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung:

Lebendzellzahl der Ausgangslösung = gezählte Zellzahl (durchscheinende Zellen) x 2 x  $10^4$  x Volumen der Ausgangslösung.

Zur Unterscheidung von Milzzellen und Erythrozyten unter dem Mikroskop wurden die Zellen in 3%-iger Essigsäurelösung, anstatt in Trypanblaulösung, verdünnt und ausgezählt. Durch die Essigsäure werden die Erythrozyten zerstört und dementsprechend nicht mitgezählt. Eine Lebend/Tot-Unterscheidung ist mit dieser Methode nicht möglich.

#### 4.5.9 Stimulation mit LPS

Bei der LPS-induzierten Aktivierung von Makrophagen/Monozyten spielt der Toll-like-Rezeptor 4 eine maßgebliche Rolle. Ein komplexer Mechanismus beinhaltet mehrere Komponenten zur Erkennung von LPS, z. B. LBP, CD14 und MD-2. Diese Erkennung am TLR4 bewirkt eine Vielzahl von Signalkaskaden in der Zelle, an deren Ende der Transkriptionsfaktor NFκB steht. Dieser bewirkt die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNFα, die von den Zellen in den Zellkulturüberstand sekretiert werden.

##### 4.5.9.1 Stimulation von primären Milzzellen mit LPS

C57BL/6 Mäuse und adrenaletomierte Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und dann in konstante Dunkelheit überführt. Am ersten Tag in konstanter Dunkelheit wurden zu unterschiedlichen circadianen Zeitpunkten (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20) die Milzen der Mäuse entnommen und eine primäre Milzzellkultur hergestellt. Die Zellen wurden in Milzmedium kultiviert und auf eine Zellkonzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Kultivierung erfolgte in 48-Well-Platten mit  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in 500 µl Milzmedium. Für die Stimulation mit LPS wurden jeweils 4 Wells und je ein Well für eine unstimulierte Kontrolle ausgesät. Die Zellen wurden für vier Stunden mit 5 µg/ml LPS stimuliert. Das verwendete LPS ist spezifisch für den TLR4 und stimuliert keine anderen Toll-like-Rezeptoren. Nach der

Stimulation wurde der Überstand der Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß für sieben Minuten bei 300xg und 4 °C abzentrifugiert, um eventuelle Zellen zu entfernen. Dieser Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und für die Bestimmung von TNF $\alpha$  und IL-6 verwendet.

#### **4.5.9.2 Stimulation primärer Peritonealmakrophagen mit LPS**

C57BL/6 Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und dann in konstante Dunkelheit überführt. Je drei Tiere wurden zu sechs unterschiedlichen circadianen Zeitpunkten (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20) in einem Vier-Stunden-Zeitintervall durch cervikale Dislokation getötet. Peritoneale Makrophagen wurden durch eine Peritoneallavage gewonnen. Die primären Zellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 45 min, in der die Makrophagen adhäreren konnten, wurde neues Medium zugegeben und mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS vier Stunden stimuliert. Die Konzentrationen an LPS betragen 0,1 ng/ml und 100 ng/ml. Der Zellkulturüberstand wurde zur Detektion von TNF $\alpha$  im Elisa verwendet.

#### **4.5.9.3 Stimulation von RAW 267.4 Zellen mit LPS**

RAW 267.4 Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von drei Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit dem Proliferationshemmer AraC. Am nächsten Tag wurden die Zellen zwei Stunden mit Dexamethason synchronisiert. Für die anschließende Zeitreihe wurden je Zeitpunkt vier Wells vier Stunden mit 0,2 pg/ml LPS stimuliert. Dies erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden. Die Zellkulturüberstände wurden für die Detektion von TNF $\alpha$  im Elisa verwendet.

#### **4.5.10 Stimulation von primären Milzzellen mit Concanavalin A**

Concanavalin A ist ein pflanzliches Protein, welches speziell T-Zellen stimuliert. Es bindet an den T-Zell-Rezeptor und aktiviert dadurch die Zelle, die dann IFN $\gamma$  sekretiert.

Von synchronisierten C57BL/6 Mäusen wurden zu verschiedenen circadianen Zeitpunkten (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20) die Milzen gewonnen und eine primäre Milzzellkultur hergestellt. Die Zellkonzentration wurde auf 6 Mio. Zellen/ml eingestellt und 500  $\mu$ l je Well in einer 48-Well-Plate ausgesät. Die Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml Concanavalin A erfolgte für 24 Stunden. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert und bei -80 °C eingefroren. Die Konzentration von sekretierten IFN $\gamma$  wurde mittels Elisa bestimmt.



## 4.6 Immunologische Methoden

### 4.6.1 Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung von einzelnen Immunzellpopulationen eignet sich besonders die Durchflusszytometrie (FACS engl. „fluorescence activated cell sorting“). Mit Hilfe der FACS-Analyse können Zellen auf ihre morphologischen Eigenschaften (Zellgröße und Granularität) sowie auf Moleküle, die sich auf der Zelloberfläche oder innerhalb des Cytoplasmas befinden, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern untersucht werden.

In dem Analysegerät z. B. FACSCalibur befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit. In diese Trägerflüssigkeit wird die Zellsuspension eingebracht. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserstrahl vorbeigeführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. In modernen FACS-Geräten können pro Zelle vier oder mehr verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und weitere Parameter gleichzeitig gemessen werden. Zwei dieser zusätzlichen Parameter (FSC und SSC) erlauben eine Unterscheidung der Zellen auf Grund von morphologischen Zellparametern (Zellgröße, Granularität). Im verwendeten Analysegerät FACSCalibur stehen drei Sensoren für 530 nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585 nm (FL2) und >650 nm (FL3) über den ersten Laser (Argon, 488 nm) zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser (635 nm) kann ein weiterer Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL4: 670 nm).

Mit Hilfe des FACS-Gerätes können in 10 s 10.000 Zellen untersucht werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FCS express. Die Daten wurden als zweidimensionale „Punktdiagramme“ („dot-plots“) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von definierten Analysefenstern („gates“) kann die Expressionsanalyse auf die zu untersuchende Zellpopulationen beschränkt werden.

### 4.6.2 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Für die durchflusszytometrische Messung wurden pro Ansatz  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen müssen im Puffer gut vereinzelt sein. Alle Inkubationsschritte fanden im Dunkeln bei 5 bis 8 °C statt. Die primären Milzzellen wurden vor der Färbung 10 min mit Fc $\gamma$ -Block und IgG inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nachdem die Zellen mit Puffer

gewaschen wurden, wurden sie mit einem Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle für 15 bis 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Waschung der Zellen und schließlich die Messung im FACSCalibur.

Um eine tot/lebend-Unterscheidung zu ermöglichen, wurde unmittelbar vor der Messung Propidiumjodid (PI) zugegeben. Propidiumjodid diffundiert durch die beschädigte Zellmembran toter Zellen und interkaliert mit der DNA-Doppelhelix. Die so markierten toten Zellen können in der durchflusszytometrischen Messung zusätzlich gemessen und nachher bei der Analyse ausgeschlossen werden.

Falls erforderlich erfolgte eine Fixierung der Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit 4 % PFA-Lösung und anschließender Waschung mit FACS-Puffer.

#### **4.6.3 Bestimmung der Anzahl der Zellen einer Immunpopulation in der Milz über 24 h mittels Durchflusszytometrie**

Um die einzelnen Immunpopulation und deren Zellzahl in der Milz über einen Zeitraum von 24 h zu bestimmen, wurden C57BL/6 Mäuse und adrenaletomierte Mäuse in einem 4 h Intervall getötet und deren Milzen entnommen. Die primäre Milzzellkultur wurde wie oben beschrieben hergestellt. Für die 15 – 20-minütige Inkubation mit spezifischen Antikörpern wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Für die Analyse der drei Hauptpopulationen in der Milz wurden folgende Antikörper benutzt:

Monozyten / Makrophagen: 1  $\mu$ l anti-CD11b-FITC, 1,25  $\mu$ l anti-CD14-APC

B-Zellen: 0,5  $\mu$ l anti-CD19-PerCP-Cy5.5

T-Zellen: 0,05  $\mu$ l anti-CD90.2- FITC

Anschließend wurden die Zellen gewaschen, fixiert und im FACSCalibur gemessen. Die Auswertung der Analyse erfolgte mit dem Programm FCS Express. Die jeweiligen Zellpopulationen wurden gegatet und so deren prozentualer Anteil ermittelt.

#### **4.6.4 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (Elisa)**

Der Elisa ist ein heterogener Enzym-Immunoassay, der auf der Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Dabei kann entweder ein spezifischer Antikörper an einer festen Trägersubstanz (z. B. Zellulose, Polystyrol) gebunden vorliegen oder das Antigen liegt gebunden vor. Nach der Inkubation mit der Probe bilden sich Immunkomplexe aus und in einem nachfolgenden Schritt

können weitere Enzym-markierte Antikörper binden. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden. Die Antigenkonzentrationen in der Probe kann anschließend durch den Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivitäten ermittelt werden.

#### 4.6.4.1 TNF $\alpha$ -Elisa

Der Nachweis von TNF $\alpha$  im Zellkulturüberstand erfolgte mittels TNF $\alpha$ -Elisa von der Firma Biosource. Die Durchführung stimmte größtenteils mit dem Hersteller-Protokoll überein.

Die 96-Well-Elisaplaten wurden am Vortag mit 100  $\mu$ l einer 1:800 Verdünnung des Coating Antikörper (Ratte-anti-Maus-TNF $\alpha$ ) mit Coatingpuffer beschichtet. Die Platte wurde über Nacht bei 5 bis 8 °C inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt, indem man die Flüssigkeit in der Platte vollständig entfernt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Elisaplatte mit 300  $\mu$ l Blocking-Puffer (enthält BSA) für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde der Puffer entfernt und die Platte 4- bis 6-mal mit 400  $\mu$ l Waschpuffer gespült. Die so vorbehandelte Mikrotiterplatte wurde nun mit 100  $\mu$ l Probe in einer entsprechenden Verdünnung und den Standards (500 pg/ml – 7,8125 pg/ml) inkubiert. Sofort danach wurden 50  $\mu$ l des Biotin-markierten Sekundärantikörpers zugegeben. Die 1:1000fache Verdünnung des Antikörpers erfolgte in Standardpuffer mit 5 % FCS. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Antikörper durch 4- bis 6-maliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Darauf folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur mit 100  $\mu$ l des Streptavidin-Horseradish Peroxidase-Konjugates (1:1000). Nach dem Waschen erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l Substrat (TMB) und eine Inkubation der Platte im Dunkeln bis sich die Proben und Standards blau färbten. Diese Reaktion wurde mit 1,8 N Schwefelsäure abgestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 450 nm und bei 620 nm zur Referenz im Elisaplatenreader (Anthos Reader) ausgelesen.

#### 4.6.4.2 IFN $\gamma$ -Elisa

Der Nachweis von IFN $\gamma$  aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe des IFN $\gamma$ -Elisas der Firma Biosource. Die Durchführung stimmte größtenteils mit dem Hersteller-Protokoll überein.

Die Elisaplaten wurden am Vortag mit dem anti-Maus-IFN $\gamma$ -Antikörper (1:2000) beschichtet und über Nacht bei 5 bis 8 °C inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurde die Platte mit Blockingpuffer, der BSA enthält, 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben und des Standards (400 pg/ml bis 6,25 pg/ml) für 1,5 h bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen mit Waschpuffer wurde die Platte mit dem biotinyelabelten Sekundärantikörper (1:602) für 1 h inkubiert. Nach einer

weiteren Waschung erfolgte die Inkubation des Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugates (1:1000) für 45 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates (TMB), die Inkubation für 15 min im Dunkeln und die Abstopfung der Enzymreaktion mit Schwefelsäure. Bei 450 nm und 620 nm wurde die Platte im Elisaplattenreader ausgelesen.

#### **4.6.4.3 IL-6-Elisa**

Der Nachweis von sekretiertem IL-6 nach Stimulation mit LPS erfolgte mittels IL-6 Elisas von der Firma eBioscience. Die mitgelieferten Puffer wurden nach Angaben des Herstellers gelöst und verdünnt.

Die Elisaplatte wurde über Nacht mit 100 µl des anti-IL-6 Coatingantikörper bei 5 bis 8 °C inkubiert, deren Verdünnung 1:250 betrug. Der Antikörper wurde vollständig nach 12 bis 18 h entfernt und die Platte mit Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden blockiert, indem mit 200 µl Blocking-Puffer 1 h inkubiert wurde. Der Blocking-Puffer wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt. Anschließend wurden 100 µl der Proben und des Standards (500 pg/ml bis 7,8125 pg/ml) aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschrift wurde die Platte mit dem Biotin-markierten anti-Maus-IL-6-Detektionsantikörper (1:250) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde durch 4- bis 6- maliges Waschen entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugates (1:250) und die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Durch mindestens 7-maliges Waschen mit Waschpuffer wurde das Konjugat wieder entfernt und TMB wurde zugegeben. Diese Inkubation erfolgte im Dunkeln, bis sich die Proben und Standards blau färbten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt und resultierte in einem Farbumschlag zu Gelb. Die Elisaplatte wurde anschließend in dem Elisaplattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm ausgelesen.

#### **4.6.5 Sortierung von Immunzellen**

Zur Isolierung von definierten Zellpopulationen wurde die Methode der magnetischen Zellseparation angewandt.

##### **4.6.5.1 Sortierung von Immunzellen mittels magnetischer Sortierung nach der Methode der Firma Miltenyi**

Die Sortierung der B- und T-Zellen erfolgte mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS: Magnetic cell separation) nach der Methode der Firma Miltenyi Biotech GmbH.

Bei der positiven Zellseparation werden die Zellen über monoklonale Antikörper direkt mit magnetischen Mikropartikeln markiert. Die Zellsuspension wird anschließend über eine Trennsäule, die eine Matrix aus Stahlwolle besitzt, gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet. Während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen, bleiben die markierten Zellen, zurückgehalten durch das Magnetfeld, in der Trennsäule hängen und können anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden.

#### **4.6.5.2 Sortierung von B- und T-Zellen mittels magnetischer Sortierung nach der Methode der Firma Miltenyi**

Für die Isolierung von B- und T-Zellen wurden C57BL/6 Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten, in konstante Dunkelheit überführt und zu den circadianen Zeitpunkten CT10 und CT22 die Milzen entnommen. Aus den Milzen wurden Primärzellkulturen hergestellt. Die Isolierung der beiden Zellpopulationen erfolgte sequenziell aus der gleichen Zellsuspension. Dabei wurde zuerst die kleinere Zellpopulation, die T-Zellen, separiert und anschließend die B-Zellen. Nach der Erythrozytenlyse mit Wasser wurden die Zellen mit einer Trypanblaulösung gezählt, zentrifugiert und nach dem Blocken der unspezifischen Bindungen mit  $Fc\gamma$  und IgG auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen auf 90  $\mu$ l MACS-Puffer eingestellt. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 5 bis 8 °C mit dem spezifischen Antikörper anti-CD90.2 für T-Zellen, wobei 10  $\mu$ l Antikörper-Beads auf  $1 \times 10^7$  Zellen verwendet wurden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die zuvor äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 3 ml Puffer gewaschen, wobei das Filtrat aufgefangen und zur Sortierung von B-Zellen eingesetzt wurde. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die CD90.2 positiven Zellen mit 5 ml Puffer eluiert.

Für die Isolierung der B-Zellen wurden die Zellen erneut gezählt und wieder auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro 90  $\mu$ l MACS-Puffer eingestellt. Danach erfolgte die Inkubation des B-Zellantikörpers anti-CD45R (B220) für 15 min bei 5 bis 8 °C. Nach erneutem Waschen wurde das Zellpellet in 1 ml Puffer aufgenommen und auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde mit Puffer gewaschen und das Filtrat aufgefangen. Anschließend wurde diese aus dem Magneten entfernt und die Zellen in 5 ml Puffer eluiert. Für die nachfolgende RNA-Isolierung mit dem RNeasy Kit von QIAGEN wurden die sortierten Zellen (B- und T-Zellen) zentrifugiert und mit 1200  $\mu$ l RLT-Puffer versetzt.

Von einzelnen Zwischenschritten wurden Aliquots für die Analyse der Reinheit der Separation gewonnen. Diese erfolgte mittels Färbung mit spezifischen Antikörpern für T- und B-Zellen (0,1  $\mu$ l anti-CD90.2-FITC und 1  $\mu$ l anti-CD19-PerCP-Cy5.5) und FACS-Analyse im FACSCalibur. Zusätzlich wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt um eine lebend/tot-

Unterscheidung zu ermöglichen. Die Auswertung der FACS-Analyse und damit die Bestimmung der Reinheit der Zellen wurde mit dem Programm FCS Express durchgeführt.

#### **4.6.5.3 Sortierung von Immunzellen mittels magnetischer Separation nach der Methode der Firma Cellsystems**

Die Sortierung von CD11b-positiven Zellen erfolgte mittels magnetischer positiver Separation nach der Methode der Firma CellSystem. Dabei werden die gewünschten Zellen mit einem spezifischen Antikörper markiert. Dieser Antikörper ist mit dem Farbstoff FITC (Fluorescein Isothiocyanat) gekoppelt. Die gefärbten Zielzellen werden anschließend mit einem Dextran-gekoppelten magnetischen Nanopartikel durch einen bispezifischen tetramerischen Antikörperkomplex gefärbt. Dieser Komplex erkennt sowohl das FITC-Molekül als auch die Dextran-gecoateten magnetischen Nanopartikel. Die magnetisch markierten Zellen können so von den unmarkierten Zellen getrennt werden.

#### **4.6.5.4 Sortierung von CD11b<sup>+</sup>-Zellen mittels magnetischer Separation nach der Methode der Firma Cellsystems**

C57BL/6 Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und in konstante Dunkelheit überführt. Zu CT10 und CT22 wurden die Milzen entnommen und eine primäre Zellkultur hergestellt. Durch Zählung der Zellen in Essigsäure wurde die Konzentration der Einzelzellsuspension bestimmt und diese auf eine Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen pro 100  $\mu$ l „Easy sep Medium“ eingestellt. Vor der Zugabe des spezifischen Antikörpers für Makropagen (anti-CD11b-FITC) wurden unspezifische Bindungsstellen mit Fc $\gamma$  geblockt. Die Inkubation des anti-CD11b-Antikörpers erfolgte anschließend für 15 min bei 5 bis 8 °C. Danach wurden 20 ml „Easy sep Medium“ zu den Zellen gegeben. Diese Zellsuspension wurde nochmals über ein Zellsieb gegeben und zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen wieder auf die Ausgangskonzentration eingestellt und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Danach wurde die Zellsuspension bei 5 – 8 °C mit dem Selection-Cocktail 15 min inkubiert, wobei 100  $\mu$ l pro ml Zellen des Selection-Cocktails zu den Zellen gegeben wurde. Für weitere 10 min wurden die Zellen mit 50  $\mu$ l pro ml Zellen mit Nanopartikeln inkubiert. Danach wurde Medium bis zu einem Endvolumen von 2,5 ml zugegeben und das Röhrchen für 5 min im Magneten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in einem Zug dekantiert und das Röhrchen aus dem Magneten genommen. Diese beiden Schritte wurden 4- bis 5-mal wiederholt. Zum Schluss wurden die sortierten Zellen in 1 ml Puffer aufgenommen, zentrifugiert und in RLT-Puffer für die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Kit von QIAGEN lysiert. Für die anschließende Bestimmung der Reinheit mittels FACS-Analyse wurden von den Zwischenschritten Aliquots genommen.

## 4.7 Auswertung der Laufrad-Aktivität

Die Auswertung der durchschnittlichen Laufrad-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Programms Clocklab. Für die Berechnung wurden die Gesamtaktivitäten von 12 Tagen zu Grunde gelegt. Die durchschnittliche Aktivität von unoperierten Mäusen wurde mit der von adrenaletomierten Mäusen durch den t-Test verglichen.

## 4.8 Statistische Auswertung der Zeitreihen

Die Expressionslevels der Uhrgene in Milz und Lymphknoten sowie in RAW 264.7 Zellen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. In der gleichen Form sind die TNF $\alpha$ -, IL-6- und IFN $\gamma$ -Konzentrationen und die Zellzahlen in der Milz dargestellt. Um zu prüfen, ob die Werte der Zeitreihen einer circadianen Oszillation unterliegen, wurden sie mit dem Programm CircWave V1.4 (Hut *et al.*, unveröffentlicht) analysiert. Dieses Programm benutzt zur Auswertung eine lineare Regression einer Sinuskurve und nimmt dabei eine Periode von 24 Stunden an (<http://www.rug.nl/biologie/onderzoek/onderzoekgroepen/chronobiologie>). Von einer circadianen Oszillation wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$  ausgegangen.

Um den Einfluss von Kortisol zu untersuchen, wurden die Konzentrationen der sekretierten Zytokine von nicht-operierten und adrenaletomierten Mäusen mit Hilfe der Two-way-Anova analysiert. Als Test-Parameter wurden die Zeit und die Adrenaletomie verwendet. Bei  $p < 0,05$  wurde ein Einfluss von Kortisol angenommen.

Für die Auswertung der Unterschiede in der Uhrgenexpression in sortierten Immunzellen wurde der t-Test angewandt. Ab einem p-Wert von kleiner als 0,05 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten angenommen.

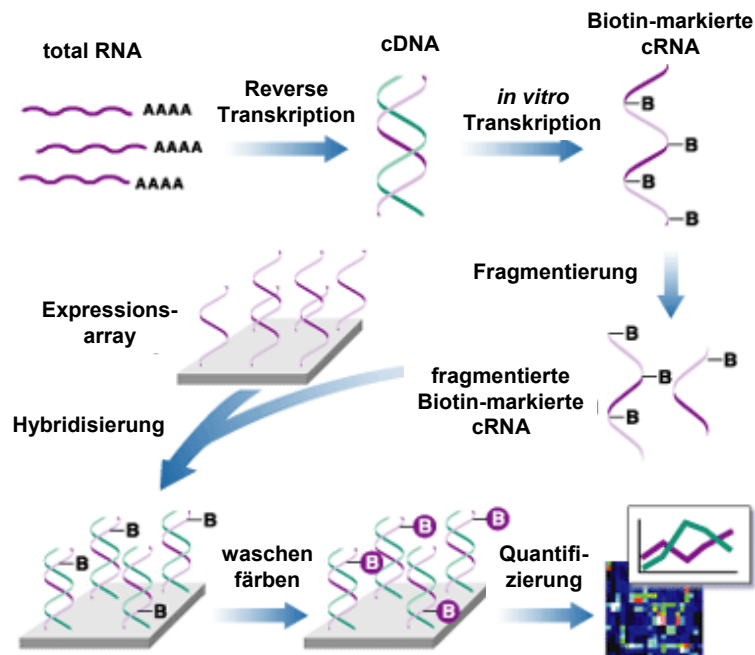
## 4.9 Expressionsanalyse mittel DNA-Arrays

### 4.9.1 Microarrays

Für die Untersuchung der circadianen Genexpression in der Milz wurde zu zwei Zeitpunkten das Transkriptom von ausgewählten Immunzellen auf ihre circadiane Regulation hin analysiert. Um viele Gene parallel untersuchen zu können, wurden Microarrays benutzt.

Diese Technologie der Microarrays basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren (Watson-Crick-Basen-Paarung). Für jedes zu untersuchende Gen wird ein spezifischer Sequenzabschnitt ausgewählt, für den komplementäre einzelsträngige DNA-Moleküle als Sonden auf einem Chip immobilisiert werden. Aus Zellen oder Geweben wird RNA isoliert und

in cDNA umgeschrieben. Nach der *in vitro*-Transkription von cDNA und Markierung der cRNA mit Biotin werden die Nucleinsäuren auf den Array gegeben. Die cRNA bindet entsprechend ihres Sequenzabschnittes an die komplementären Sondenmoleküle auf dem Chip. Nach mehreren Waschschriften wird der Array mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation eines sekundären Antikörpers, der wiederum mit Biotin markiert ist.



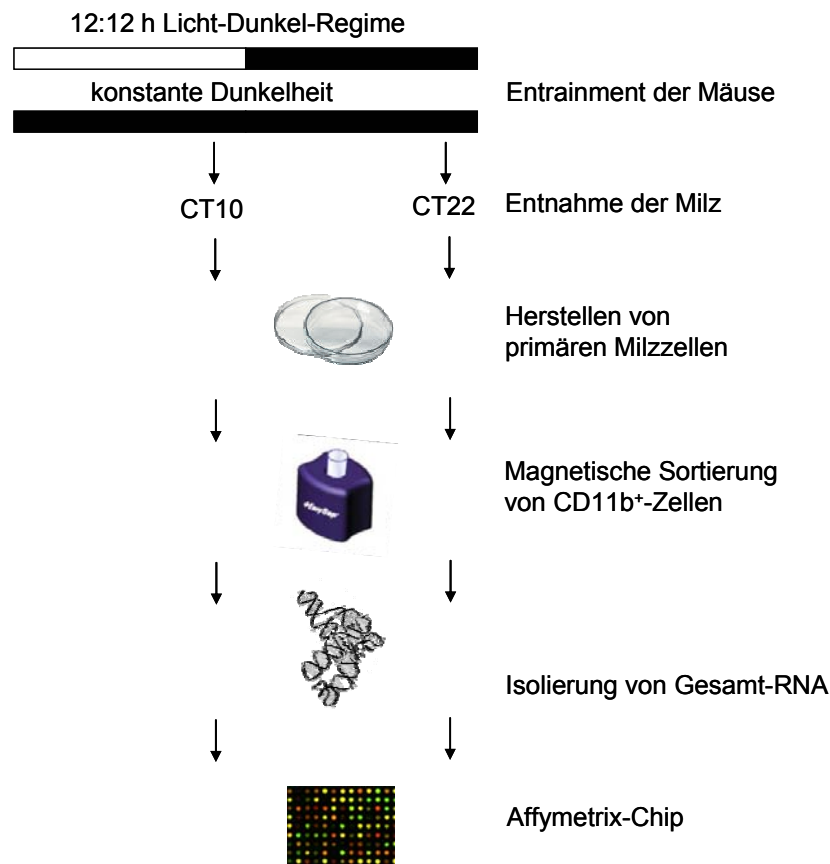
**Abbildung 4-2:** Analyse von Transkriptionsleveln mittels Microarrays. RNA wird gewonnen und durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch *in vitro*-Transkription wird die cDNA in cRNA umgeschrieben und mit Biotin markiert. Die so markierte Probe wird auf den Microarray zur Hybridisierung gegeben. Nach mehreren Waschschriften erfolgt die Färbung des Arrays und der Chip kann mittels Computeranalyse ausgewertet werden.

(modifiziert nach: [http://www.affymetrix.com/technology/ge\\_analysis/index.affx](http://www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx))

Anhand der Markierung auf dem Array lassen sich auf diese Weise die Mengen der gebundenen Nucleinsäuren messen. Indem Tausende von Genen simultan untersucht werden, lässt sich somit ein recht umfassendes Bild des molekularen Zustands einer Population von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt gewinnen.



#### 4.9.2 Transkriptionsanalyse von Makrophagen mittels Affymetrix-Chip



**Abbildung 4-3:** Expressionsanalyse von Makrophagen mittels Mircoarray. C57BL/6 Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und dann in konstante Dunkelheit überführt. Zu den circadianen Zeitpunkten CT10 und CT22 wurden die Milzen der Tiere gewonnen und eine primäre Zellkultur hergestellt. Aus diesen Zellen wurde mittels magnetischer Sortierung CD11b<sup>+</sup>-Zellen isoliert und daraus Gesamt-RNA präpariert. Die Expressionsanalyse mittels Affymetrix-Chip und deren Auswertung wurde am Labor für Funktionelle Genomforschung (Charité) durchgeführt.

Für die Untersuchung der Transkriptlevel von Immunzellen wurden CD11b<sup>+</sup>-Zellen (Makrophagen) von den zwei circadianen Zeitpunkten CT10 und CT22 ausgewählt. Mäuse wurden dazu unter einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 wurden die Milzen entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. CD11b-positive Zellen wurden mittels magnetischer Zellseparation nach der Methode der Firma Cellsystems abgetrennt. Aus diesen sortierten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert. Die RNA aus je vier Mäusen pro Zeitpunkt wurde gepoolt. Die Expressionsanalyse wurde in Kooperation mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité durchgeführt. Die zeitliche und schematische Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

### 4.9.3 Auswertung der Chipdaten

Die Auswertung der Signale auf dem Affymetrix-Array erfolgte durch Dr. Ralf-Jürgen Kuban vom Labor für funktionelle Genomforschung der Charité. Dabei wurde eine Liste aller auf dem Array vorhandenen Gene mit dem jeweiligen Rohsignal sowie dem normalisierten Signal erstellt und dadurch eine Aussage darüber gemacht, ob das Gen „Present“ (exprimiert), „Absent“ (nicht exprimiert) oder „Marginal“ auf dem Chip vorhanden ist. Zusätzlich gibt der p-Value in der erstellten Liste eine Aussage darüber, wie gut eine Probe beim „Perfect Match“ im Vergleich zum „Miss Match“ hybridisiert hat (Wert sollte sehr klein sein, mindestens unter 0,5). Desweiteren wurde das normalisierte Signal eines Gens des einen Zeitpunktes durch das normalisierte Signal des anderen Zeitpunktes dividiert. Daraus ergibt sich der Fold-Change-Faktor, der darüber Auskunft gibt, wie groß die Expressionsunterschiede zwischen den Zeitpunkten sind. Ist ein Gen zu CT22 im Gegensatz zu CT10 nur gering exprimiert, wird dem Fold-Change-Faktor zusätzlich ein negatives Vorzeichen gegeben.

Um Gene zu identifizieren, die zu den gemessenen Zeitpunkten unterschiedlich exprimiert sind, wurden zunächst folgende Kriterien ausgewählt: 1. Das Gen muss zu beiden Zeitpunkten exprimiert sein und damit auf beiden Arrays als „Present“ vorliegen, 2. der Fold-Change-Faktor muss mindestens zweifach oder größer sein, 3. der p-Value muss kleiner als 0,05 sein.

Zusätzlich wurden Gene ausgesucht, die nur zu einem von beiden Zeitpunkten von den Zellen abgelesen werden. Dafür müssen andere Kriterien herangezogen werden: 1. Das exprimierte Gen muss ein ausreichend hohes normalisiertes Signal vorweisen, um aus dem Hintergrund genügend hervorzutreten. Als Limitationswert des Hintergrundsignals wurde der doppelte Mittelwert des normalisierten Signals aller marginal bezeichneten Gene verwendet. 2. Der p-Value muss auch hier kleiner als 0,05 sein, um das exprimierte Gen eindeutig als hybridisiert zu bestimmen.

Gene, die diese Kriterien erfüllen, wurden mit Hilfe der Genontologie bestimmten Funktionen zugeordnet. Dazu wurde die folgende Internetseite von Affymetrix verwendet: <https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>. Auf dieser Seite können die vorher ausgewählten Gene einer Gengruppe zugeordnet und dadurch die Funktionen ermittelt werden. Somit können Signalwege identifiziert werden, die besonders von einer Regulation betroffen sind.

#### 4.9.4 Überprüfung der Array-Daten mittels quantitativer PCR

Die Überprüfung der Array-Daten erfolgte mit Hilfe der quantitativen PCR. Dabei wurde anstelle von fluoreszierenden Sonden der DNA-interkalierende Farbstoff SYBR Green verwendet. Der dabei entstehende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex kann blaues Licht absorbieren und grünes Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm emittieren. Das Testprinzip dieser quantitativen PCR beruht auf einer normalen Polymerase-Kettenreaktion. Zum PCR-Ansatz wird lediglich der Farbstoff zusätzlich hinzu gegeben. Bei der PCR mit spezifischen Primern wird eine Zielsequenz amplifiziert, wobei die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zunahme der Zielsequenz korreliert.

Die Primer wurden bei der Firma MWG bestellt oder die Primer der quantitativen PCR mit Fluoreszenzsonden wurden verwendet. Dabei war darauf zu achten, dass die Primer in dem Sequenzabschnitt lagen, der auch für das jeweilige Gen auf dem Microarrays benutzt wurde. Es wurden jeweils Doppel-Bestimmungen von jeder Probe durchgeführt. Nach der PCR wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die DNA durch langsames Erhöhen der Temperatur wieder aufgeschmolzen wird. Dabei wird der Farbstoff wieder freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert, sodass unspezifische Produkte wie Primerdimer von spezifischen PCR-Produkten unterschieden werden können, da sie unterschiedliche Schmelzpunkte haben.

Für die quantitative PCR wurde der SYBR® GREEN PCR Mastermix von Applied Biosystems verwendet. Der Pipetieransatz ist in Tabelle 4-6 dargestellt.

**Tabelle 4-6:** Volumen der verwendeten Reagenzien für die quantitative PCR mit SYBR Green

Reagenzien	Volumen in µl
2x SYBR® GREEN PCR Mastermix	10
10x QuantiTEC-Primer Set	2
cDNA	8

Die Reaktionsansätze wurden in eine 96-Well-Platte pipetiert und mit einer Folie (Optical Adhesive Covers) verschlossen. Anschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Die Messung erfolgte im ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Das Temperaturprogramm entspricht dem der quantitativen PCR mit Fluoreszenzsonden. Die Auswertung der Transkriptlevel erfolgte wie unter Punkt 4.4.2 beschrieben.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Circadiane Uhrgen-Oszillation von Geweben des Immunsystems

Eine circadiane Uhrgenexpression ist in vielen peripheren Organen [213] wie Herz, Leber und Niere gefunden worden. Doch existiert auch im Immunsystem eine funktionelle circadiane Uhr? Ebenso ist es unklar, ob diese funktionale Uhr in den Zellen erhalten bleibt, wenn sie von exogenen Zeitgeber-Informationen wie Tag und Nachtzyklus abgekoppelt ist.

Um diese Eigenschaften der circadianen Uhr zu testen, wurden zunächst die Expressionslevels der Uhrgene in den Organen des Immunsystems untersucht.

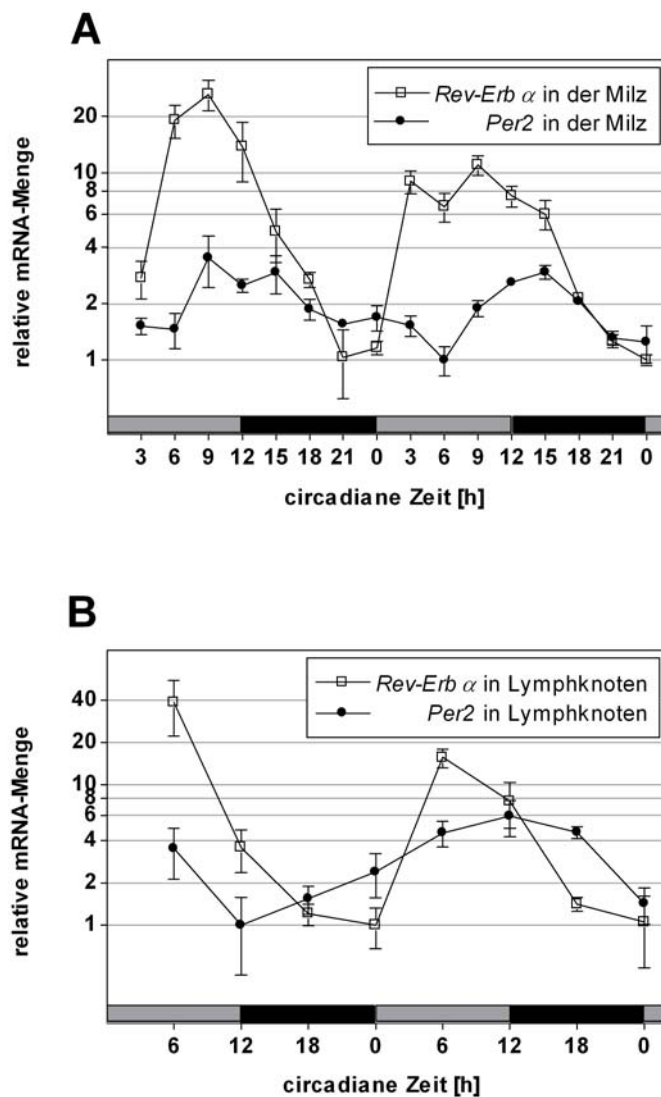
#### 5.1.1 Circadiane Uhrgen-Oszillation in der Milz und in den Lymphknoten

Die Expressionslevels der Uhrgene *Per2*, *Rev-Erb $\alpha$*  und *Bmal1* wurden in den Immungeweben Milz und Lymphknoten untersucht, um zu testen, ob es eine circadiane Expression von Uhrgenen im Immunsystem gibt.

Dazu wurden Mäuse zwei Wochen in einem alternierenden 12 h Licht- und einem 12 h Dunkelzyklus gehalten, bevor sie in konstante Dunkelheit entlassen wurden. Anschließend wurden im Abstand von drei Stunden die Milzen bzw. sechs Stunden die Lymphknoten über einen Zeitraum von 48 Stunden entnommen. Die Organe wurden für 24 Stunden in RNAlater inkubiert. Die Aufbewahrung der Organe erfolgte bei -80 °C. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expressionslevels der circadianen Uhrgene *Per2*, *Rev-Erb $\alpha$*  und *Bmal1* wurden mit quantitativer PCR relativ zu dem konstitutiv exprimierten Gen *Gapdh* analysiert. Die Daten wurden statistisch mit dem Programm CircWave ausgewertet.

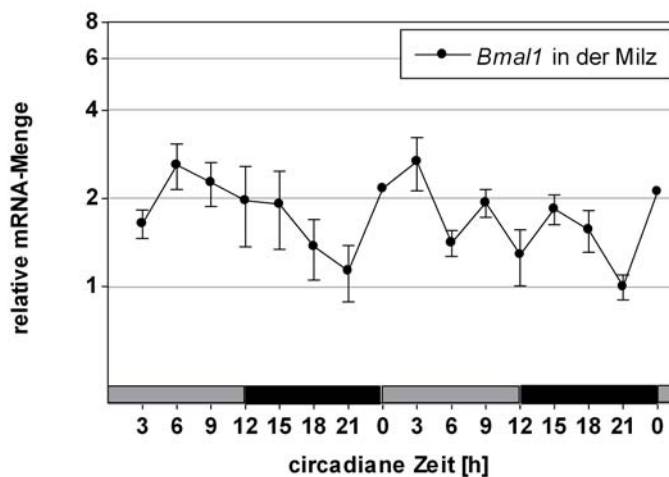
Die mRNA-Expressionen von *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  in der Milz zeigen eine signifikant circadiane Oszillation ( $p < 0,0001$  für *Rev-Erb $\alpha$* ,  $p < 0,001$  für *Per2*) mit einer 3fachen Amplitude für *Per2* und 20fachen Amplitude für *Rev-Erb $\alpha$*  (Abbildung 5-1A). Die maximale Expression von *Per2* wird zwischen den circadianen Zeitpunkten CT12-15 erreicht und für *Rev-Erb $\alpha$*  um CT9.

Für das circadiane Uhr gene *Bmal1* ist ein Trend zur Oszillation in Abbildung 5-2 zu erkennen. Dieser ist jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 5-1:** Die circadianen Uhr gene *Per2* (—●—) und *Rev-Erbα* (—□—) werden in der Milz (A) und den Lymphknoten (B) rhythmisch exprimiert. Milzen und Lymphknoten von Mäusen wurden über zwei Tage regelmäßig entnommen, nachdem die Tiere von einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus in konstante Dunkelheit überführt wurden. Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorausgegangenen Licht-Dunkel-Rhythmus. Die RNA beider Organe wurde präpariert und in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptlevels wurden mittels quantitativer PCR ermittelt. Die mRNA-Menge der Uhr gene wurde relativ zu *Gapdh* als Referenzgen ermittelt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Transkriptlevels von *Rev-Erbα* und *Per2* (Milz: n = 3 - 6, Lymphknoten: n = 3 - 4, Ausnahme CT6 (Tag 2) n = 2). Die Expressionslevels der Uhr gene in Milz und Lymphknoten wurden mit dem Programm CircWave V1.4. analysiert. Die Oszillationen von *Per2* und *Rev-Erbα* in der Milz ( $p < 0,0001$  für *Rev-Erbα*,  $p < 0,001$  für *Per2*) und die Oszillation von *Rev-Erbα* in den Lymphknoten ( $p < 0,005$ ) sind statistisch signifikant.

In den Lymphknoten wurden die Uhrgene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  untersucht. Auch hier ist eine signifikant circadiane Uhrgen-Oszillation von *Rev-Erb $\alpha$*  ( $p < 0,005$ ) zu erkennen mit einer ähnlichen Amplitude wie in der Milz (Abbildung 5-1 B). Die maximale Expression von *Rev-Erb $\alpha$*  wird um CT6 erreicht. Die Oszillation von dem Uhrgen *Per2* in den Lymphknoten wird von dem Statistikprogramm CircWave als nicht signifikant bewertet, obwohl auch hier eine Oszillation zumindest am ersten Tag zu erkennen ist. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an der feststehenden Periode, die das Statistikprogramm zugrunde legt. CircWave geht dabei von einer Periode von 24 h aus. Die *Per2* mRNA-Menge in den Lymphknoten dagegen oszilliert offensichtlich mit einer längeren Periode als 24 h. In beiden Immungeweben zeigt das Expressionslevel für *Rev-Erb $\alpha$*  ein Maximum zwischen CT6 – 9 und für *Per2* zwischen CT12 - 15.



**Abbildung 5-2:** Das Uhrgen *Bmal1* wird nicht signifikant circadian in der Milz exprimiert. Mäuse wurden zwei Wochen in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. In einem 3-Stunden-Intervall erfolgte die Entnahme der Milzen. Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorausgegangenen Licht-Dunkel-Rhythmus. Die RNA der Milz wurde präpariert und in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptlevels des Uhrgens *Bmal1* wurden mittels quantitativer PCR ermittelt, wobei die Auswertung mit Hilfe der relativen Quantifizierung mit *Gapdh* als Referenzgen erfolgte. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der relativen mRNA-Menge des Uhrgens *Bmal1* ( $n = 3 - 6$ ). Das Expressionslevel über die Zeit wurde mit Hilfe von CircWave analysiert. Es ist keine signifikante circadiane Expression von *Bmal1* vorhanden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass auch in Lymphknoten eine circadiane Uhrgenexpression existiert. Die Expressionsmuster der Uhrgene in den Lymphknoten verhalten sich dabei in Phase und Amplitude wie in anderen peripheren Organen

wie Leber, Herz und Niere. Eine funktionale circadiane Uhr konnte somit in den Organen des Immunsystems, wie Milz und Lymphknoten, nachgewiesen werden.

## 5.2 Autonome Oszillation von Immungeweben

Wie in Abbildung 5-1 dargestellt, existiert eine circadiane Uhrgen-Oszillation in den Geweben des Immunsystems. Periphere Oszillationen können Literaturangaben zu Folge [15,17] von Signalen des Körpers getrieben werden. Damit stellt sich die Frage, ob die Oszillationen im Immunsystem auch von systemischen humoralen und/oder neuronalen Rhythmen direkt oder indirekt gesteuert werden, oder ob diese Gewebe/Zellen autonom schwingen. Neuroendokrine Hormone, die sowohl eine Rhythmik als auch potentielle immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, sind Kortisol, Dehydroepiandrosteron (DHEAS), Melatonin, Östrogen, Progesteron, Testosteron, Adrenocortikotropin (ACTH), Vasopressin,  $\beta$ -Endorphin, Prolactin und Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) [21]. Diese Mediatoren könnten somit als Zeitgeber für Immunzellen fungieren. Kortisol [15] und Melatonin [68,185] wurden schon näher als mögliche Synchronisationssignale beschrieben. Um zu testen, ob diese Taktgeber (Zeitgeber) für die circadiane Uhrgenosozillation im Immunsystem notwendig sind, wurden Zellen oder Organe von körpereigenen Signalen abgekoppelt untersucht. Herangehensweisen waren dabei:

1. Untersuchung von Immunzellen oder Geweben *ex vivo*, die mit Luziferase-Reporterplasmiden lentiviral transduziert oder transfiziert wurden.
2. Untersuchung der Uhrgenexpression der Immunzelllinie RAW 264.7.
3. Echt-Zeit-Messung der Biolumineszenz *ex vivo* von Immungeweben und Zellen von PER2::LUC- Mäusen und *Per1::Luc*-Ratten.

### 5.2.1 Transfektion und Transduktion von Immunzellen und –geweben

Zunächst wurden Versuche unternommen, *ex vivo* primäre Zellen, Gewebe und Zelllinien lentiviral zu infizieren, um *Luziferase* als Reportergen unter der Kontrolle von circadian regulierten Promotoren zu exprimieren. Der verwendete Lentivirus kodiert *Luziferase* entweder unter einem E6S-Promotor oder einem *Bmal1*-Promotorfragment. Transduziert wurden primäre Milzzellen, Schnitte der Milz und Peritonealmakrophagen. Die Lichtemission war aber zu schwach und somit konnte die Biolumineszenz nicht von dem Hintergrundleuchten unterschieden werden. Diese Methode war damit ungeeignet für die Untersuchung der Entkopplung der Zellen/Gewebe von systemischen Rhythmusgebern.

### 5.2.2 Circadiane Oszillation von RAW 264.7 Zellen

Weiterhin wurde versucht in der Immunzelllinie RAW 264.7 eine autonome circadiane Oszillation nachzuweisen. Die Zellen dieser Zelllinie wachsen adhärent und ohne zusätzlichen Stimulus und stellen damit ein leicht zu handhabendes Modell dar. Als erstes wurden Versuche unternommen, die Zelllinie mit einem Luziferase-Reporterplasmid, das unter der Kontrolle von E-Boxen steht, zu transfizieren um darüber eine circadiane Uhrgenexpression auszulesen.

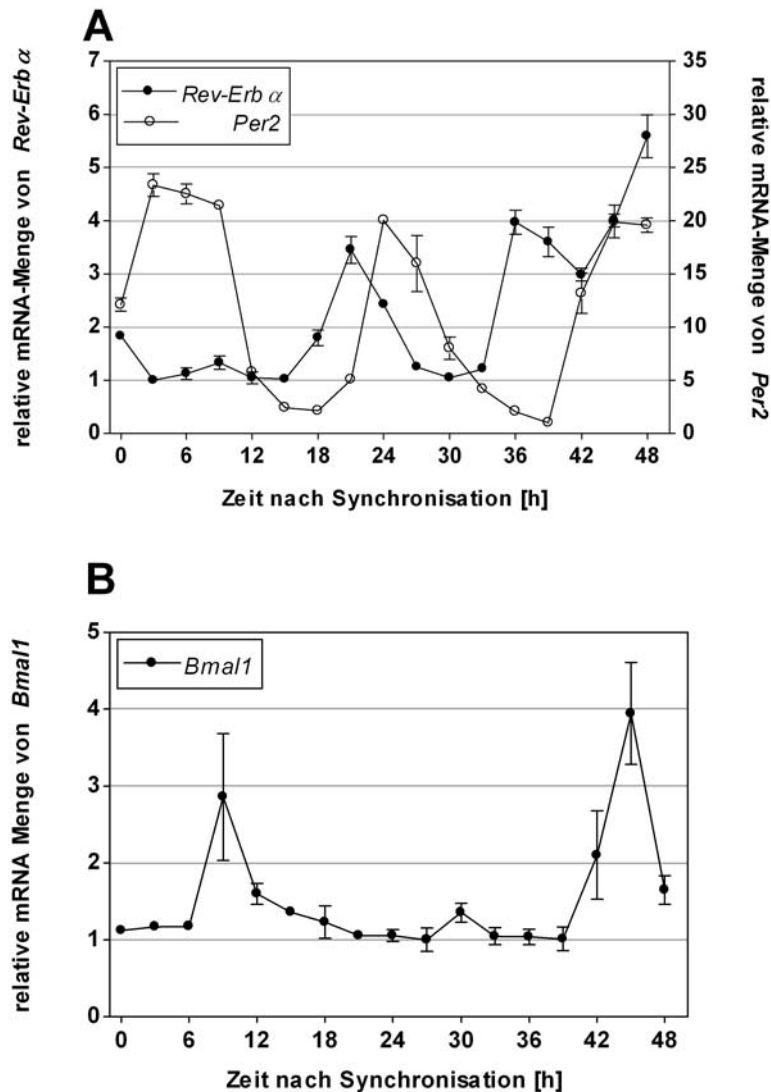
RAW 264.7 Zellen wurden mit den Plasmiden pEF-DEST51 (für Antibiotikaresistenz) und pGL3\_E6S stabil transfiziert. Das Plasmid pGL3\_E6S kodiert für eine Luziferase, die unter der circadianen Kontrolle von E-Boxen steht [204]. Dadurch konnte die Biolumineszenz online im Luminometer ausgelesen werden. Die ausgestrahlte Lichtemission dieser Zellen erwies sich ebenfalls als zu schwach und konnte nicht von dem Hintergrundleuchten unterschieden werden. Ein möglicher Grund ist die ungerichtete Integration der Plasmide in das Genom der Wirtszelle. Wahrscheinlich integrierte die Luziferase-Sequenz an einer Stelle des Genoms, die nur selten oder gar nicht abgelesen wurde.

Um dennoch zu testen, ob diese Zelllinie Uhrgene circadian exprimieren kann, wurden die Transkriptlevels der Uhrgene *Per2*, *Rev-Erb $\alpha$*  und *Bmal1* unter konstanten Bedingungen in einem anderen Experimentdesign untersucht. Von RAW 264.7 Zellen wurden 2 ml einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in einer 12-Well-Platte ausgesät und 2 h mit Dexamethason synchronisiert. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Wells angesetzt. Über einen Zeitraum von 48 h wurden alle 3 h Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Danach erfolgte die Umschreibung durch reverse Transkription in cDNA mit anschließender Expressionsanalyse der Uhrgene *Per2*, *Rev-Erb $\alpha$*  und *Bmal1* mit *Gapdh* als Referenzgen. Die Expressionsmuster der Gene wurden statistisch mit dem Programm CircWave ausgewertet.

Die mRNA-Mengen von *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  in RAW 264.7 Zellen unterliegen einer signifikant circadianen Oszillation ( $p < 0,0001$  für *Per2* und  $p < 0,01$  für *Rev-Erb $\alpha$* ) mit einer hohen Amplitude von 20fach für die mRNA von *Per2* und 3,5fach für *Rev-Erb $\alpha$*  (Abbildung 5-3 A). Das Maximum der mRNA-Menge für *Per2* liegt zwischen 0 und 3 h und für *Rev-Erb $\alpha$*  bei 21 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Im Gegensatz dazu, zeigt das Uhrgen *Bmal1* (Abbildung 5-3 B) keine statistisch signifikante circadiane Oszillation, ähnlich wie in der Milz.

Die Analyse der Expressionsrhythmen der untersuchten Uhrgene und deren zeitliches Verhältnis zueinander deuten darauf hin, daß in der Modelzelllinie RAW 264.7 Zellen und damit auch in Immunzellen ein funktionsfähiges circadianes Uhrwerk existiert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine autonome Oszillation ohne systemische „Zeitgeber“ in diesen Zellen existiert.



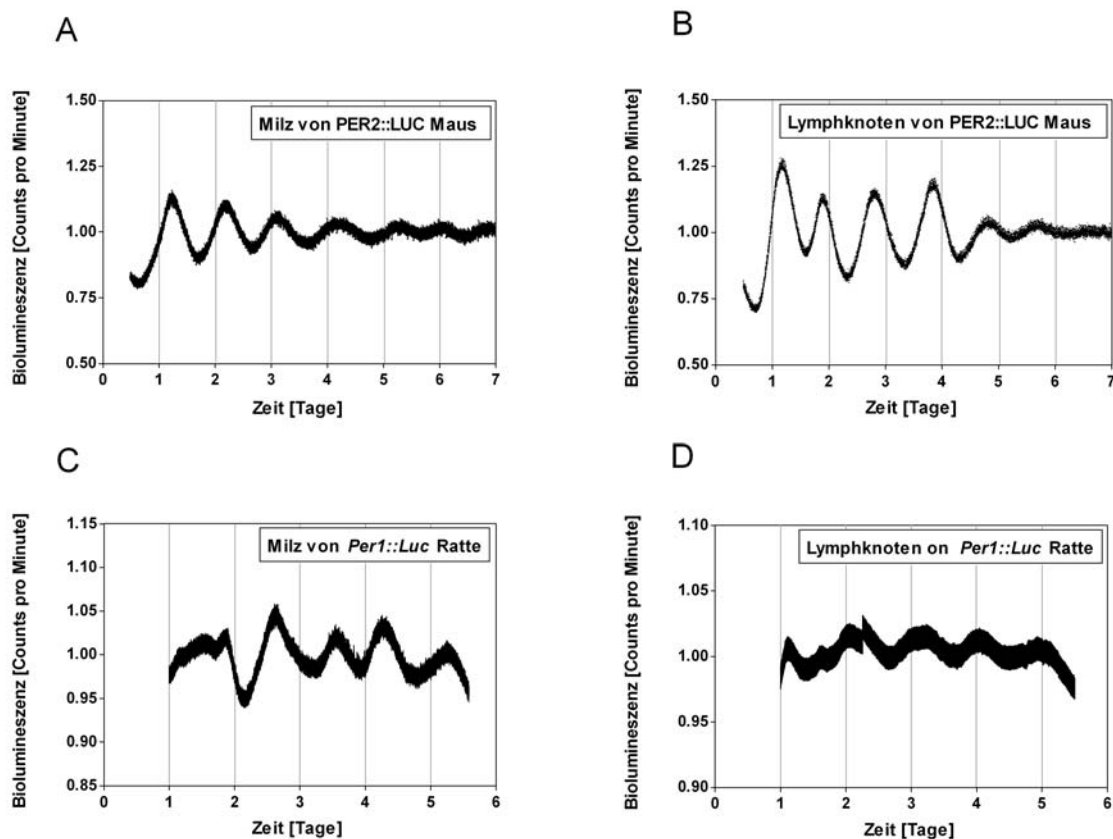


**Abbildung 5-3:** Die Uhrgene *Per2* und *Rev-Erbα* oszillieren in der Zelllinie RAW 264.7. In der Zelllinie RAW 264.7 wurden die Uhrgenexpressionen von *Rev-Erbα* (—●—), *Per2* (—○—) (A) und *Bmal1* (B) ermittelt. Zur Synchronisation wurden RAW 264.7 Zellen 2 h mit Dexamethason behandelt. Die Zellen wurden alle drei Stunden über einen Zeitraum von 48 h geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der Transkriptlevels erfolgte mittels quantitativer PCR. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung mit *Gapdh* als Referenzgen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der relativen mRNA-Menge der Uhrgene aus drei verschiedenen Kulturansätzen mit Standardfehler. Die Oszillationen von *Per2*, *Rev-Erbα* und *Bmal1* wurden mit dem Programm CircWave ausgewertet, wobei sich nur die Oszillationen von *Per2* und *Rev-Erbα* als statistisch signifikant erwiesen ( $p < 0,0001$  für *Per2* und  $p < 0,01$  für *Rev-Erbα*).

### 5.2.3 *Ex vivo* Oszillation von Organen und Zellen des Immunsystems in PER2::LUC-Mäusen und in *Per1::Luc*-Ratten

Zusätzlich zu einer Immunzelllinie sollte auch in peripheren Organen, in denen die Zellen in ihrem natürlichen Gewebekomplex vorliegen, untersucht werden, ob eine autonome Gewebe-Oszillation vorliegt.

Dazu wurde eine PER2::LUC Knock-in-Maus verwendet, die anstelle des Uhrproteins PERIOD ein PER2-LUZIFERASE-Fusionsprotein exprimiert [216]. Als weiteres Modelltier wurde die *Per1::Luc*-Ratte [214] verwendet. Bei dieser transgenen *Per1::Luc*-Ratte, wird *Luziferase* unter der Kontrolle des circadianen *Per1*-Promotors ungerichtet in das Genom eingeschleust. Wird der *Per1*-Promotor abgelesen, erfolgt die gleichzeitige Transkription der *Luziferase*. Unter konstanten Bedingungen kann so von Geweben/Zellen der beiden Tiere die Biolumineszenz in Echt-Zeit gemessen und so analysiert werden, ob eine circadiane gewebeautonome Oszillation vorliegt.



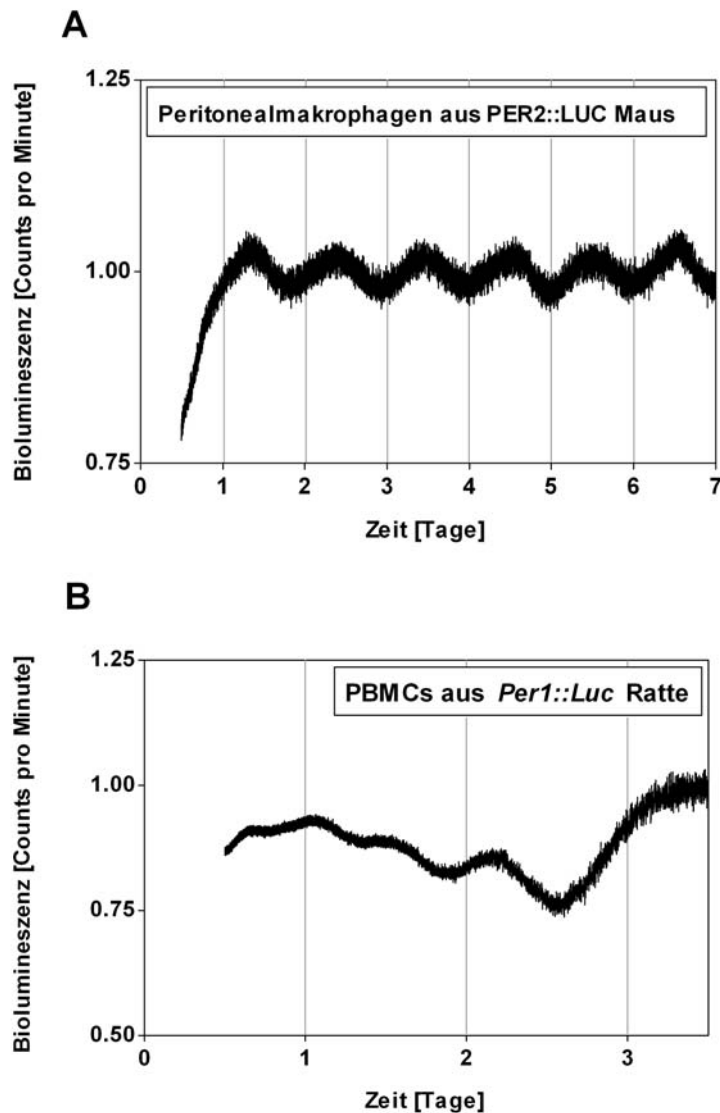
**Abbildung 5-4:** Die circadiane Uhr im Immunsystem ist ein autonomer Oszillator. Stücke der Milz (A) und inguinale Lymphknoten (B) von PER2::LUC knock-in Mäusen sowie Stücke der Milz (C) und intakte inguinale Lymphknoten (D) von *Per1::Luc* transgenen Ratten wurden in Medium mit Luziferin kultiviert. Die Biolumineszenz wurde für mehr als sechs Tage in einem Photomultiplier-Tube aufgenommen. Die Daten wurden trendeliminiert und zeigen jeweils eine repräsentative Aufnahme von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Ute Abraham durchgeführt.

*Per1::Luc*-Ratten und *PER2::LUC*-Mäuse wurden in einem 12 h Licht- und 12 h Dunkel-Rhythmus gehalten und zwei Stunden vor Ende des Lichtzyklus getötet. Milzen und inguinale Lymphknoten dieser entrainierten Tiere wurden entnommen. Stücke der Milz und intakte Lymphknoten wurden unter konstanten Bedingungen kultiviert. Die Versuche und Datenaufnahmen erfolgten in Kooperation mit Dr. Ute Abraham an der Washington University in St. Louis, USA.

In den Abbildung 5-4 A und B sind Biolumineszenzdaten von Milz- und Lymphknoten-explantaten von *PER2::LUC*-Mäusen dargestellt. Bei beiden Geweben konnte eine circadiane Oszillation für mehr als sieben Tage unter konstanten Kulturbedingungen aufgenommen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Biolumineszenzdaten der *Per1::Luc*-Ratte, auch hier konnten bei der Milz und den Lymphknoten Rhythmen noch nach sechs Tagen gemessen werden (Abbildung 5-4 C und D). Damit konnte gezeigt werden, dass Organe des Immunsystems eine gewebeautonome Uhr besitzen, die nicht von systemischen Modulatoren getrieben wird.

Weiterhin wurden Peritonealmakrophagen von *PER2::LUC*-Mäusen und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von *Per1::Luc*-Ratten untersucht, um zu zeigen, dass auch einzelne primäre Immunzellen eine unabhängige circadiane Oszillation aufweisen. Da sich in den Milz- und Lymphknotenexplantaten teilweise auch Fibroblasten befinden, sollte mit diesem Versuchsansatz ausgeschlossen werden, dass solche Zellen für die Oszillation in Abbildung 5-1 verantwortlich sind.

Für diese Fragestellung wurden transgene Ratten und Knock-in-Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und 2 h vor Ende des Lichtzyklus getötet. Die Peritonealmakrophagen wurden durch eine Peritoneallavage von *PER2::LUC*-Mäusen gewonnen, die PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation des Blutes von *Per1::Luc*-Ratten. Die Zellen wurden in konstanten Bedingungen kultiviert und die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Abbildung 5-5 A zeigt die Lichtemission von peritonealen Makrophagen für mehr als sieben Tage, wobei eine circadiane Oszillation zu erkennen ist. Auch die PBMCs (Abbildung 5-5 B) zeigen eine circadiane Oszillation der Biolumineszenz, obwohl die Rhythmik dieser Zellen schneller ausdämpft. Ein Grund dafür könnte sein, dass die PBMCs in Kultur schneller absterben.



**Abbildung 5-5:** Ein autonomer Oszillator existiert in Immunzellpopulationen. Peritoneale Makrophagen (A) von PER2::LUC knock-in Mäusen wurden durch eine Peritoneallavage gewonnen. PBMCs (B) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von *Per1::Luc* transgenen Ratten gewonnen. Die Zellen wurden in luziferinhaltigem Medium kultiviert. Die Biolumineszenz wurde für mehrere Tage aufgenommen. Die Abbildungen zeigen trendeliminierte Daten, die repräsentativ für Aufnahmen von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Ute Abraham durchgeführt.

Mit diesen Methoden konnte gezeigt werden, dass auch die Zellen des Immunsystems (Peritonealmakrophagen und PBMCs) eine autonome circadiane Uhr besitzen. Die circadianen Eigenschaften sind weder an den Gewebeverband gebunden, noch handelt es sich um Fibroblasten, die die Rhythmik in den Immunorganen erzeugen.

## 5.3 Gesamtzellzahl und Zell-Zusammensetzung in der Milz

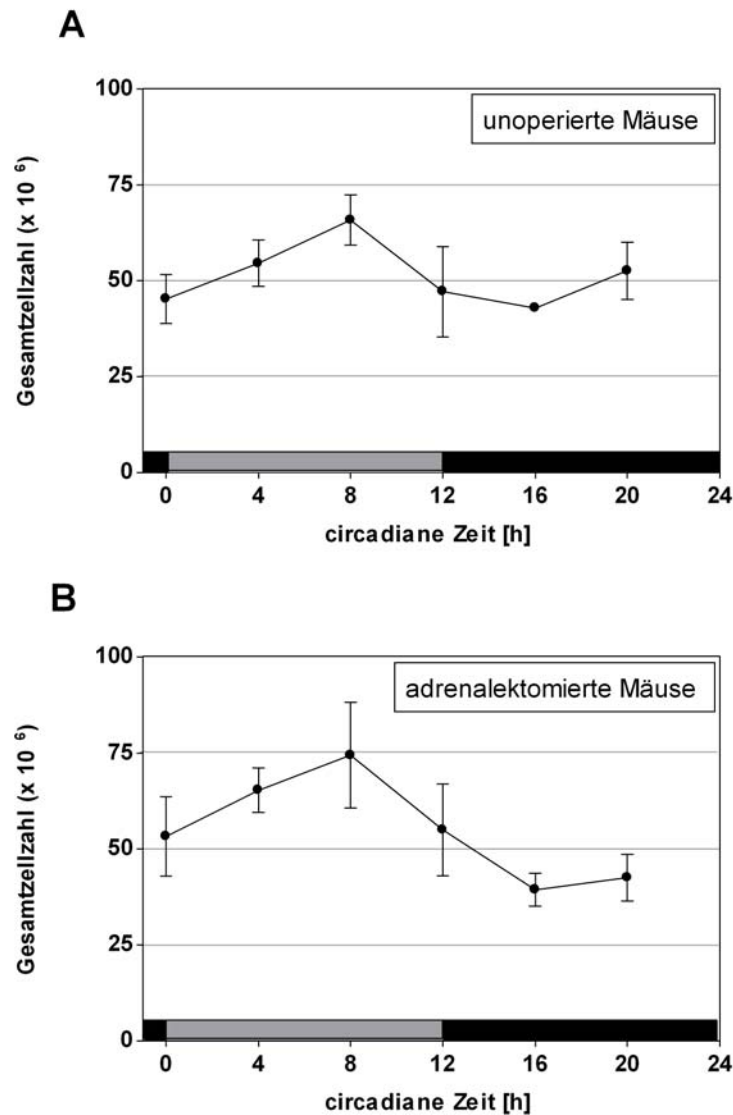
In verschiedenen Arbeiten wurde bereits unter Licht-Dunkel-Bedingungen eine tageszeitliche Variation der Zellzahl und einzelner Immunpopulationen im humanen sowie murinen Blut als auch in der Milz von Mäusen beschrieben [2,96,192]. Ob diese Variation der Zellzahl aber ohne externe Zeitgeber wie Licht erhalten bleibt, also von der circadianen Uhr reguliert wird, ist noch nicht beschrieben worden. Deshalb wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Gesamtzellzahl und einzelne Immunpopulationen wie Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen unter circadianen Bedingungen untersucht. Zusätzlich wurde eine mögliche Rolle von Kortisol als Taktgeber bei der Regulation der Anzahl von zirkulierenden Immunzellen in der Milz analysiert. Um dies zu untersuchen, wurden adrenaletomierte (adx) Mäuse verwendet.

Das Wissen über die circadiane Zellverteilung bzw. die Anzahl an Zellen in Immunkompartimenten unterstützt die Aufklärung von tageszeitlich unterschiedlichen Immunantworten.

### 5.3.1 Circadiane Variation der Gesamtzellzahl in der Milz

Für die Bestimmung der zeitlichen Variation der Gesamtzellzahl in der Milz wurden C57BL/6 Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und in konstante Dunkelheit überführt. Die Milzen wurden in einem Vier-Stunden-Intervall entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um den Einfluss von Kortisol auf die Gesamtzellzahl zu untersuchen, wurden zusätzlich adrenaletomierte Mäuse verwendet. Mit dem Programm CircWave wurde die Signifikanz der Oszillation und mit einer Two-Way-Anova-Analyse der Einfluss von Kortisol getestet.

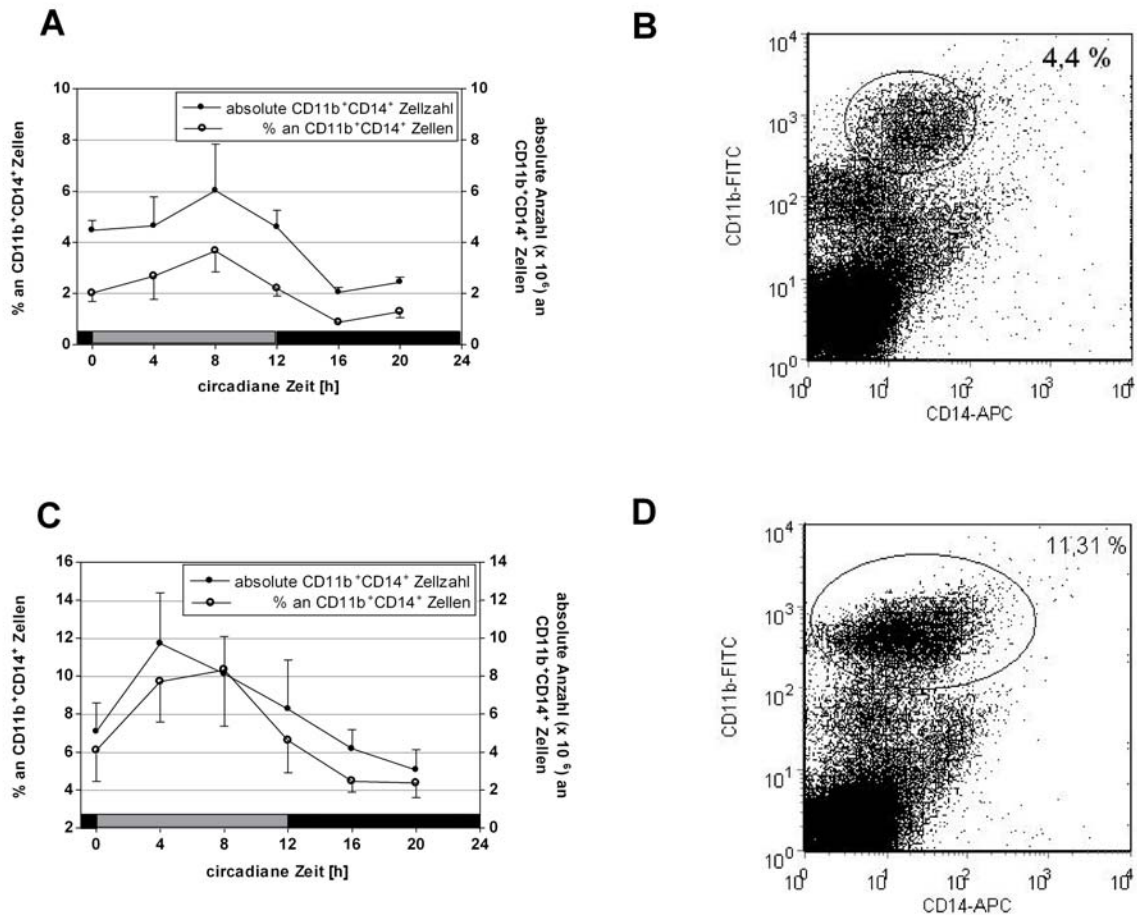
In Abbildung 5-6 ist die tageszeitliche Variation der Gesamtzellzahl von unbehandelten und adrenaletomierten Mäusen dargestellt. Die Gesamtzellzahl der Milzen schwankt dabei von 45 Millionen Zellen bis 65 Millionen Zellen in unoperierten Mäusen und von zirka 35 Millionen bis 75 Millionen Zellen in adrenaletomierten Mäusen. Damit unterliegt die Gesamtzellzahl in der Milz ungefähr einer Verdopplung von CT8 zu CT16. Zum Zeitpunkt CT8 des subjektiven Tages wird in beiden Milzkulturen eine maximale Zellzahl erreicht. Die Oszillation der Gesamtzellzahl ist allerdings nur bei adrenaletomierten Mäusen statistisch signifikant ( $p < 0,01$  bei adx Mäusen,  $p > 0,05$  bei nicht-operierten Mäusen). Ein möglicher Grund könnte der große Standardfehler bei den unoperierten Mäusen bei CT12 sein. Ein statistisch signifikanter Einfluss von Kortisol auf die Rhythmik konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0,4677$ ). Zusammenfassend konnte eine circadiane Variabilität der Gesamtzellzahl in der Milz festgestellt werden. Ein Einfluss von systemischen Kortisol ist nicht nachweisbar.



**Abbildung 5-6:** Die Gesamtzellzahl in der Milz unterliegt einer circadianen Oszillation. Primäre Milzzellen von unbehandelten (A) und von adrenalektomierten Mäusen (B) wurden in einem 4-Stunden-Intervall gewonnen, nachdem die Mäuse von einem Licht-Dunkel-Regime in konstante Dunkelheit überführt wurden. Die Gesamtzellzahl der Milz wurden mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt. Jeder Wert stellt den Mittelwert der Gesamtzellzahl aus vier bis fünf primären Milzzellkulturen  $\pm$  Standardfehler pro Zeitpunkt dar. Die grauen und schwarzen Balken zeigen den vorangegangenen Licht-Dunkel-Rhythmus. Die Gesamtzellzahl über die Zeit wurde mit dem Programm CircWave analysiert, wobei sich die Oszillation der Gesamtzellzahl der adrenalektomierten Mäuse als statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) erwies.

### 5.3.2 Circadiane Variation der CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Population in der Milz

Die circadiane Oszillation in der Gesamtzellzahl legt nahe, dass auch einzelne Immunpopulationen innerhalb der Milz einer Oszillation unterworfen sind.



**Abbildung 5-7:** CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen (Makrophagen) oszillieren sowohl in ihrem relativen Anteil in der Milz als auch in ihrer absoluten Anzahl. Unoperierte Mäuse (A und B) und adrenalectomierte Mäuse (C und D) wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Aus den entnommenen Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aliquots von Zellen wurden mit einem FITC-konjugierten anti-CD11b-Antikörper und einem APC-konjugierten anti-CD14-Antikörper angefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. In den Abbildungen B und D sind repräsentative Dot Plots dieser Analyse von CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen dargestellt. Die relative Zellzahl von CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen (rundes Gate in Abbildung B und D) wurde graphisch in Abbildung A und C (—●—) dargestellt. Die absolute Zahl der Makrophagen (—○— in Abbildung A und C) in der Milz wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl errechnet. Die Abbildungen A und C repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler von CD11b/CD14 doppelt positiven Zellen (n = 4 - 5). Die relative und absolute Anzahl der Makrophagen über die Zeit wurde mit dem Programm CircWave analysiert, wobei alle Oszillationen von unbehandelten und adrenalectomierten Mäusen statistisch signifikant (p < 0,05) sind. Die grauen und schwarzen Balken geben den vorangegangenen Licht-Dunkel-Rhythmus wieder.

Verschiedene Zellpopulationen wurden auf ihren prozentualen Anteil und ihre absolute Zellzahl in Bezug auf die Gesamtzellzahl untersucht. Gleichzeitig wurde analysiert, ob Kortisol eine regulatorische Funktion auf die Oszillation ausübt. Für letzteres wurden adrenaletomierte Mäuse verwendet.

Für die Bestimmung der Zellzahl von CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen (Makrophagen) wurden unbehandelte und adrenaletomierte Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. In einem 4-Stunden-Intervall wurden die Milzen entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für die Detektion der Makrophagen wurden die Zellen mit einem anti-CD11b-Antikörper und einem anti-CD14-Antikörper gefärbt. Die markierten Zellen wurden im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des FCSEXpress Programms. Die CD11b/CD14 doppelt positiven Zellen wurden durch ein Analysefenster eingegrenzt und so deren relativer Anteil an den Gesamtzellen ermittelt. Die absolute Makrophagen-Zahl wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl der Milz bestimmt. Mit dem Programm CircWave wurden die Signifikanzen der Oszillationen getestet. Mit der Two-way-Anova wurde der Einfluss von Kortisol untersucht.

In den Abbildung 5-7 A und C sind die zeitlichen Variationen von CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen in unoperierten und in adrenaletomierten Mäusen sowohl von ihrer absoluten Zahl als auch von ihrer relativen Zahl dargestellt. Abbildung 5-7 B und D stellen repräsentative Dot Plots dar, auf denen das begrenzende Analysefenster für CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen sichtbar ist. Zellen innerhalb dieses Fensters wurden für die Bestimmung der relativen Zellzahl herangezogen. Die absoluten Zellzahlen der Makrophagen wurden mit Hilfe der Gesamtzellzahl (Abbildung 5-6) ermittelt. Die Oszillationen der relativen Zellzahl von CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen sowie die absolute Zellzahl sind in unoperierten und in adrenaletomierten Mäusen statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Somit ist die Oszillation der Makrophagenzahl nicht von Kortisol abhängig. Sie besteht unabhängig von diesem Immunmediator. Die relativen Zellzahlen der Makrophagen in der Milz schwanken in operierten Mäusen von zirka zwei bis sechs Prozent, wobei das Maximum bei CT8 und das Minimum bei CT16 erreicht wurde. In adrenaletomierten Mäusen schwankt diese Oszillation mit einer höheren Amplitude von drei bis zwölf Prozent. Das Maximum verschiebt sich bei der relativen Zellzahl bei adrenaletomierten Mäusen auf CT4. Das Maximum der absoluten Zellzahl wird bei CT8 erreicht. Ein Einfluss von Kortisol konnte zwar nicht auf die Oszillation, aber auf die Zellzahl an sich festgestellt werden ( $p < 0,0001$  für die relative Zahlzahl,  $p < 0,001$  für die absolute Zellzahl), da sich in den adrenaletomierten Mäusen die relativen und die absoluten Zellzahlen ungefähr verdoppeln. Die circadianen Oszillationen von CD14<sup>+</sup>- und CD11b<sup>+</sup>-Zellen allein sind in der Phase identisch mit der in CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-Zellen (Daten sind nicht gezeigt).



Die Ergebnisse zeigen circadiane Oszillationen der Makrophagenzahl über die Zeit, sowohl in adrenaletomierten als auch in unbehandelten Mäusen. Ein Einfluss von Kortisol konnte nur auf die Zellzahl aber nicht auf die circadiane Oszillation festgestellt werden.

### 5.3.3 Circadiane Variation der CD19<sup>+</sup>-Population in der Milz

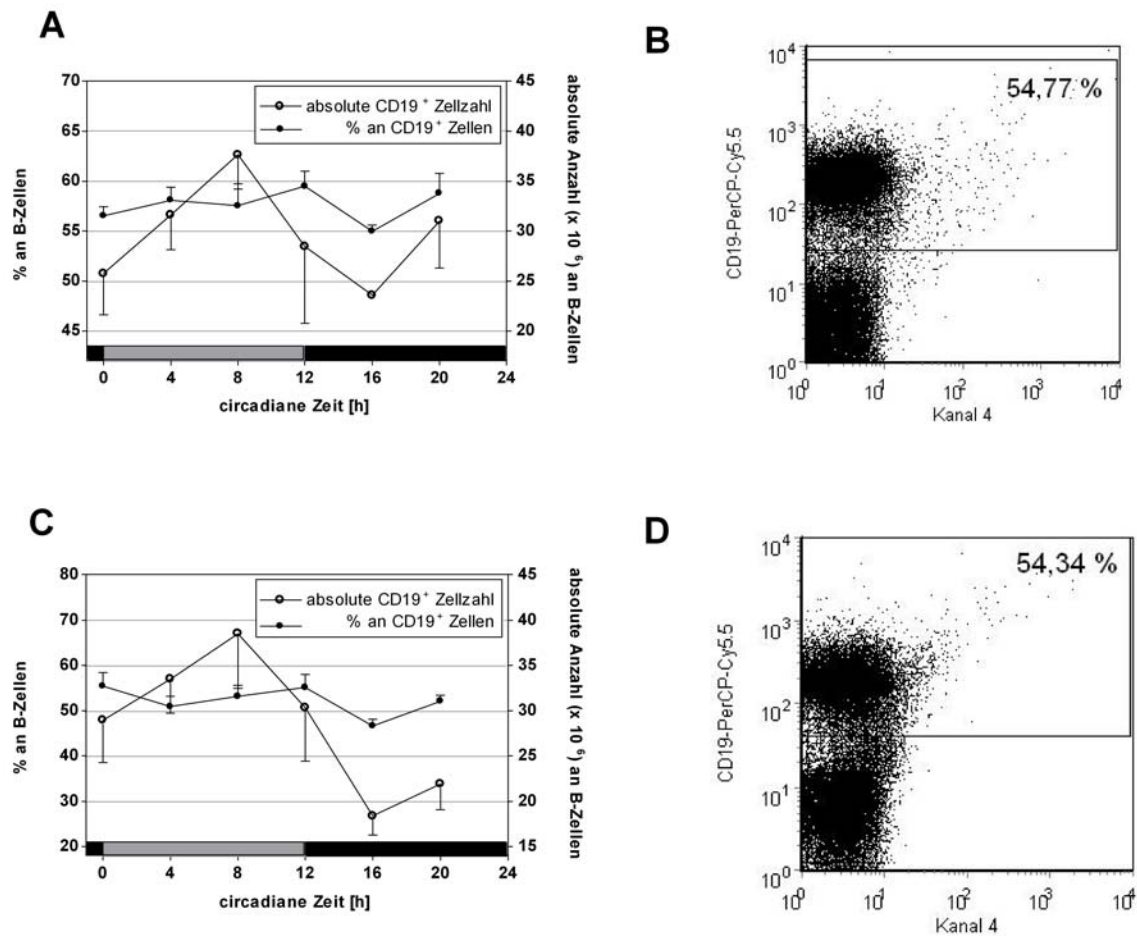
Für die Zellzahl-Bestimmung von CD19-positiven Zellen (B-Zellen) wurden unbehandelte und adrenaletomierte Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und in konstante Dunkelheit überführt. Deren Milzen wurden in einem 4-Stunden-Intervall entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für die Bestimmung der Anzahl an B-Zellen wurden die Zellen mit einem anti-CD19-Antikörper gefärbt. Die markierten Zellen wurden im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des FCSEXpress Programms. Die CD19<sup>+</sup>-Zellen wurden durch ein Analysefenster begrenzt und so deren relativer Anteil an den Gesamtzellen ermittelt. Die absolute Zellzahl an B-Zellen wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl der Milz bestimmt. Mit dem Programm CircWave wurden die Signifikanzen der Oszillationen und mit Two-Way-Anova der Einfluss von Kortisol untersucht.

In Abbildung 5-8 A und C sind die zeitlichen Variationen von CD19-positiven Zellen in unoperierten und in adrenaletomierten Mäusen sowohl von ihrer absoluten Zahl als auch von ihrem relativen Anteil dargestellt. Abbildung 5-8 B und D stellen repräsentative Dot Plots dar, die die Analysefenster für CD19-positiv Zellen sichtbar machen. Mit diesem Gate wurde die relative Zellzahl ermittelt. Die absoluten Zellzahlen der B-Zellen wurden mit Hilfe der Gesamtzellzahl (Abbildung 5-6) ermittelt.

In der Milz oszillieren CD19<sup>+</sup>-Zellen in ihrer absoluten Zellzahl, aber nicht in ihrem relativen Anteil. Dabei ist nur die Oszillation der absoluten Zellzahl in adrenaletomierten Mäusen statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ), obwohl auch bei den unbehandelten Mäusen eine Oszillation dieser Zellen zu erkennen ist. Somit hat Kortisol keinen Einfluss auf das Oszillationsverhalten in B-Zellen. Im Gegenteil, die Oszillation der absoluten Zellzahl wird durch den Wegfall von Kortisol noch statistisch signifikanter. Die absolute Menge an B-Zellen ist am subjektiven Tag zum Zeitpunkt CT8 am höchsten und beträgt dann zirka 37 Millionen Zellen. Bei CT16 besitzt die Milz ihre geringste Anzahl an B-Zellen sowohl in unoperierten also auch in adrenaletomierten Mäusen, die dann nur noch 24 Millionen bzw. 18 Millionen Zellen betragen. Die relative Zellzahl bleibt über den gesamten Zeitraum konstant bei 55 bis 60 Prozent in unbehandelten Mäusen bzw. bei 50 bis 60 Prozent in adrenaletomierten Mäusen.

Ein statistisch signifikanter Einfluss von Kortisol konnte bei der relativen Zellzahl der B-Zellen ( $p < 0,0001$ ) festgestellt werden. Der relative Anteil an B-Zellen in der Milz nimmt in adrenaletomierten Mäusen leicht ab. Im Gegensatz dazu, hat Kortisol keine Einfluss auf die

absolute Zellzahl ( $p = 0,6944$ ). Kortisol hat damit nur einen regulatorischen Effekt auf die relative Anzahl der B-Zellen.



**Abbildung 5-8:** CD19<sup>+</sup>-Zellen (B-Zellen) oszillieren in ihrer absoluten Zellzahl in der Milz, jedoch nicht in ihrer relativen Anzahl. Unbehandelte Mäuse (A) und adrenaletomierte Mäuse (C) wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Über den circadianen Tag verteilt, wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aliquots von Zellen wurden mit dem PerCP-Cy5.5-konjugierten anti-CD19-Antikörper markiert. Die Zellpopulation von CD19<sup>+</sup>-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (rechteckiges Gate in Abbildung B und D), woraus die relative Anzahl der B-Zellen (—●—) aus der Milz ermittelt wurde. Repräsentativ für die Analyse sind in Abbildung B und D Dot Plots dargestellt. Die absolute Anzahl der CD19<sup>+</sup>-Zellen (—○— in Abbildung A und C) aus der Milz wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl errechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der relativen und absoluten Anzahl an B-Zellen aus der Milz ( $n = 4 - 5$ ). Die Daten wurden mit dem Programm CircWave analysiert, wobei sich nur die Oszillation der absoluten Werte der CD19<sup>+</sup>-Zellen von adrenaletomierten Mäusen als statistisch signifikant erwies ( $p < 0,005$ ). Die grauen und schwarzen Balken geben den vorangegangenen Licht-Dunkel-Rhythmus wieder.

Da die absolute Zellzahl an B-Zellen in der Milz variiert, der relative Anteil aber konstant bleibt, müssen die Zellen tageszeitlich unterschiedlich stark in die Milz einwandern und herauswandern. Das Maximum der absoluten Zellzahl korreliert dabei mit dem Maximum der Gesamtzellzahl. Das heißt, dass das Maximum der Gesamtzellzahl von der erhöhten Anzahl an B-Zellen verursacht werden könnte, da sie den größten Anteil in der Milz haben.

### 5.3.4 Circadiane Variation der CD90.2<sup>+</sup>-Population in der Milz

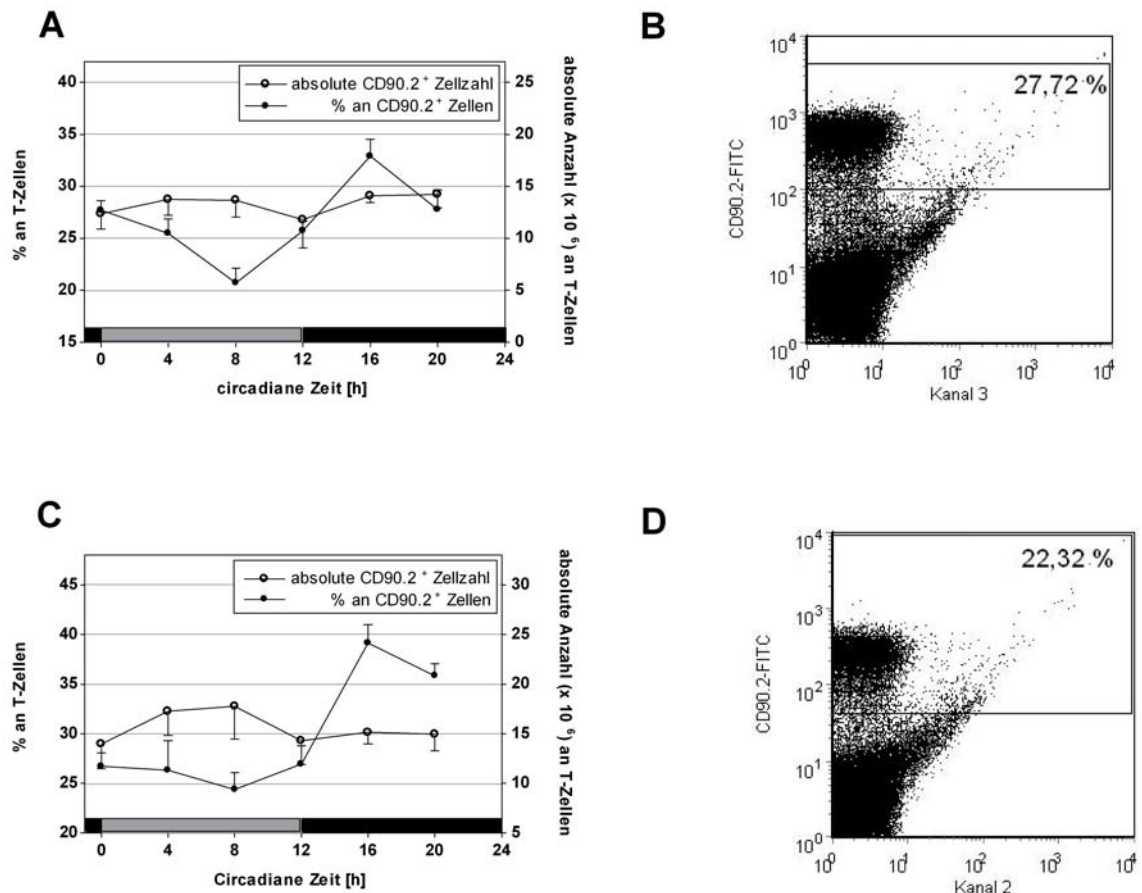
Für die Untersuchung von CD90.2-positiven Zellen (T-Zellen) wurden unoperierte und adrenaletomierte Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und in konstante Dunkelheit überführt. In einem 4-Stunden-Intervall wurden die Milzen entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für die Bestimmung der T-Zellen wurden die Zellen mit einem anti-CD90.2-Antikörper gefärbt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die markierten Zellen im FACSCalibur analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des FCSEXpress Programms. Mit einem Analysefenster wurde die CD90.2-positiven Zellen begrenzt und so deren relativer Anteil an den Gesamtzellen ermittelt. Die absolute Zellzahl an T-Zellen wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl der Milz bestimmt. Mit dem Programm CircWave wurden die Signifikanzen der Oszillationen bestimmt. Der Einfluss von Kortisol wurde mit der Two-Way Anova-Analyse getestet.

In Abbildung 5-9 A und C sind die Variationen der T-Zellen in ihrer absoluten Zahl als auch in ihrem relativen Anteil dargestellt. Abbildung 5-9 B und D zeigen repräsentative Dot Plots mit den jeweiligen Analysefenstern, mit denen der relative Anteil an T-Zellen in der Milz ermittelt werden konnte. Die absoluten Zellzahlen der T-Zellen wurden mit Hilfe der Gesamtzellzahl (Abbildung 5-6) errechnet.

CD90.2<sup>+</sup>-Zellen oszillieren statistisch signifikant in ihrer relativen Anzahl in der Milz ( $p < 0,01$  bei unbehandelten Mäusen und  $p < 0,05$  bei adrenaletomierten Mäusen), aber nicht in ihrer absoluten Zahl. Kortisol hat keinen regulatorischen Einfluss auf das Oszillationsverhalten von T-Zellen in der Milz. Die maximale relative Zellzahl wird in beiden Mäusegruppen bei CT16 und die minimale bei CT8 erreicht. Zu diesen Zeitpunkten besitzt die Milz 20 bzw. 25 Prozent (CT8) und 37 bzw. 39 Prozent (CT16) an T-Zellen. Die absolute Zellzahl schwankt bei den unoperierten Mäusen von 12 bis 15 Millionen Zellen und bei adrenaletomierten Mäusen von 14 bis 17 Millionen Zellen. Diese Schwankung unterliegt aber keiner Oszillation.

Auch wenn Kortisol keinen Einfluss auf das Oszillationsverhalten an sich von T-Zellen besitzt, so besteht doch ein statistisch signifikanter Einfluss auf die relative Zahl der T-Zellen

( $p < 0,005$ ), die nach der Adrenalectomie höher sind. Keinen Einfluss hat Kortisol auf die absolute Zellzahl ( $p > 0,05$ ) der T-Zellen in der Milz.



**Abbildung 5-9:** CD90.2<sup>+</sup>-Zellen (T-Zellen) oszillieren in ihrer relativen Zellzahl in der Milz, jedoch nicht in ihrer absoluten Anzahl. Unbehandelte (A) und adrenalectomierte Mäuse (C) wurden in eine 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Aliquots von Zellen wurden mit dem FITC-konjugierten anti-CD90.2-Antikörper angefärbt. Die Zellpopulation der T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (rechteckige Umrandung in Abbildung B und D). Daraus wurde die relative Zahl der CD90.2-positiven Zellen (—●—) in der Milz ermittelt. Abbildungen B und D sind repräsentative Dot Plots. Die absolute Zahl der CD90.2<sup>+</sup>-Zellen (—○— in Abbildung A und C) in der Milz wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl errechnet. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der relativen und absoluten Anzahl von T-Zellen in der Milz ( $n = 4 - 5$ ). Die Oszillationen wurden mit dem Programm CircWave analysiert, wobei sich nur die relative Anzahl der T-Zellen, sowohl in unbehandelten als auch in adrenalectomierten Mäusen, als statistisch signifikant erwiesen. Die grauen und schwarzen Balken geben den vorangegangenen Licht-Dunkel-Rhythmus wieder.

T-Zellen oszillieren in ihrem relativen Anteil aber nicht in ihrer absoluten Zahl in der Milz. Diese Variation der relativen Zellzahl kann durch die Oszillation der Gesamtzellzahl in der Milz begründet werden.

## 5.4 Stimulation von Immunzellen

Im Immunsystem konnte eine circadiane Uhr nachgewiesen werden. Nun stellt sich die Frage, ob diese Uhr für spezifische Funktionen im Immunsystem verantwortlich ist, wie z. B. für die Zytokinantwort auf Stimulatoren wie LPS oder Concanavalin A.

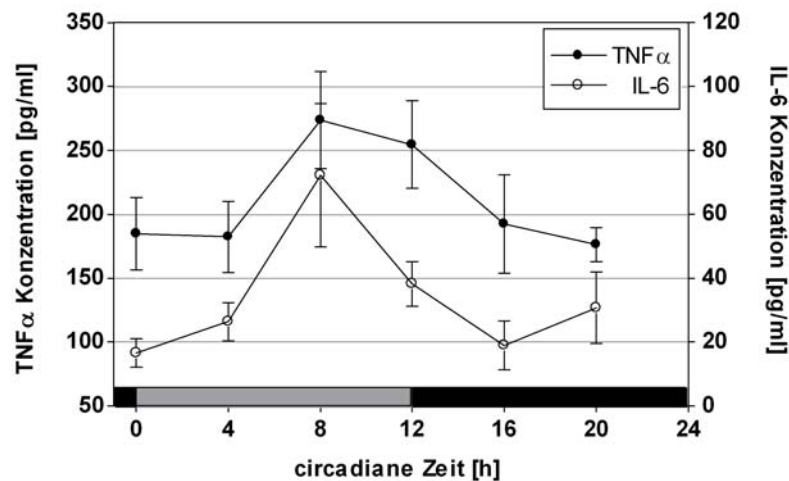
Halberg *et al.* [76] konnten schon 1960 zeigen, dass die Tageszeit eine Rolle in der Immunantwort auf einen Stimulus spielt. In dieser Veröffentlichung wurde dargestellt, dass eine Stimulation mit LPS zu unterschiedlichen Tageszeiten eine Veränderung der Sterberate der Mäuse bewirkt. Die zugrunde liegenden molekularen Details waren damals noch völlig unklar. Zytokine, die bei der ersten Immunreaktion eine Rolle spielen, sind unter anderem  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6.  $\text{TNF}\alpha$  ist neben anderen Zytokinen für den septischen Schock, das anschließende Multiorganversagen und damit für den Tod der Tiere verantwortlich. Neben  $\text{TNF}\alpha$  wird auch IL-6 bei einer Immunantwort auf spezifische mikrobielle Moleküle von Makrophagen/Monozyten sekretiert. Bei den nachfolgenden Experimenten wurden Reagenzien benutzt, die möglichst nur eine Zellpopulation innerhalb der Milzzellen stimulieren. Für Makrophagen wurde LPS ausgewählt, weil bereits nach einer kurzen Inkubation mit LPS  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 im Zellkulturüberstand nachweisbar sind. Das verwendete LPS ist spezifisch für den Toll-like-Rezeptor 4, der hauptsächlich auf Makrophagen exprimiert wird. Deshalb wurde bei den Experimenten mit LPS die circadiane Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 untersucht:

1. Stimulation von Makrophagen in einer primären Milzzellkultur
2. Stimulation von Peritonealmakrophagen

Bei der Stimulation mit Concanavalin A (Con A) werden hauptsächlich T-Zellen stimuliert. Con A aktiviert T-Zellen durch die Bindung an zellmembranständige Glykoproteine, einschließlich des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes. Die T-Zellen sekretieren daraufhin  $\text{IFN}\gamma$ . Dieser Prozess der Stimulation dauert mindestens 24 Stunden oder länger, da Zellen des adaptiven Immunsystems stimuliert werden.

### 5.4.1 Circadiane $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Sekretion von primären Milzzellen nach LPS-Stimulation

C57BL/6 Mäuse wurden zwei Wochen in einem 12 h Licht- und 12 h Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit entlassen, um zu testen, ob die Sekretion von LPS-induzierten Zytokinen in primären Milzzellen von der circadianen Uhr reguliert wird. Die Milzen wurden in einem 4-Stunden-Intervall über den circadianen Tag verteilt entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Anschließend erfolgte eine vierstündige LPS-Stimulation der primären Suspensionskultur. In den Zellkulturüberständen wurden  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 mittels Elisa gemessen. Die Signifikanz der Oszillation der sekretierten Zytokine wurde mit dem Programm CircWave bestimmt.



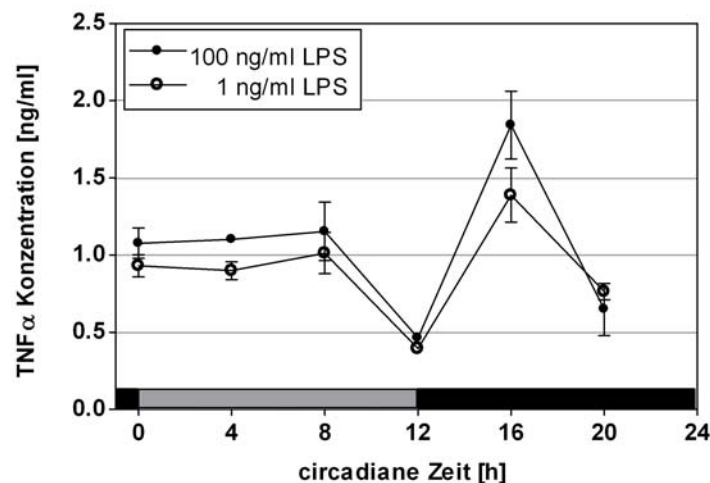
**Abbildung 5-10:**  $\text{TNF}\alpha$  (—●—) und IL-6 (—○—) werden von primären Milzzellen nach LPS-Stimulation circadian sekretiert. Nach Transfer der Mäuse von einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus in konstante Dunkelheit wurden alle vier Stunden die Milzen entnommen. Die primären Zellen der Milz wurden mit LPS stimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde für die Detektion der Zytokine verwendet. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der sekretierten Zytokine aus Zellkulturüberständen von vier bis fünf verschiedenen primären Milzkulturen pro Zeitpunkt. Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorausgegangenen Licht-Dunkel-Zyklus der Mäuse. Die Sekretion der Zytokine wurde mit dem Programm CircWave ausgewertet und beide Zytokine erwiesen sich als statistisch signifikant ( $p < 0,05$  für  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6).

Abbildung 5-10 stellt die tageszeitlich unterschiedliche Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 nach LPS-Stimulation von primären Milzzellen dar. Beide Zytokine zeigen eine statistisch signifikant circadiane Oszillation in ihren Sekretionsmustern ( $p < 0,05$ ). Dabei steigen beide Zytokine in der ersten Hälfte des subjektiven Tages an und erreichen zwischen CT8 - 12 ihre

Maxima. Danach fallen beide Kurven wieder um das 2 – 3fache auf ihr vorheriges Level ab. Da beide Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 von primären Milzzellen nach Stimulation circadian sekretiert werden, konnte der Beweis erbracht werden, dass es circadiane Funktionen im Immunsystem gibt.

#### 5.4.2 Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ von Peritonealmakrophagen nach LPS-Stimulation

Für die Untermauerung der Ergebnisse, dass hauptsächlich Makrophagen für die in Abbildung 5-10 zuvor gezeigten Zytokin-Rhythmen verantwortlich sind, wurden Peritonealmakrophagen mit LPS stimuliert. C57BL/6 Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und dann in konstante Dunkelheit überführt. Die Peritonealmakrophagen wurden zu verschiedenen circadianen Zeitpunkten durch Peritoneallavage gewonnen. Die Makrophagen adhärirten während einer kurzen Inkubationszeit von 45 min. Anschließend erfolgte die Stimulation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an LPS (100 ng/ml, 1 ng/ml) über 4 h. Im Zellkulturüberstand wurde anschließend die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration durch Elisa bestimmt.



**Abbildung 5-11:**  $\text{TNF}\alpha$  wird von peritonealen Makrophagen nach LPS-Stimulation nicht signifikant circadian sekretiert. Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten, bevor sie in konstante Dunkelheit entlassen wurden. Zu unterschiedlichen circadianen Zeitpunkten wurden peritoneale Makrophagen durch Waschen des Bauchraums gewonnen. Die primären Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an LPS (● 100 ng/ml, ○ 1 ng/ml) 4 h stimuliert. Der Überstand wurde für die Detektion von  $\text{TNF}\alpha$  verwendet. Die Abbildung zeigt pro Zeitpunkt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler an  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen von stimulierten, peritonealen Makrophagen ( $n = 3$ ). Die  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion der peritonealen Makrophagen wurde mit dem Programm CircWave analysiert und ergab keine statistische Signifikanz. Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorangegangenen Licht-Dunkel-Zyklus.

In Abbildung 5-11 ist die Sekretion an  $\text{TNF}\alpha$  von stimulierten Peritonealmakrophagen in einem Zeitraum von 24 h gezeigt. Es liegt keine statistisch signifikant circadiane Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  vor. Auf eine Messung von IL-6 wurde verzichtet, da bereits bei der  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion keine circadiane Oszillation zu erkennen war.

Die fehlende Rhythmik der Zytokinsekretion kann mit der schwierigen Zellgewinnung zusammen hängen, bei der eine Verunreinigung durch andere Zellen (z. B. Mastzellen, die  $\text{TNF}\alpha$  in Vesikeln bevorraten) möglich ist. Mit Hilfe des Mikroskops ist es jedoch nicht möglich diese „falschen“ Zellen von den Peritonealmakrophagen zu unterscheiden. Dadurch wurde eventuell eine falsche Makrophagenzahl bestimmt und damit eine falsche Zellkonzentration an Makrophagen angenommen. Letztendlich befanden sich wahrscheinlich nicht in jeden Well die gleiche Anzahl an Makropagen wie erwünscht. Mit einer Normalisierung der Zytokinwerte auf die tatsächliche Anzahl der Makrophagen würde dieser Fehler ausgeglichen werden können. Adhärierte Makrophagen lassen sich aber sehr schlecht von der Zellkulturschale ablösen, deshalb war eine nachträgliche Normalisierung auf die „echte“ Zellzahl nicht durchführbar. Eine Normalisierung auf durchflusszytometrische Daten, nach einer Färbung eines Aliquots mit FITC-gekoppelten anti-CD11b-Antikörpern, brachte keine Veränderung der Kurve. Zusätzlich wurde versucht, auf den Proteingehalt der adhärenierten Zellen zu normalisieren. Auch diese Auswertung brachte keine Veränderung der Kurve. Eine eindeutige Aussage über das circadiane Sekretionsverhalten von Peritonealmakrophagen kann mit den hier verwendeten Methoden nicht gemacht werden. Für eine Klärung würde eine einheitlich „reine“ Population von Makrophagen Abhilfe schaffen.

### 5.4.3 $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach Stimulation mit Concanavalin A

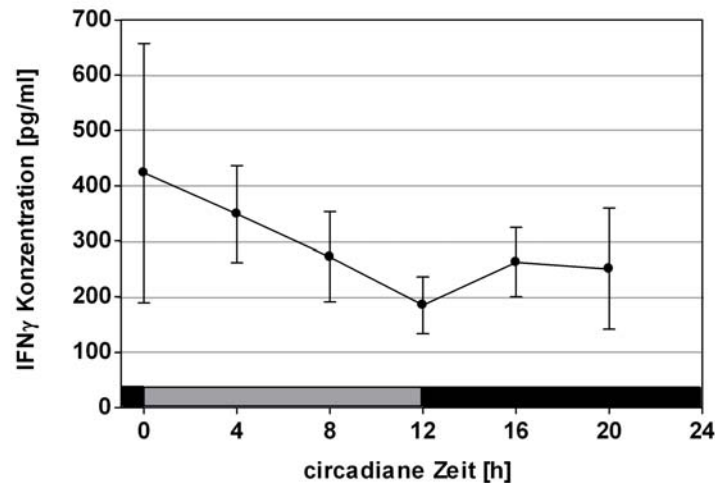
Primäre Milzzellen wurden mit dem T-Zell-spezifischen Mitogen Concanavalin A behandelt, um zu testen, ob auch T-Zellen nach einer Stimulation Zytokine circadian sekretieren.

Dafür wurden C57BL/6 Mäuse zwei Wochen in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und dann in konstante Dunkelheit entlassen. Die Milzen dieser Mäuse wurden in einem 4-Stunden-Intervall über den circadianen Tag verteilt entnommen. Die primäre Milzkultur wurde anschließend 24 h mit Concanavalin A (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert. Die Konzentration des sekretierten  $\text{IFN}\gamma$  wurde in den Zellkulturüberständen mittels Elisa bestimmt. Die Signifikanz der Oszillation wurde mit Hilfe des CircWave Programms getestet.

Die Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$ , dargestellt in Abbildung 5-12 ist statistisch nicht signifikant. Dennoch ist ein tageszeitlicher Rhythmus im Kurvenverlauf zu erkennen. Da der Standardfehler bei CT0 aber sehr groß ist, erkennt das Statistikprogramm CircWave möglicherweise keinen Rhythmus mehr. Eine andere mögliche Ursache für das Fehlen des Rhythmus könnte die lange



Stimulation der Zellen mit dem Mitogen sein. Rhythmen werden damit vielleicht maskiert. Eine 24stündige Stimulation war aber notwendig, da zu einem früheren Zeitpunkt kein  $\text{IFN}\gamma$  im Zellkulturüberstand nachweisbar war. Zusammenfassend kann keine eindeutige Aussage über das circadiane Sekretionsverhalten von T-Zellen aus der Milz gemacht werden.



**Abbildung 5-12:** Die Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$  nach Stimulation mit Concanavalin A von primären Milzzellen unterliegt keiner signifikanten circadianen Oszillation. Nach dem Transfer der Mäuse von einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus in konstante Dunkelheit wurden alle 4 h Milzen entnommen. Die primären Zellen wurden mit dem T-Zell-Stimulans Concanavalin A für 24 h inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde für die Detektion von  $\text{IFN}\gamma$  im Elisa verwendet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen im Überstand von stimulierten, primären Milzkulturen ( $n = 4 - 5$ ). Die Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$  über die Zeit wurde mit dem Programm CircWave analysiert und ist statistisch nicht signifikant. Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorangegangenen Licht-Dunkel-Zyklus.

## 5.5 Abkopplung der Zellen von körpereigenen Signalen bei der Stimulation

Obwohl das Immunsystem eine gewebeautonome circadiane Uhr besitzt, könnten auch humorale systemische Faktoren die Outputmechanismen des Immunsystems beeinflussen oder steuern. Aus diesem Grund ist es von Interesse zu untersuchen, ob es bei einer teilweisen oder gänzlichen Abkopplung von körpereigenen Signalen weiterhin zu einer circadianen Sekretion der Zytokine kommt. Die Zellen können somit nicht mehr von systemischen humoralen Faktoren wie z. B. Kortisol oder Melatonin beeinflusst werden

Zur Beantwortung der Fragestellung, gab es verschiedene Herangehensweisen:

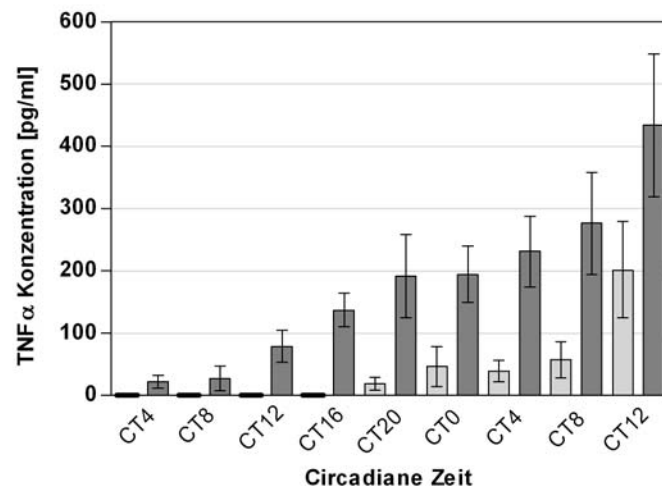
1. Stimulation primärer Makrophagen in einer Lang-Zeit-Milzzellkultur über 36 h
2. Stimulation primärer Milzzellen von adrenaletomierten Mäusen
3. Stimulation einer Immunzelllinie (RAW 264.7)

### 5.5.1 Stimulation einer primären Lang-Zeit-Milzzellkultur mit LPS

Als erstes wurde versucht, eine primäre Milzzellkultur zu unterschiedlichen circadianen Zeitpunkten mit LPS zu stimulieren. Durch die Kultivierung der Zellen *ex vivo* wurden systemische Zeitgeber vermieden. C57BL/6 Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und dann in konstante Dunkelheit überführt. Zum Zeitpunkt CT4 wurden die Milzen der Mäuse entnommen und eine primäre Milzzellkultur angelegt. Die Zellen wurden in 1 ml in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/Well in einer 48-Well-Platte ausgesät. Für eine Zeitreihe erfolgte die Stimulation mit LPS alle vier Stunden über einen Zeitraum von 36 Stunden, wobei je Zeitpunkt mindestens zwei Wells/Maus stimuliert wurden. Die Zellen wurden vier Stunden mit 5 µg/ml LPS stimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen, zentrifugiert und zur Bestimmung von  $\text{TNF}\alpha$  verwendet. Auf Grund des circadianen Verhaltens von Peritonealmakrophagen und PBMCs *ex vivo* wird angenommen, dass auch primäre Milzzellen unter konstanten Bedingungen ein circadianes Oszillationsverhalten aufweisen.

In Abbildung 5-13 sind die Ergebnisse der Stimulation mit LPS von einer Milzzellkultur dargestellt. Es existiert keine statistisch signifikant circadiane  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion von einer primären Lang-Zeit-Milzzellkultur. Jedoch ist zu erkennen, dass die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Laufe der Zeit immer mehr zunimmt, wobei eine leichte Rhythmik über die Zeit zu erkennen ist. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration nimmt bis CT20 zu, geht dann in ein kurzes Plateau über und steigt anschließend wieder an. Diese Rhythmik ist aber statistisch nicht signifikant. Die Zunahme der  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand ist mit der zunehmenden Reifung der Zellen, insbesondere der Makrophagen zu erklären. „Reifende“ Zellen produzieren mehr  $\text{TNF}\alpha$  pro Zelle. Eine eventuelle Rhythmik ist damit maskiert. Zusätzlich ist zu erkennen, dass auch die unstimulierten Zellen/Makrophagen  $\text{TNF}\alpha$  produzieren, was ebenfalls für eine zunehmende Reifung der Zellen spricht.

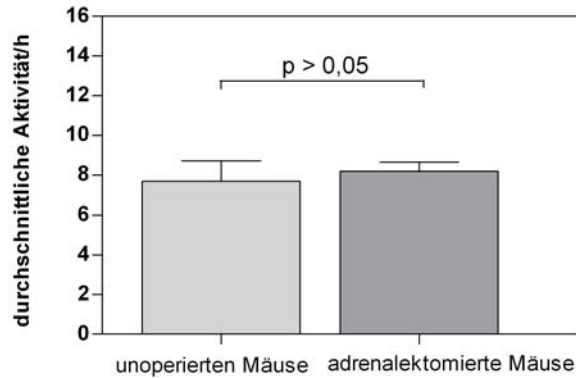
Eine eindeutige Aussage über eine systemische oder autonom circadian regulierte Sekretion von Zytokinen kann mit dieser Herangehensweise nicht getroffen werden.



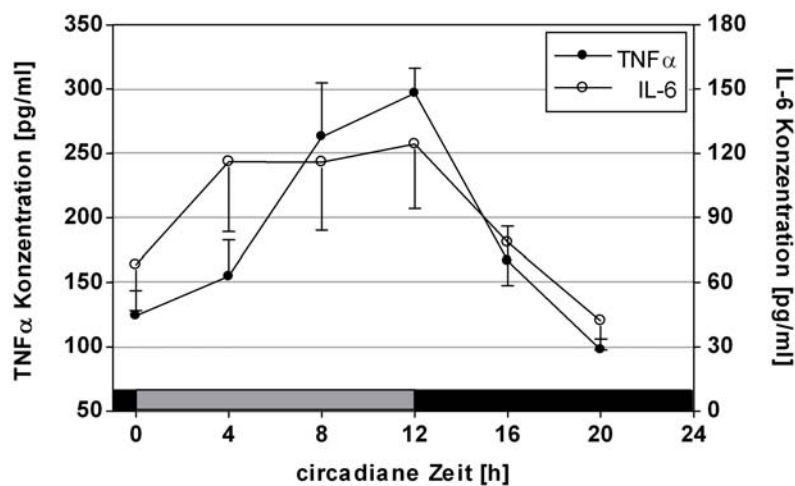
**Abbildung 5-13:**  $\text{TNF}\alpha$  wird nach LPS-Stimulation einer primären Milzzellkultur nicht signifikant circadian sekretiert. Die Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Zu CT4 wurden Milzen entnommen. Die primären Zellen wurden ausgesät und zu den angegebenen circadianen Zeiten 4 h mit LPS stimuliert. Der Überstand wurde zur Detektion von  $\text{TNF}\alpha$  im Elisa verwendet. Die hellgrauen Säulen stellen die unstimulierten und die dunkelgrauen, die mit LPS stimulierten Zellen dar. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehlern von  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen aus dem Zellkulturüberstand aus drei Kulturansätzen je Zeitpunkt. Die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  der stimulierten Zellen über die Zeit wurde mit dem Programm CircWave analysiert und ist statistisch nicht signifikant.

### 5.5.2 Circadiane $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation in adrenaletomierten Mäusen

Um zu testen, ob systemische Faktoren wie Glukokortikoide die circadianen Sekretionsmuster von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 nach Stimulation mit LPS beeinflussen, wurden adrenaletomierte Mäuse verwendet. In adrenaletomierten Mäusen ist Kortisol nicht mehr nachweisbar, da ihnen die Nebenniere entfernt wurde [36]. Diese Mäuse zeigen ein normales circadianes Laufradverhalten, das dem nicht-operierter Mäuse entspricht (Abbildung 5-14). Im Gegensatz dazu, wurde in anderen Arbeiten ein sehr verringertes Laufradverhalten bei adrenaletomierten Ratten und Hamstern beschrieben [5,110,125], das aber noch eine circadiane Rhythmik aufweist.



**Abbildung 5-14:** Im Laufradverhalten bestehen keine Unterschiede zwischen unoperierten und adrenalektomierten Mäusen. Von je zehn unoperierten und adrenalektomierten Mäusen wurde über 12 Tage das Laufradverhalten unter einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus aufgezeichnet und mittels Clocklab die durchschnittliche Aktivität bestimmt.



**Abbildung 5-15:** Ein Makrophagen-intrinsisches Uhrwerk reguliert die TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation. Die Milzen von adrenalektomierten Mäusen wurden alle vier Stunden entnommen, nachdem die Mäuse von einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus in konstante Dunkelheit überführt wurden. Dieses vorangegangene Lichtregime ist durch graue und schwarze Balken angezeigt. Die Primärzellen wurden vier Stunden mit LPS stimuliert und der Zellkulturüberstand wurde zur Messung von TNF $\alpha$  (—●—) und IL-6 (—○—) verwendet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand von stimulierten Milzkulturen ( $n = 4 - 5$ ). Durch CirWave Analyse konnte gezeigt werden, dass beide Zytokine circadian sekretiert werden ( $p < 0,01$  für TNF $\alpha$  und  $p < 0,05$  für IL-6).

Adrenalektomierte Mäuse wurden mindestens zwei Wochen in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Die Milzen der

Mäuse wurden in einem 4-Stunden-Intervall über den circadianen Tag verteilt entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden in Zellkultur-Reaktionsgefäßen verteilt und für 4 h mit LPS (5 µg/ml) stimuliert. Die TNF $\alpha$ - und IL-6-Sekretion in das Zellkulturmedium wurde im Elisa ermittelt. Die Signifikanz der Oszillation wurde mit dem Programm CircWave statistisch ermittelt. Der Einfluss von Kortisol auf das Sekretionsverhalten wurde mit dem statistischen Test der Two-Way-Anova bestimmt.

In Abbildung 5-15 ist die sekretierte TNF $\alpha$ - und IL-6-Menge pro ml von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen dargestellt. Wie auch bei der Stimulation primärer Milzzellen von unoperierten Mäusen ist eine statistisch signifikante Oszillation der Sekretion beider Zytokine zu erkennen ( $p < 0,01$  für TNF $\alpha$  und  $p < 0,05$  für IL-6). Die Maxima der Sekretion beider Zytokine liegen zwischen CT8-12 mit einem 3-fachen Unterschied zwischen Maximum und Minimum. Kortisol hat damit keinen Einfluss auf das circadiane Sekretionsverhalten von TNF $\alpha$  und IL-6 nach LPS-Stimulation. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass ein Makrophagen-intrinsisches Uhrwerk existiert, das die Zytokinsekretion reguliert. Eventuell könnte Kortisol eine Rolle bei der Phase der Sekretion zugesprochen werden, da sich das Maximum der sekretierten Zytokine um vier Stunden verschiebt.

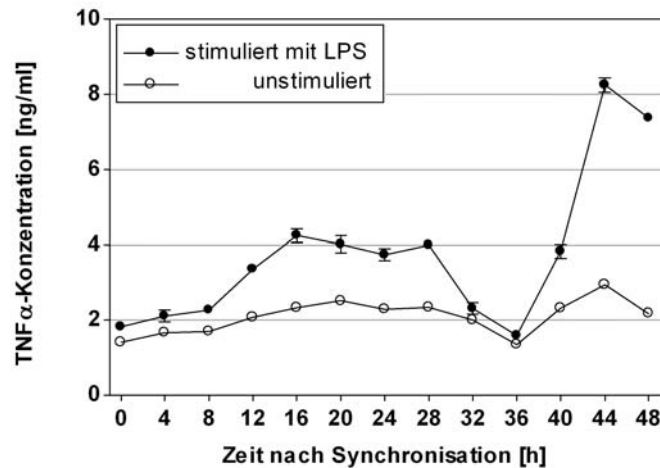
Kortisol hat aber einen Einfluss auf die Sekretionsmenge von IL-6 ( $p < 0,0001$ ). Im Vergleich zu unoperierten Mäusen ist sie bei adrenaletomierten Mäusen fast doppelt so hoch (Abbildung 5-10). Im Gegensatz dazu besitzt Kortisol keinen Einfluss auf die Sekretionsmenge von TNF $\alpha$  ( $p > 0,1$ ).

Zusammenfassend kann die Aussage betroffen werden, dass vermutlich ein Makrophagen-intrinsisches Uhrwerk die circadiane Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-6 reguliert. Auf jeden Fall kann Kortisol, als Immunmodulator, ausgeschlossen werden.

### **5.5.3 Circadiane Sekretion von TNF $\alpha$ nach Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS**

Um neben Kortisol, weitere systemische Faktoren auszuschließen, die eine circadiane Sekretion der Zytokine beeinflussen oder regulieren könnten, wurde versucht, die Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zu unterschiedlichen Zeiten mit LPS zu stimulieren. Diese Zellen besitzen eine circadiane Uhrgenexpression und durch die Art ihrer Kultivierung können systemische Zeitgeber ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden für diese Fragestellung in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit den Proliferationshemmern Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid (Ara C) und Mimosin kultiviert. Dadurch wurde verhindert, dass es allein durch die Proliferation der Zellen zu einer erhöhten TNF $\alpha$ -

Sekretion kommt. Ara C erwies sich gegenüber Mimosin im späteren Verlauf der Experimente als der geeignetere Hemmer. Der Proliferationshemmer nimmt keinen Einfluss auf das circadiane Verhalten der Zellen [16]. Für eine Zeitreihe über 48 h wurden die Zellen mit Dexamethason 2 h synchronisiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit dem Proliferationshemmer Ara C. Im Abstand von 4 h wurden je vier Wells je Zeitpunkt mit 0,2 pg/ml LPS für 4 h stimuliert. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels Elisa bestimmt.



**Abbildung 5-16:**  $\text{TNF}\alpha$  wird nach der Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS circadian sekretiert. Zellen der Zelllinie RAW 264.7 wurden mit Dexamethason synchronisiert und mit dem Proliferationshemmer Ara C behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Synchronisation wurden die Zellen 4 h mit LPS stimuliert und der Zellkulturüberstand wurde zur Bestimmung von  $\text{TNF}\alpha$  im Elisa verwendet. Für die Werte der stimulierten Zellen (—●—) wurden jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen berechnet aus je drei Kulturansätzen pro Zeitpunkt. Die Werte der unstimulierten Zellen (—○—) repräsentieren den Zellkulturüberstand von nur einem Kulturansatz der RAW 264.7 Zellen. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion der stimulierten RAW 264.7 Zellen über die Zeit wurde mit dem Programm CircWave analysiert und ist statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

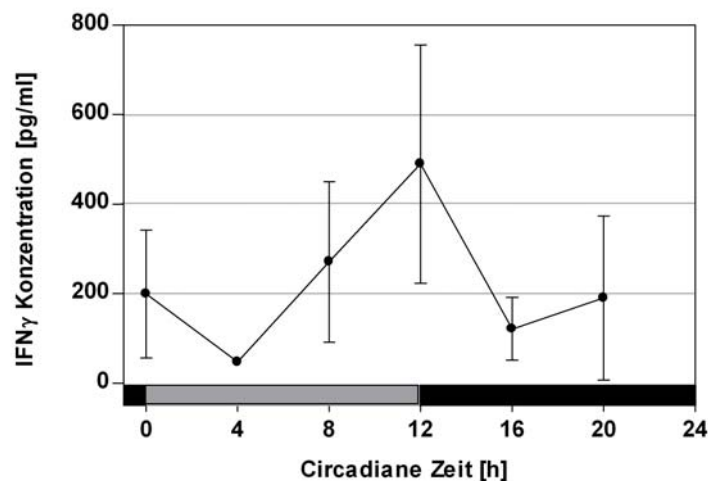
Wie der Abbildung 5-16 zu entnehmen ist, führte die Stimulation von synchronisierten RAW 264.7 Zellen mit LPS zu einer circadianen Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  ( $p < 0,001$ ). Das Maximum der  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Kulturüberstand wurde nach 16 bis 20 h nach Synchronisation erreicht. Ein weiteres Maximum erscheint nach 40 bis 44 h nach Dexamethasonbehandlung. Damit liegen die beiden Maxima etwa 24 h auseinander. Sie unterscheiden sich in ihrer Amplitude, die beim ersten Höhepunkt zirka 2fach und beim zweiten Maximum 4fach ist. Bei den unstimulierten Zellen ist auch eine Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  zu beobachten, die ähnlich den stimulierten Zellen einer Oszillation unterworfen ist, jedoch in einem sehr geringen Maße. RAW 264.7 Zellen sind sehr empfindlich auf Endotoxine, da sie selbst bei einer geringen LPS-

Konzentration von nur 0,2 pg/ml das 20 bis 40fache an  $\text{TNF}\alpha$  verglichen mit der Sekretion in primären Milzzellen sekretieren. Das heißt, dass sich noch geringe Spuren von Endotoxinen im Medium befanden.

Auf Grund der hier gezeigten Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die Zytokinsekretion in RAW 264.7 Zellen von der circadianen Uhr reguliert wird und nicht von systemischen Faktoren. Die Möglichkeit der Stimulation und die darauffolgende circadiane Sekretion von Zytokinen erheben die RAW 264.7 Zellen zu einem Modellsystem für die Untersuchung der molekularen circadianen Abläufe in Immunzellen.

#### 5.5.4 $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach Concanavalin A-Stimulation in primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen

Primäre Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen wurden mit Concanavalin A behandelt, um zu testen, ob Kortisol einen Einfluss auf die Sekretion von  $\text{IFN}\gamma$  hat.



**Abbildung 5-17:**  $\text{IFN}\gamma$  wird nach Stimulation mit Concanavalin A von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen nicht circadian sekretiert. Nach Transfer der Tiere von einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus in konstante Dunkelheit wurden alle 4 h Milzen entnommen. Die primären Zellen wurden mit Concanavalin A für 24 h stimuliert und der Überstand wurde für die Detektion von  $\text{IFN}\gamma$  im Elisa benutzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von drei bis fünf primären Milzkulturen mit Ausnahme von CT4 n =1 mit Standardfehlern. Die Oszillation ist statistisch nicht signifikant. Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorangegangenen Licht-Dunkel-Zyklus.

Dafür wurden adrenaletomierte C57BL/6 Mäuse zwei Wochen in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und dann in konstante Dunkelheit entlassen. Die Milzen wurden in einem 4-Stunden-Intervall entnommen und eine primäre Einzelzellkultur angelegt. Die Zellen

wurden anschließend 24 h mit Concanavalin A stimuliert. Die Konzentration des sekretierten  $\text{IFN}\gamma$  wurde in den Zellkulturüberständen mittels Elisa bestimmt. Die Signifikanz der Oszillation wurde mit Hilfe des CircWave Programms getestet.

In Abbildung 5-17 sind die Ergebnisse der Stimulation mit Concanavalin A gezeigt. Eine statistisch signifikante Oszillation liegt nicht vor. Zu fast jedem gemessenen Zeitpunkt trat eine große Variabilität der Daten auf, was sich in den Standardfehlern widerspiegelt. Zusätzlich lagen viele gemessene Konzentrationen unter dem Detektionslimit. Eine generelle Aussage, ob Kortisol einen Einfluss auf das rhythmische Sekretionsverhalten von T-Zellen hat, kann nicht getroffen werden.

### 5.5.5 Normalisierte $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Sekretion mit Hilfe der Gesamt-Zellzahl

Primäre Milzzellen von unoperierten und adrenaletomierten Mäusen zeigen nach der Stimulation mit LPS eine circadiane Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 (siehe Abbildung 5-10). Auch die Anzahl der Zellen in der Milz, insbesondere die der Makrophagen, unterliegt einer circadianen Oszillation und korreliert dabei teilweise direkt mit der  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Sekretion. Deshalb galt es zu untersuchen, ob die circadiane Sekretion von den zu diesen Zeitpunkten vorhandenen Makrophagen verursacht wird. Dazu wurde die jeweilige detektierte Zytokinmenge auf die Menge der Makrophagen, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurden, normalisiert.

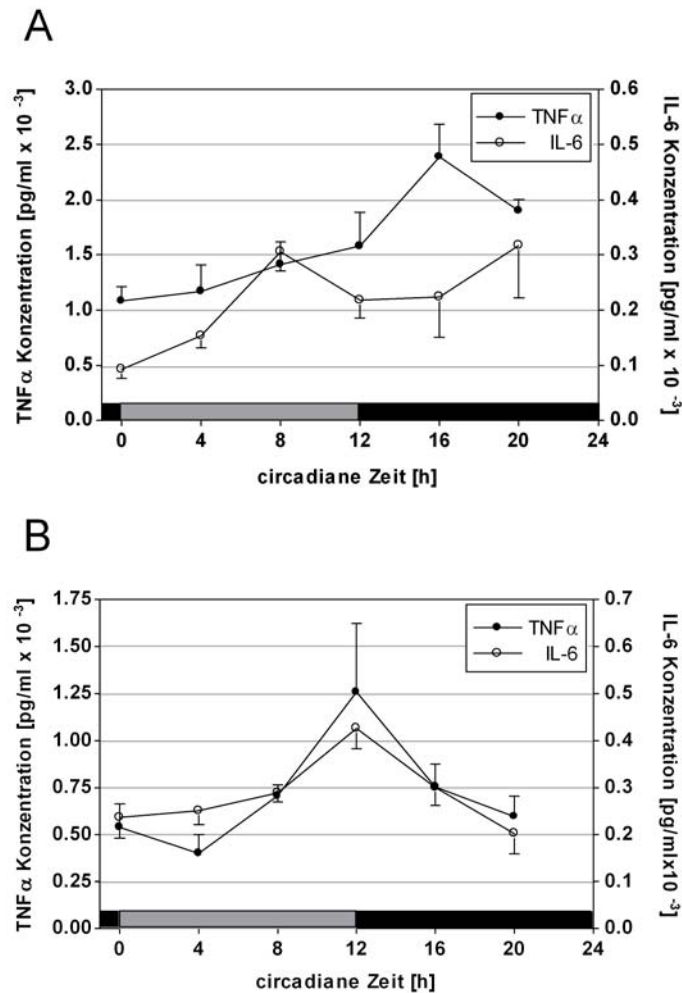
In Abbildung 5-18 sind die auf die Makrophagenzahl normalisierten Zytokinmengen von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 abgebildet. Würden Makrophagen zu jedem Zeitpunkt die gleiche Menge an Zytokinen sekretieren, müsste sich eine ähnliche Oszillation wie bei der absoluten Anzahl der Makrophagen ergeben. Aber offensichtlich sekretieren Makrophagen in unoperierten Mäusen zu unterschiedlichen Zeiten eine unterschiedliche Menge an  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 (Abbildung 5-18 A). Dieser Unterschied ist zwischen Maximum und Minimum ungefähr zweifach. Die Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  pro Makrophage ist bei CT16 am höchsten, bei diesem Zeitpunkt ist die Makrophagenzahl am geringsten. Das heißt, dass bei CT16 pro Makrophage die höchste Sekretion an  $\text{TNF}\alpha$  besteht.

IL-6 wird zu CT8 und CT20 am meisten sekretiert. Die Rhythmik entspricht ungefähr der nicht-normalisierten Oszillation.

In adrenaletomierten Mäusen sekretieren die Makrophagen zu CT12 die größte Menge an  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6. Der Kurvenverlauf ähnelt der Oszillation der unnormalisierten Werte der beiden Zytokine. Die absolute Makrophagenzahl in adx Mäusen ist bei CT8 am höchsten. Dies bedeutet, dass nicht die Anzahl der Makrophagen an sich der Grund für eine circadiane



Sekretion der Zytokine ist, sondern diese Zellen zu unterschiedlichen Zeiten unterschiedliche Mengen an Zytokinen sekretieren.



**Abbildung 5-18:** Normalisierte TNF $\alpha$ - und IL-6-Level nach Stimulation von primären Milzzellen mit LPS. Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit entlassen. Milzen wurden alle 4 h von unoperierten und adrenaletomierten Mäusen entnommen. Primäre Zellen wurden mit LPS stimuliert und die Zytokinsekretion mittels Elisa gemessen. Die detektierte Zytokinkonzentration wurde mit der Anzahl der Makrophagen, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde, zu diesem Zeitpunkt normalisiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der normalisierten Zytokinen aus Zellkulturüberständen von vier bis fünf verschiedenen primären Milzkulturen aus unoperierten Mäusen (A) und adrenaletomierten Mäusen (B). Die grauen und schwarzen Balken repräsentieren den vorausgegangenen Licht-Dunkel-Zyklus der Mäuse.

## 5.6 Genexpression in sortierten Immunzellpopulationen

Die Ergebnisse aus den vorherigen Abbildungen zeigen eine circadiane Sekretion von  $TNF\alpha$  und IL-6 unbeeinflusst von Kortisol. Doch auf welcher Grundlage die circadiane Uhr diese Sekretion reguliert, ist nicht bekannt. Deshalb wurden Microarray-Experimente [53] durchgeführt, weil damit viele Gene, die einer potenziellen Regulation unterliegen könnten, auf einmal untersucht werden können. Der Fokus lag dabei auf den exprimierten Genen, die die Signalkaskade für die  $TNF\alpha$ - und IL-6-Sekretion betreffen.

In Arbeiten von Panda *et al.*, und Storch *et al.*, [143,187] konnte bereits gezeigt werden, dass 6 – 10 % aller Transkripte in Herz, Leber und SCN circadian exprimiert werden, wobei jedes Organ über ein unterschiedliches Set an oszillierenden Transkripten verfügt. Deshalb sollten die hier durchgeführten Microarray-Experimente dazu dienen, weitere allgemeine Hinweise auf eine circadiane Genexpression in der Milz zu bekommen. Dabei soll analysiert werden, welche Gene in der Milz durch die circadiane Uhr in ihrer Expression zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 reguliert werden.

Für die Analyse wurden einzelnen Milzpopulationen (B- und T-Zellen, Makrophagen) durch magnetische Zellsortierung (MACS) abgetrennt. Da in der Milz die Genexpression von *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  um den Zeitpunkt CT9 relativ hoch und um CT21 relativ niedrig war, wurden die sortierten Zellen zuerst auf ihre circadiane Uhrgenexpression untersucht. Nur die Zellen wurden weiter verwendet, bei denen ein signifikanter Unterschied in den Uhrgenexpressionen nachweisbar war.

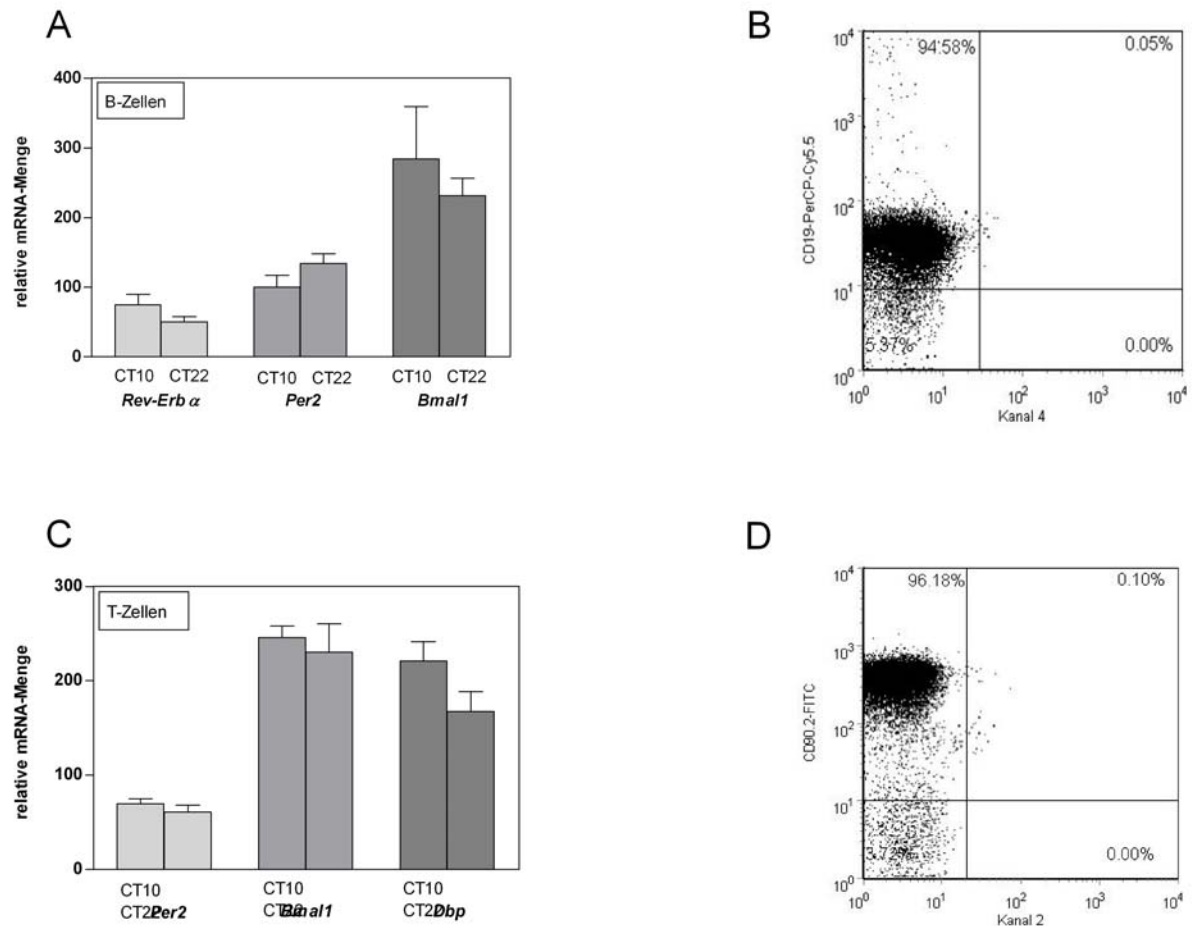
### 5.6.1 Uhrgenexpression in B- und T-Zellen

Für die Analyse der Uhrgenexpression in einzelnen Immunpopulationen wurden zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 von B- und T-Zellen die Uhrgene *Rev-Erb $\alpha$* , *Per2* und *Bmal1* bzw. *Dbp* untersucht.

C57BL/6 Mäuse wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und dann in konstante Dunkelheit überführt. Zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 wurden die Milzen entnommen und eine Einzelsuspension hergestellt. T- und B-Zellen wurden sequenziell mittels magnetischer Zellseparation nach der Methode der Firma Miltenyi sortiert. Zusätzlich wurde der Durchlauf nach der Separation aufgefangen und die Zellen wurden aufbewahrt. Von den sortierten Zellen wurden Aliquots entnommen und die Reinheit mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Bei einer Reinheit von über 90 Prozent wurden die B- und T-Zellen mit dem RLT-Puffer der Firma Qiagen lysiert und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Kit isoliert. Die gleiche

Prozedur durchliefen die Zellen des „Durchlaufes“. Die RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und die Expression der Uhrgene mittels quantitativer PCR analysiert. Durch den t-Test wurde analysiert, ob es signifikante Unterschiede in der Expression der Uhrgene zu den zwei Zeitpunkten gibt.



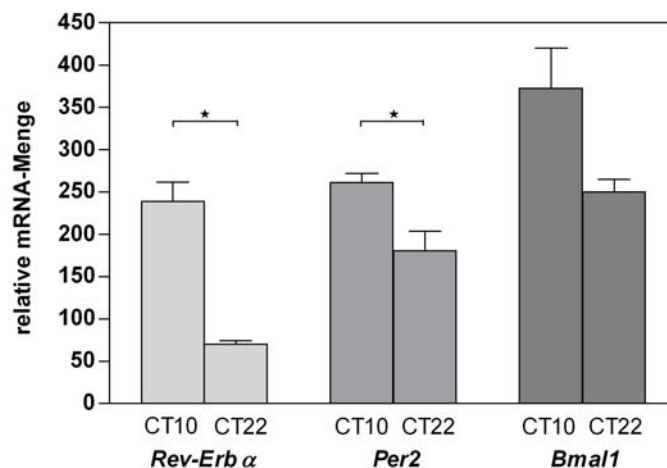
**Abbildung 5-19:** In sortierten B-Zellen (A und B) und T-Zellen (C und D) gibt es keine signifikant unterschiedliche Uhrgenexpression zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. Von entrainierten Mäusen wurden zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 die Milzen entnommen. B- und T-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation sortiert, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Verschiedene Uhrgene oder Uhr-kontrollierte Gene wurden mittels quantitativer PCR analysiert. In Abbildung B und D sind repräsentative Dot Plots dargestellt, die die Reinheit der sortierten Zellen zeigen. Die Auswertung der relativen Transkriptlevels erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung mit *Gapdh* als Referenzgen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der relativen mRNA-Mengen von drei Uhrgenen *Rev-Erb $\alpha$* , *Per2* und *Bmal1* für B-Zellen und *Per2*, *Bmal1* und *Dbp* für T-Zellen von je fünf Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22 für die jeweiligen Gene ( $p > 0,05$ ).

In Abbildung 5-19 A und C sind die Uhrgenexpressionen von *Rev-Erb $\alpha$* , *Per2* und *Bmal1* bzw. von *Dbp* in B- und T-Zellen dargestellt. Abbildung 5-19 B und D stellen repräsentative Dot Plots dar, mit denen die Reinheit der sortierten Population bestimmt wurde.

Zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) der Expressionslevels der untersuchten Uhrgene in T- und B-Zellen festgestellt werden.

Da in T- und B-Zellen kein Unterschied in der Uhrgenexpression festgestellt werden konnte, wurden zusätzlich die Zellen des „Durchlaufes“ (CD19<sup>-</sup>CD90.2<sup>-</sup>) analysiert. Darin befinden sich zwar immer noch B- und T-Zellen, aber nur zu einem geringen Prozentsatz.

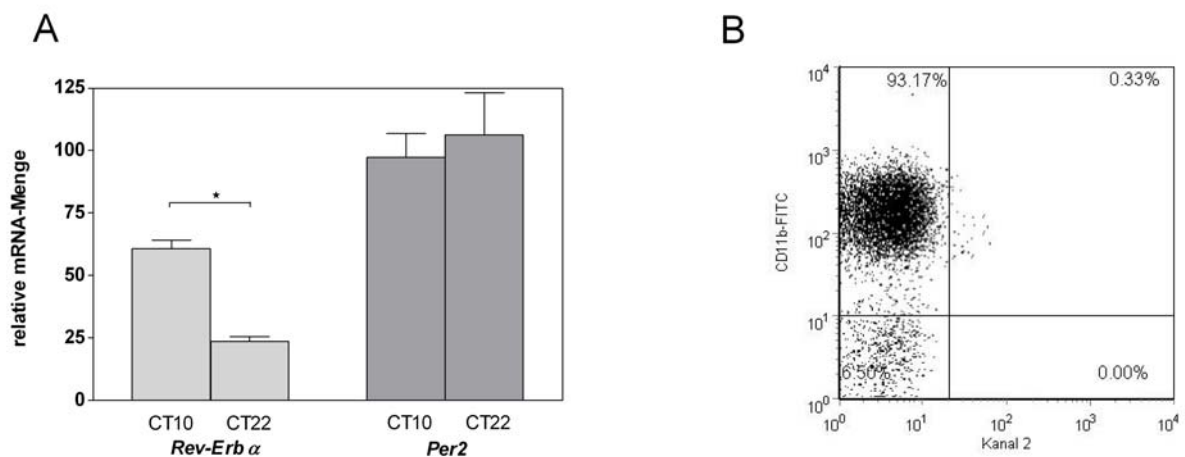
In Abbildung 5-20 sind die Ergebnisse der Expression der CD19<sup>-</sup>CD90.2<sup>-</sup>-Zellen von *Rev-Erb $\alpha$* , *Per2* und *Bmal1* dargestellt. Der t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22 für *Rev-Erb $\alpha$*  und *Per2* ( $p < 0,05$ ). Die Expressionsunterschiede von *Bmal1* zu CT10 und CT22 sind nicht signifikant. Diese Ergebnisse spiegeln die Uhrgenexpressionen in der Milz wieder, bei der auch *Rev-Erb $\alpha$*  und *Per2* ihr Expressionsmaximum haben.



**Abbildung 5-20:** In CD19<sup>-</sup>CD90.2<sup>-</sup>-Zellen existiert ein signifikanter Unterschied in der Uhrgenexpression zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22. Entrainten Mäusen wurden zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 die Milzen entnommen. B- und T-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation abgetrennt. Aus den restlichen Zellen (nonB/nonT-Zellen) wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und verschiedene Uhrgene mittels quantitativer PCR analysiert. Die Auswertung der Transkriptlevels erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung mit *Gapdh* als Referenzgen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Transkriptlevels von drei verschiedenen Uhrgenen *Rev-Erb $\alpha$* , *Per2* und *Bmal1* von fünf Mäusen zu CT10 und CT22. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab einen signifikanten Unterschied für die Gene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  ( $*p < 0,05$ ) zwischen CT10 und CT22 und keinen Unterschied für *Bmal1* ( $p > 0,05$ ).

### 5.6.2 Uhrgenexpression in CD11b<sup>+</sup>-Zellen

Die Ergebnisse der CD19<sup>+</sup>CD90.2<sup>-</sup>-Zellen lassen darauf schließen, dass in Makrophagen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 Uhrgene unterschiedlich exprimiert werden. Um eine definierte Makrophagenpopulation zu erhalten und die Ergebnisse der Uhrgenexpression des „Durchlauf“ zu bestätigen, wurden CD11b<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz separiert. Dazu wurden Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Die Milzen wurden zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. CD11b<sup>+</sup>-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation mit der Methode der Firma Cellsystems sortiert. Von den sortierten Zellen wurden Aliquots genommen und die Reinheit der Zellen durch Durchflusszytometrie analysiert. Ab einer Reinheit von über 90 Prozent wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA daraus isoliert. Die RNA wurde anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der Uhrgenexpression erfolgt mit Hilfe der quantitativen PCR. Statistische Unterschiede in der Expression der Uhrgene wurden mit dem t-Test ermittelt.



**Abbildung 5-21:** In sortierten CD11b<sup>+</sup>-Zellen gibt es eine unterschiedliche Uhrgenexpression zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. Von entrainierten Mäusen wurden zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 die Milzen entnommen. CD11b<sup>+</sup>-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation sortiert, deren RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die beiden Uhrgene *Rev-Erb $\alpha$*  und *Per2* wurden mittels quantitativer PCR analysiert. In Abbildung B ist repräsentativ ein Dot Plot dargestellt, der die Reinheit der sortierten Zellen zeigt. Die Auswertung der Transkriptlevels erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung mit *Gapdh* als Referenzgen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von den jeweiligen relativen mRNA-Mengen der Uhrgene von vier Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab einen signifikanten Unterschied (\* $p < 0,05$ ) zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22 für *Rev-Erb $\alpha$* .

CD11b<sup>+</sup>-Zellpopulationen wurden auf Verunreinigungen kontrolliert. Dazu wurden sie mit anti-CD90.2- und anti-CD19-Antikörpern gefärbt. Zirka fünf Prozent von CD11b<sup>+</sup>-Zellen sind auch CD19 positiv. Da das Oberflächenmolekül CD11b in einem geringen Prozentsatz auch auf B-Zellen exprimiert wird, war dieses Ergebnis zu erwarten.

In Abbildung 5-21 A sind die Uhrgenexpressionen von *Rev-Erb $\alpha$*  und *Per2* in CD11b<sup>+</sup>-Zellen dargestellt. Abbildung 5-21 B stellen repräsentative Dot Plots dar, mit denen die Reinheit der sortierten Population ermittelt wurde. Nur bei *Rev-Erb $\alpha$*  konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 festgestellt werden. Damit konnten die Ergebnisse der CD19<sup>-</sup>CD90.2<sup>-</sup>-Zellen nur für *Rev-Erb $\alpha$*  bestätigt werden.

### 5.6.3 Genexpression in CD11b<sup>+</sup>-Zellen

CD11b<sup>+</sup>-Zellen zeigen zumindest für das Uhrgen *Rev-Erb $\alpha$*  einen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22. Deshalb wurde für die Analyse der Genexpression von Immunzellen diese Zellpopulation ausgewählt.

Für die Untersuchung der Genexpression von CD11b<sup>+</sup>-Zellen, wurden C57BL/6 Mäuse in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und anschließend in konstante Dunkelheit überführt. Zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 wurden die Milzen entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für eine definierte Makrophagenpopulation wurden die Zellen mittels magnetischer Zellseparation mit der Methode der Firma Cellsystems abgetrennt. Die Reinheit der Zellpopulation wurde mit der Durchflusszytometrie überprüft. Aus diesen sortierten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert. Die RNA von vier Mäusen wurde je Zeitpunkt gepoolt. Die Expressionsanalyse, d. h. die Hybridisierung der Proben auf dem Array und die Auswertung der Rohdaten erfolgte in Kooperation mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung (Charité).

Insgesamt sind beim Zeitpunkt CT10 23801 Gene exprimiert, bei CT22 dagegen nur 22428. 21271 Gene konnten bei beiden Zeitpunkten als exprimiert (Present) nachgewiesen werden, wobei im Gegensatz zu CT10 bei CT22 mehr Gene herunterreguliert vorliegen (siehe Tabelle 5-1). 2192 Gene werden nur bei CT10 exprimiert, aber nicht bei CT22 (Present-Absent). Dagegen werden nur 975 Gene bei CT22 exprimiert, die nicht bei CT10 abgelesen werden (Absent-Present). Zusammengefasst sind 24438 Gene in CD11b<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Zur Identifikation der potenziell tageszeitlich regulierten Gene in CD11b<sup>+</sup>-Zellen, wurden die unter Methoden genannten Kriterien herangezogen. Daraus ergibt sich für die Gene, die zu beiden Zeitpunkten exprimiert werden eine Liste mit 1056 Genen, wovon 798 zu CT22 herunterreguliert und 258 Gene hochreguliert sind. Zusätzlich kommen 211 Gene hinzu, die nur bei CT10 exprimiert und 50 Gene, die nur bei CT22 abgelesen werden. Zusammen ergibt sich daraus eine Liste von 1317 Genen, die einer tageszeitlichen Regulation unterliegen könnten. Dies

entspricht ungefähr fünf Prozent aller exprimierten Gene in diesen Zellen. Da nur zwei Datenpunkte eines circadianen Tages vorliegen, ist eine tageszeitliche Regulation nur unter Vorbehalt zu betrachten. Für eine Aussage über eine circadiane Oszillation der Gene müssen mehr Datenpunkte analysiert werden.

**Tabelle 5-1:** Anzahl der Gene die generell zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 exprimiert werden und die Anzahl der Gene, die einer circadianen Regulation unterliegen könnten

Zeitpunkte	Anzahl der Gene, die generell exprimiert werden	Anzahl der Gene, die möglicherweise einer circadianen Regulation unterliegen
CT10 und CT22	21271	1056
CT10	2192	211
CT22	975	50
Gesamt	24438	1317

Für die Analyse der Funktionen der 1317 Gene wurden sie mittels Genontologie ausgewertet [13,196]. Diese Genontologie unterteilt biologisches Wissen in drei Kategorien: in biologische Prozesse, molekulare Funktionen und zelluläre Bestandteile. Für die Auswertung von großen Datensätzen bietet die Genontologie eine objektive Basis für die Analyse und den Vergleich von Genen.

In den Abbildung 5-22 A – C sind die vorher ausgewählten Gene nach den drei Kategorien der Genontologie ausgewertet und in weitere Unterfunktionen eingeteilt worden.

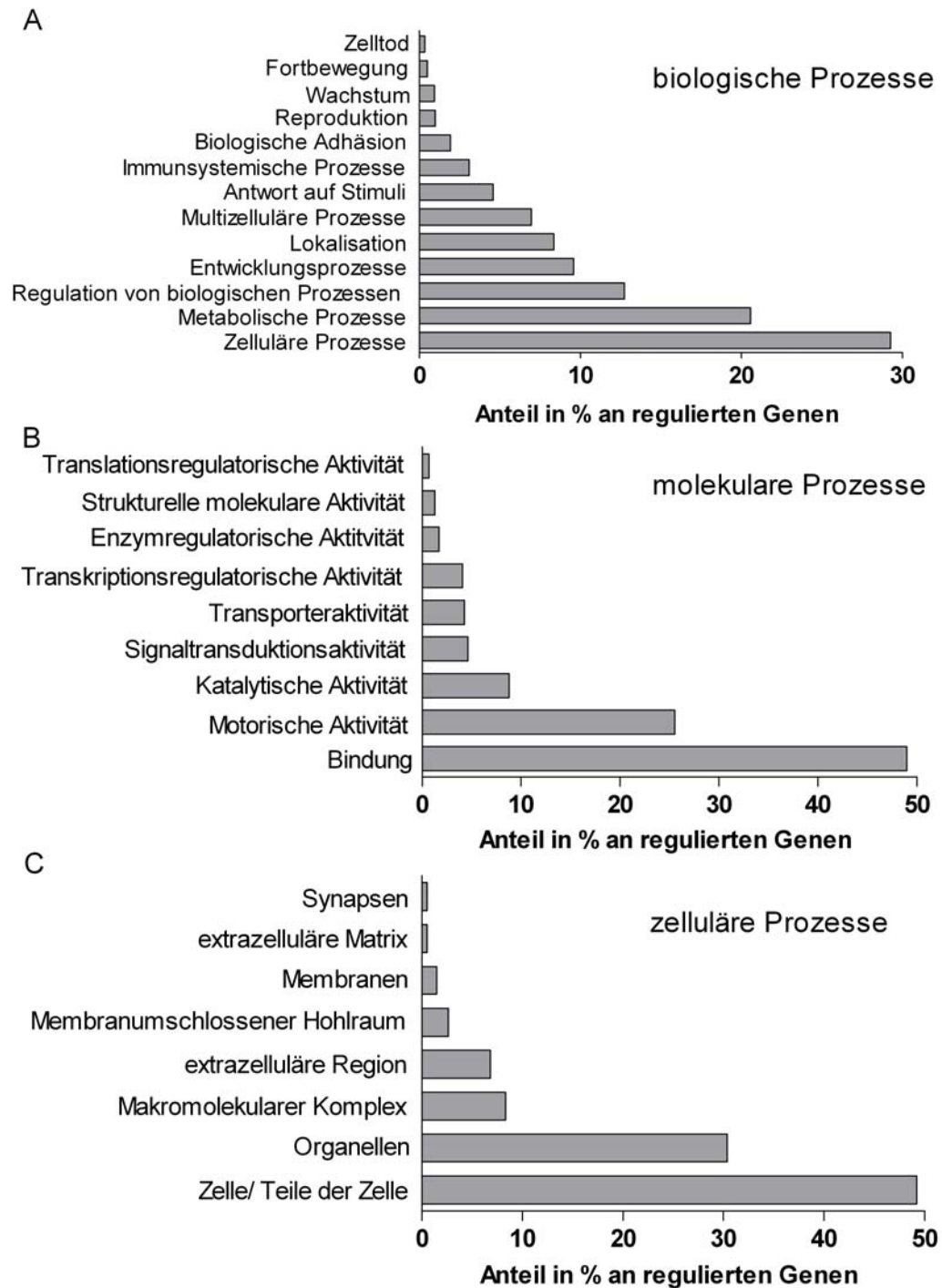
In CD11b<sup>+</sup>-Zellen sind bei den biologischen Prozessen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 zirka 20 bis 30 Prozent der Gene in metabolischen und zellulären Prozessen reguliert. Sie machen in dieser Kategorie den größten Teil aus. Nur zirka fünf Prozent aller Gene zeigen bei der Antwort auf Stimuli Unterschiede. Zu dieser Unterkategorie gehört auch der TLR4-Signalweg. Bei den molekularen Prozessen macht die Unterkategorie der Bindung mit fast 50 Prozent Regulation den größten Teil aus. Bei den zellulären Komponenten sind hauptsächlich Teile der Zellen im Allgemeinen und Gene der Organellen reguliert.

Urgene oder Uhr-kontrollierte Gene zeigen dagegen gar keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22. Die Fold-Change-Faktoren sind in Tabelle 5-2 aufgelistet. Nur *Wdr5*, *Fbxl3* und *Gsk3 $\beta$*  zeigen eine wirkliche Regulation. Die Gene *Per2*, *Rora* und *E4bp4* zeigen einen minimalen Unterschied. Auffällig ist, dass fast alle Uhrgene oder Uhr-kontrollierten Gene eine Runterregulation zu CT22 zeigen.

**Tabelle 5-2:** Uhrgene und uhrkontrollierte Gene und ihre Fold-Change-Faktoren

Uhrgene	Fold/Change-Faktor
<i>Bmal1</i>	1,06
<i>Per1</i>	-1,08
<i>Per2</i>	-1,53
<i>Per3</i>	1,17
<i>Cry1</i>	-1,01
<i>Cry2</i>	1,18
<i>Rev-Erb<math>\alpha</math></i>	Absent/Absent
<i>Rora</i>	-1,46
<i>Clock</i>	1,24
<i>Npas2</i>	Absent/Absent
<i>Dbp</i>	-1,33
<i>Wdr5</i>	-2,08
<i>Gsk3<math>\beta</math></i>	-2,28
<i>E4bp4</i>	-1,89
<i>Fbxl3</i>	-4,3





**Abbildung 5-22:** Effekte der circadianen Uhr auf die differentielle Genexpression in CD11b<sup>+</sup>-Zellen (Makrophagen). Die unterschiedlich regulierten Gene wurden durch die Genontologie entsprechend ihrer biologischen Funktion in verschiedene Genontologie-Kategorien eingeordnet. Die Abbildung zeigt die drei funktionellen Kategorien A) biologische Prozesse, B) molekulare Prozesse und C) zelluläre Komponenten mit ausgesuchten Unterkategorien, in denen Gene zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 hoch- oder herunterreguliert sind. Die Prozentangaben zeigen, welche Anteile die potenziell circadian regulierten Gene in der jeweiligen Funktion ausmachen.

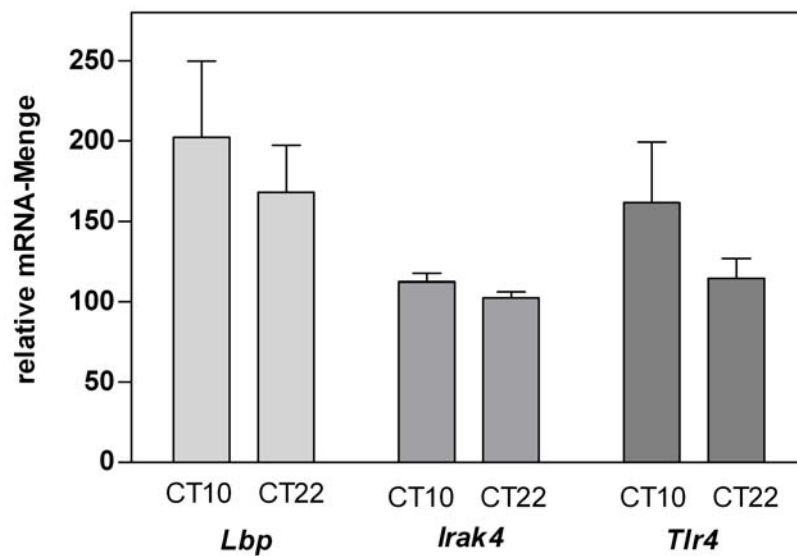
Neben der generellen Analyse der Genregulation in CD11b<sup>+</sup>-Zellen, lag ein Fokus auf der Untersuchung der Gene, die im TLR4-Signalweg eine Rolle spielen. Die entsprechenden Gene und ihre Fold-Change-Faktoren sind in Tabelle 5-3 aufgelistet.

**Tabelle 5-3:** Gene, des TLR4-Signalwegs und ihre Fold-Change-Faktoren

Gene, des TLR4-Signalweg	Fold-Change-Faktor
<i>Tlr4</i>	-1,54
<i>Cd14</i>	-1,89
<i>Md-2</i>	-1,09
<i>Lbp</i>	-2,41
<i>MyD88</i>	-1,32
<i>Irak1</i>	1,11
<i>Irak4</i>	-3,25
<i>Traf6</i>	-1,43
<i>Tak1</i>	1,06
<i>Tab1</i>	1,31
<i>Tab2</i>	1,03
<i>Jnk</i>	-1,17
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	-1,3
<i>Tnf<math>\alpha</math></i>	1,25
<i>Il-6</i>	-1,26
<i>Tirap</i>	-1,08

Nur bei sehr wenigen Genen des TLR4-Signalwegs, nämlich bei *Lbp* und *Irak4* kann von einer unterschiedlichen Regulation zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 ausgegangen werden. Eine geringe Regulation ist noch bei den Genen von *Cd14* und *Traf6* zu sehen. Doch diese Gene könnten ausreichen, um eine Oszillation der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 zu verursachen. Auch hier ist auffällig, dass fast alle Gene eine Runterregulation bei CT22 zeigen. Diese Runterregulation könnte auf eine generell geringere Sensitivität beim Zeitpunkt CT22 hinweisen. Dies würde auch mit einer geringeren Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-6 übereinstimmen.

Die Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse erfolgte mit quantitativer Real-Time PCR. Dazu wurden einzelne Gene ausgesucht, die eine Regulation auf dem Array zeigen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-23 dargestellt.



**Abbildung 5-23:** In sortierten CD11b<sup>+</sup>-Zellen existiert eine Expression der *Lbp*-, *Irak4*- und *Tlr4*-Gene zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. Von entrainierten Mäusen wurden zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 die Milzen entnommen. CD11b<sup>+</sup>-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation sortiert, deren RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Gene wurden mittels quantitativer PCR analysiert. Die Auswertung der Transkriptlevel erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung mit *Gapdh* als Referenzgen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von den jeweiligen relativen mRNA-Mengen der Gene von vier Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. Die statistische Auswertung mittels t-Test ergab für keines der Gene einen Unterschied zwischen den Zeitpunkten.

Für keines der Gene (*Lbp*, *Irak4* und *Tlr4*) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22 festgestellt werden. Lediglich ein Trend ist zu erkennen, der ebenso wie auf dem Microarray eine Runterregulation der Gene bei CT22 zeigt.

Die Analyse der CD11b<sup>+</sup>-Zellen mittels Array-Technologie ergab, dass zirka fünf Prozent aller exprimierten Gene circadian reguliert sein könnten. Darunter sind auch Gene des TLR4-Signalweges. Damit besteht die Möglichkeit, dass dieser Signalweg circadian reguliert wird.

## 6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der circadianen Uhr im Immunsystem. Zunächst war zu klären, ob das Immunsystem ein molekulares Uhrwerk besitzt. Dazu wurden Organe des Immunsystems mittels quantitativer PCR auf ihre circadiane Uhrgenexpression geprüft. Weiterhin wurde untersucht, ob die circadiane Uhrgenoszillation im Immunsystem selbst getrieben funktioniert oder ob direkte bzw. indirekte Signale vom SCN benötigt werden. Die Analyse erfolgte über die *ex vivo* Oszillation von Organen und Zellen des Immunsystems von *PER2::LUC*-Mäusen und *Per1::Luc*-Ratten.

Als nächstes wurde untersucht, ob die circadiane Uhr eine Rolle bei speziellen Immunfunktionen spielt. Dabei wurde analysiert, welchen Einfluss die circadiane Uhr auf die Anzahl von ausgesuchten Immunzellpopulationen in der Milz hat. Die Anzahl von Makrophagen sowie von B- und T-Zellen wurde dafür mittels Durchflusszytometrie, in Abhängigkeit von der Zeit und dem immunregulatorischen Hormon Kortisol untersucht.

Des Weiteren wurde die circadiane Oszillation der Zytokinsekretion ( $\text{TNF}\alpha$  und IL-6) von murinen Milzzellen untersucht. Dafür wurden primäre Milzzellen mit LPS stimuliert. Weiterhin wurde analysiert, ob diese Zytokinabgabe von systemischen Kortisolrhythmen abhängig ist. Dazu wurden primäre Milzzellen von adrenaletomierten Mäusen verwendet.

Ein weiteres Hauptaugenmerk der Arbeit war die circadiane Genexpression in Makrophagen mit Hilfe von Microarrays. Dabei sollten hauptsächlich Gene, die bei der LPS-Stimulation und der darauf folgenden Zytokinsekretion eine Rolle spielen, untersucht werden. Auf diese Weise sollten potentielle Gene gefunden werden, die Hinweise auf eine molekulare Verbindung zwischen circadianer Uhr und Immunfunktion geben. Makrophagen wurden dafür zu zwei circadianen Zeitpunkten mittels magnetischer Zellsortierung aus primären Milzzellen separiert. Die aus den Makrophagen gewonnene RNA wurde nach mehreren Umschreibe- und Markierungsschritten auf einem Mikroarray, der das gesamte Mausgenom umfasst, hybridisiert. Die Auswertung der Array-Daten postuliert eine Regulation der circadianen Uhr auf tageszeitliche Immunfunktionen.

## 6.1 Circadiane Uhrgen-Oszillation in Geweben des Immunsystems

Eine circadiane Uhrgenexpression wurde bereits in peripheren Organen wie Herz, Leber und Niere gefunden [213]. Im Immunsystem dagegen, ist die Existenz einer circadianen Uhr noch nicht beschrieben worden. Aus diesem Grund wurde in den Organen des Immunsystems wie Milz und Lymphknoten die circadiane Uhrgenexpression mittels quantitativer PCR untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Milz und in Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen eine circadiane Expression der Uhrgene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  existiert (Abbildung 5-1). Für das Uhrgen *Bmal1* konnte keine Oszillation gefunden werden (Abbildung 5-2). In beiden Immungeweben, Milz und Lymphknoten, zeigt das Expressionslevel für *Rev-Erb $\alpha$*  ein Maximum zwischen CT6 – 9 (subjektive Lichtphase) und für *Per2* zwischen CT12 – 15 (Anfang der Dunkelphase).

Die Expressionsmuster der Uhrgene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  in den Lymphknoten und in der Milz verhalten sich dabei in Phase und Amplitude wie in anderen peripheren Organen. Yamamoto *et al.* [213] konnten in der Milz für *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  ähnliche Ergebnisse zeigen. Für das Uhrgen *Bmal1* konnten er und seine Kollegen ebenfalls eine Oszillation zeigen, mit einer gegensätzlichen Phase zu *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$* . Auch die Forschergruppe um Hayashi *et al.* [84] konnte eine Oszillation von *Bmal1* mRNA-Leveln in Peritonealmakrophagen beobachten. Dagegen zeigen andere Arbeiten [131,200] ebenfalls keine signifikante Oszillation des Uhrgens *Bmal1* im peripheren Blut von Pferden sowie in humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen.

In *Rev-Erb $\alpha$* -Knockout-Mäusen wird *Bmal1* ebenfalls konstitutiv exprimiert, doch das Laufradverhalten dieser Mäuse und die Expression der Uhrgene *Per2* und *Cry2* unterliegt immer noch einem circadianen Rhythmus. Damit sind oszillierende mRNA-Level von *Bmal1* für eine funktionierende circadiane Uhr nicht notwendig. Erst der Wegfall von *Bmal1*, wie in den gleichnamigen Knockout-Mäusen, bewirkt unter konstanten Bedingungen eine sofortige Arrhythmizität im Laufradverhalten der Mäuse und damit ein nicht funktionierendes Uhrwerk.

Auch in anderen Immunzellen wie in murinen Knochenmarkzellen und humanen peripheren Blutzellen einschließlich Leukozyten konnte bereits eine tageszeitliche oder circadiane Uhrgenexpression gezeigt werden [23,37,66,107]. In diesen Arbeiten wird im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen sowohl im Menschen als auch in Nagetieren ein Maximum der Uhrgenexpression von *Per1* in der Lichtphase oder zum Beginn der Lichtphase beschrieben. Beim Menschen entspricht aber im Gegensatz zur Maus diese Phase der Aktivitätsphase. In natürlichen Killerzellen von Ratten erreicht *Per2* erst bei CT15 sein Maximum [11] Dabei wurden aber jeweils nur einzelne Immunzellpopulationen und keine vollständigen Gewebe untersucht.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal eine circadiane Uhrgenexpression in Lymphknoten. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der Uhrgenexpression in der Milz konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die circadiane Expression von Uhrgenen ist eine Bedingung für ein funktionierendes Uhrwerk. Durch den Nachweis der circadianen Expression der mRNA-Level von *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  in Milz und Lymphknoten kann auf eine circadiane Uhr im Immunsystem geschlossen werden.

## 6.2 Autonome Oszillation in Immunzellen

In der vorliegenden Arbeit konnten für Gewebe des Immunsystems eine circadiane Uhrgenexpression gezeigt werden. Diese Ergebnisse repräsentieren die Situation in einem intakten Tier, die von verschiedenen Signalen wie z. B. Hormonrhythmen und Körpertemperaturrhythmen des Organismus beeinflusst werden können. Damit ist unklar, ob die circadiane Oszillation der Uhrgene im Immunsystem von circadian systemischen humoralen und/oder neuronalen Rhythmen direkt oder indirekt gesteuert wird, oder ob diese Gewebe/Zellen autonom schwingen. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Oszillationen der Uhrgene in Herz, Leber, Nieren und kultivierten Fibroblasten von Kortisolrhythmen beeinflusst und gesteuert werden können [15,17,139]. Auch andere Faktoren wie rhythmisches Futterangebot sowie Körpertemperaturrhythmen sind als Zeitsignale für periphere Organe bekannt [26,43]. Um zu zeigen, dass das Immunsystem eine gewebeautonome Uhr besitzt, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente durchgeführt, bei denen Zellen und Gewebe des Immunsystems von äußeren Zeitgebern vollständig unbeeinflusst sind. Dazu wurden Zellen oder Gewebe *ex vivo* oder Zelllinien untersucht. Die Auslesung der Oszillation erfolgte über ein circadian reguliertes Luziferase-Reportergen-Konstrukt.

Zunächst wurden primäre Zellen, Immungewebe und Zelllinien mit einem Virus infiziert oder mit Plasmid-DNA transfiziert. Der Lentivirus bzw. die Plasmid-DNA kodieren für eine Luziferase, deren Expression von einem circadianen Promotor gesteuert wird. Doch weder durch Transduktion noch durch Transfektion konnte eine Oszillation der Luziferaseaktivität in den Zellen ausgelesen werden, da bei der Messung der Lichtemission nur ein sehr schwaches Signal detektiert wurde. Ein möglicher Grund für das schwache Luziferasesignal könnte die ungerichtete Integration des Virus oder der Plasmid-DNA, z. B. in gering exprimierende Bereiche des Genoms der infizierten Zellen sein.

Wegen der zu geringen Sensitivität des oben genannten Assays wurde in der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 versucht, eine circadiane Uhrgenexpression nachzuweisen. Diese Makrophagenzelllinie dient als Modell für die Immunsubpopulation der Makrophagen und

ist zudem durch ihre Kultivierung als Zelllinie unabhängig von systemischen Zeitgebern. Die Untersuchung mittels quantitativer PCR ergab, dass die mRNA-Mengen der Uhrgene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  in RAW 264.7 Zellen eine signifikante circadiane Oszillation aufweisen. Auch hier zeigte das Uhrgen *Bmal1* keine statistisch signifikante circadiane Oszillation, was mit dem Expressionsprofil in der Milz übereinstimmt (Abbildung 5-3). Dennoch weisen die Expressionsrhythmen der untersuchten Uhrgene und deren zeitliches Verhältnis zueinander darauf hin, dass in der Modelzelllinie RAW 264.7 ein funktionsfähiges autonomes circadianes Uhrwerk existiert. Damit kann auch für Immunzellen postuliert werden, dass eine autonome Oszillation ohne systemische „Zeitgeber“ existiert.

Um die Ergebnisse der RAW 264.7 Zelllinie weiter zu untermauern, wurden periphere Organe, in denen die Zellen in ihrem natürlichen Gewebekomplex vorliegen, daraufhin untersucht, ob eine autonome Uhrgenoszillation auch im vollständigen Gewebe vorliegt. Dazu wurden PER2::LUC knockin-Mäuse und transgene *Per1::Luc*-Ratten verwendet und deren Milz sowie Lymphknoten *ex vivo* in der Petrischale kultiviert. Beide Gewebe zeigten unter konstanten Kulturbedingungen eine circadiane Oszillation der Biolumineszenz für mehr als fünf Tage (Abbildung 5-4). Damit kann angenommen werden, dass die Organe des Immunsystems eine gewebeautonome Uhr besitzen, die nicht von systemischen Modulatoren getrieben wird und sie somit die Ergebnisse der Makrophagenzelllinie unterstützen, bei der eine unabhängige Uhrgenoszillation bereits gezeigt werden konnte.

Weiterhin wurde die autonome Uhrgenoszillation von einzelnen, aus dem Gewebeverbund heraus gelösten primäre Immunzellen untersucht. Dazu wurden Peritonealmakrophagen von PER2::LUC-Mäusen und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von *Per1::Luc*-Ratten verwendet. Gleichzeitig sollte damit geklärt werden, ob Bindegewebszellen aus der Milz oder den Lymphknoten für die Uhrgenoszillation der beiden Gewebe verantwortlich sind. Sowohl Peritonealmakrophagen als auch periphere Blutzellen zeigten eine Oszillation für mindestens drei Tage (Abbildung 5-5). Die Rhythmik der PBMCs schwingt sehr schnell aus, was entweder auf eine schnelle Desynchronisation oder auf ein schnelles Absterben der Zellen hinweisen könnte. Andererseits könnte auch eine schnelle Dämpfung der Oszillationen der Einzelzellen der Grund dafür sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Makrophagenzelllinie RAW 267.4, Immungewebe und einzelne Immunzellen eine von systemischen Faktoren unabhängige circadiane Oszillation aufweisen und damit ein gewebeautonomes Uhrwerk besitzen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit bereits publizierten Arbeiten, die ebenfalls eine autonome Oszillationen in anderen peripheren Organen/Geweben zeigen wie z. B. in der Leber, der Niere und der Hornhaut des Auges [216].

## **6.3 Circadiane Variation der Gesamtzellzahl und Zell-Zusammensetzung in der Milz**

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse postulieren, dass das Immunsystem eine circadiane Uhr besitzt. Doch spielt diese circadiane Uhr auch eine Rolle bei der Regulation von Immunfunktionen?

Zur Beantwortung der Frage wurden zunächst die Gesamtzellzahl und die Zell-Zusammensetzung in der Milz in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Unter Licht-Dunkel-Bedingungen wurde bereits in verschiedenen Arbeiten [2,96,192] eine tageszeitliche Variation der Zellzahl und einzelner Immunpopulationen im humanen sowie murinen Blut als auch in der Milz von Mäusen beschrieben. Dabei blieb aber weiterhin unklar, ob diese Variation der Zellzahl von der circadianen Uhr reguliert wird und damit ohne externe Zeitgeber wie Licht erhalten bleibt. Lediglich eine Arbeit beschreibt eine Oszillation von zirkulierenden Leukozyten im Blut von Ratten unter konstanten Bedingungen mit einem Maximum bei CT11 [50]. Das Wissen über die circadiane Zellverteilung bzw. die Anzahl an Zellen in einzelnen Immunkompartimenten unterstützt die Aufklärung von tageszeitlich unterschiedlichen Immunantworten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Gesamtzellzahl der Milz sowie der Anteil einzelner Immunpopulationen wie Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen in Abhängigkeit der Tageszeit unter sonst konstanten Bedingungen untersucht. Weiterhin wurden die Milzen von adrenaletomierten Mäusen mit dem gleichen Versuchsaufbau untersucht, um eine mögliche Rolle von Kortisol als Taktgeber bei der Regulation von zirkulierenden Immunzellen in der Milz zu analysieren. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Lymphozytenzahl und die Konzentration des Plasmakortisol in gesunden Erwachsenen eine circadiane Variation mit gegensätzlicher Phase aufweisen. Demzufolge wurde immer wieder postuliert, dass Steroidhormone eine wichtige Rolle bei der Generierung des circadianen Rhythmus von zirkulierenden Blutzellen spielen [41,111,141,197].

### **6.3.1 Circadianer Rhythmus der Gesamtzellzahl in der Milz**

Für die Analyse des circadianen Rhythmus der Gesamtzellzahl der Milz wurden die Zellen dieses Gewebes von unoperierten und adrenaletomierten C57BL/6 Mäusen gezählt. Die Gesamtzellzahl in der Milz zeigt einen circadianen Rhythmus, wobei die Oszillation bei den unoperierten Mäusen, im Gegensatz zu adx Mäusen, von dem Statistikprogramm CircWave als statistisch nicht signifikant bewertet wurde (Abbildung 5-6). Ein möglicher Grund dafür könnte die große Abweichung der Zellzahl bei den unoperierten Mäusen bei CT12 sein. Eine maximale Anzahl an Zellen konnte bei CT8 des subjektiven Tages in beiden Mausgruppen festgestellt



werden. Da die Oszillation der Gesamtzellzahl in nicht-operierten Mäusen und in adrenaletomierten Mäusen statistisch nicht voneinander zu unterscheiden ist, kann ein Einfluss von Kortisol sowohl auf die Rhythmik als auch auf die Zellzahl zu einzelnen Zeitpunkten ausgeschlossen werden.

1981 wurde von Kawate *et al.* [96] eine tageszeitliche Variation der Gesamtzellzahl in der Milz von Mäusen unter LD-Bedingungen festgestellt. Die darin beschriebene Oszillationsphase der Gesamtzellzahl der Milz stimmt mit den hier vorliegenden Ergebnissen ungefähr überein. In der gleichen Publikation wurde weiterhin gezeigt, dass die diurnale Oszillation der Gesamtzellzahl nach einer Adrenaletomie verschwindet. Kortisol wurde deshalb von Kawate *et al.* als möglicher Modulator der Oszillation beschrieben. Diese Aussage steht jedoch im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, bei der Kortisol als Zeitgeber ausgeschlossen werden konnte. Vielmehr kann von einer Regulation durch einen circadianen endogenen Mechanismus ausgegangen werden.

Mit den hier gezeigten Ergebnissen kann eine Immun-Uhr postuliert werden, die die Gesamtzellzahl in der Milz reguliert. Unterstützt wird diese Aussage unter anderem durch eine Arbeit mit mutanten *Clock* $\Delta$ 19-Mäusen. In diesen Mäusen, in denen die circadiane Uhr nicht mehr vollständig funktioniert, ist eine Verringerung der Zahl von weißen und roten Blutzellen, Lymphozyten und neutrophilen Zellen gezeigt worden. Darüber hinaus verschob sich das Maximum der Oszillation der vorher genannten Zellen zeitlich um zirka drei Stunden nach vorn. Diese Veränderung der Oszillation sowohl in der Amplitude der Anzahl der Zellen als auch in der Phase der Rhythmik wurde dem Uhrgen *Clock* zugeschrieben und damit ein Zusammenhang zwischen der Oszillation der zirkulierenden Blutzellen und der circadianen Uhr postuliert [138]. Eine alternative Erklärung für die Oszillation der Gesamtzellzahl, die nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, ist, dass der Rhythmus auch von anderen hier nicht untersuchten systemischen Faktoren getrieben sein könnte.

Im Vergleich zu Mäusen ist im humanen Blut eine umgekehrte Acrophase der Gesamtzellzahl zu beobachten. Das Maximum von mononuklären Zellen im Blut liegt dort bei ZT18, also um zirka zehn bis zwölf Stunden verschoben [2].

Zusammenfassend kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse von einer circadianen Variabilität der Gesamtzellzahl in der Milz ausgegangen werden, die nicht Kortisol-abhängig ist. Die Oszillation der Zellzahl in der Milz ist wichtig bei der Beurteilung von großen Variationen in immunologischen Ereignissen und deshalb in immunologischen Versuchen zu beachten. Dieses Problem kann umgangen werden, indem man versucht, Experimente zu gleichen zeitlichen Bedingungen durchzuführen [156].

### 6.3.2 Circadiane Oszillation der Makrophagenanzahl

Das Ergebnis der circadianen Oszillation der Gesamtzellzahl in der Milz legt nahe, dass auch einzelne Immunpopulationen innerhalb dieses Gewebes einer Oszillation unterworfen sind. Aus diesem Grund wurden einzelne Immunpopulationen auf ihre circadiane Variation hin untersucht. Dazu wurden primäre Milzzellen, die von entrainierten Tieren unter Dunkel-Dunkel-Bedingungen entnommen wurden, mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mit Hilfe der Gesamtzellzahl der Milz und der relativen Anzahl der Zellen wurde die absolute Zellzahl der jeweiligen Population errechnet. Makrophagen (CD11b- und CD14-positive Zellen) zeigen sowohl in ihrer relativen als auch in ihrer absoluten Anzahl eine statistisch signifikant circadiane Oszillation mit einem Maximum um CT4-8. Um den Einfluss von Kortisol auf die Makrophagen-Oszillation zu untersuchen, wurden adrenaletomierte Mäuse verwendet. Auch in adrenaletomierten Mäusen besteht weiterhin eine circadiane Oszillation, die statistisch nicht von unoperierten Mäusen zu unterscheiden ist (Abbildung 5-7). Damit konnte gezeigt werden, dass Kortisol keinen Einfluss auf die Oszillation der Makrophagenanzahl an sich hat. Dennoch konnte ein Einfluss auf die Zellzahl beobachtet werden. Durch das Fehlen von Kortisol in adrenaletomierten Mäusen kommt es fast zu einer Verdopplung der Makrophagenanzahl.

In einer Arbeit von Kawate *et al.* [96], bei der die tageszeitliche Oszillation von phagozytierenden Zellen in der Milz untersucht wurde, konnte eine bimodale Rhythmik gezeigt werden, die jedoch ein anderes Oszillationsmuster im Vergleich zu dieser Arbeit im Hinblick auf die Phase aufweist. Im murinen Blut dagegen zeigen phagozytierende Zellen ein ähnliches Oszillationsverhalten wie Makrophagen in der Milz [96] mit einer Acrophase bei ZT6-8. Bei humanen Monozyten oder phagozytierenden Zellen im Blut werden in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse beschrieben: von keiner Oszillation [2] bis hin zu einer Rhythmik mit einer zweifachen Amplitude [192].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine eindeutige circadiane Oszillation der Makrophagen mit einem Maximum bei CT4-8 gezeigt werden, die im Unterschied zur Interpretation von Kawate *et al.* [96] unabhängig von Kortisolrhythmen ist. Auf Grund der erhöhten Zellzahl bei CT4-8 könnte zu diesem Zeitpunkt auf eine erhöhte Sensitivität der Zellen auf bakterielle Infektionen geschlossen werden. Da Makrophagen bei der ersten Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, ist das Wissen über die circadiane Verteilung dieser Zellen in der Milz von großem wissenschaftlichem Interesse.

### 6.3.3 Circadiane Oszillation der Anzahl der B-Zellen

Mit CD19<sup>+</sup>-Zellen (B-Zellen) wurde eine zweite Immunpopulation in der Milz auf ihre circadiane Oszillation untersucht. Primäre Milzzellen von entrainierten Mäusen, die unter Dunkel-Dunkel-Bedingungen entnommen wurden, wurden mit anti-CD19-Antikörper inkubiert und die relative Zellzahl mittels Durchflusszytometrie analysiert. In der Milz zeigen CD19<sup>+</sup>-Zellen eine circadiane Oszillation in ihrer absoluten aber nicht in ihrer relativen Zellzahl (Abbildung 5-8). Das heißt, der relative Anteil der B-Zellen in der Milz ist zu jedem Zeitpunkt ungefähr gleich und liegt zwischen 50 und 60 Prozent. B-Zellen machen somit die größte Population in der Milz aus. Die absolute Anzahl der B-Zellen ist dagegen einer circadianen Oszillation unterworfen, dessen Maximum mit dem Maximum der Gesamtzellzahl korreliert.

In adrenaletomierten Mäusen hat das Fehlen von Kortisol keinen statistischen Einfluss auf die Oszillation der absoluten Zellzahl an sich, da diese weiterhin nahezu unverändert bleibt. Im Gegensatz dazu, nimmt aber die relative Zellzahl der B-Zellen in adrenaletomierten Mäusen leicht ab, womit sich statistisch ein Einfluss von Kortisol auf den relativen Anteil von B-Zellen zeigt.

Die circadiane Schwankung der B-Zellen, die den größten Anteil in der Milz haben, ist wahrscheinlich auch der Grund für die Rhythmik der Gesamtzellzahl. Da die absolute Zellzahl der B-Zellen in der Milz variiert, der relative Anteil aber konstant bleibt, müssen die Zellen tageszeitlich unterschiedlich stark in die Milz hinein- und herauswandern. Das heißt, das Maximum der Gesamtzellzahl könnte von der erhöhten Anzahl an B-Zellen verursacht werden.

In der Arbeit von Kawate *et al.* [96] wurde eine Rhythmik des relativen Anteils von B-Zellen gezeigt, die die Autoren als circadian interpretierten. Allerdings sollte dieses Ergebnis anders interpretiert werden, weil erstens die Rhythmik eine sehr geringe Amplitude aufweist, zweitens große Standardfehler zu verzeichnen sind und drittens die Existenz einer circadianen Oszillation statistisch nicht nachgewiesen wurde. Auf Grund der Neu-Interpretation der Ergebnisse von Kawate *et al.* wird auf eine Nicht-Oszillation der relativen Anzahl der B-Zellen geschlossen. Damit konnte das in der Arbeit von Kawate *et al.* erzielte Ergebnis bestätigt werden. Lediglich die Prozentangaben des relativen Anteils der B-Zellen (28 - 34 Prozent) lagen deutlich unter den hier gefundenen (50 – 60 Prozent). Auch in der Arbeit von Kurepa *et al.* [106] konnte keine tageszeitliche Oszillation bei der relativen Anzahl von B-Zellen in der Milz aufgenommen werden. Das gleiche Resultat fand man in der Milz von Ratten [91].

Im Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit keine Oszillation in der relativen Zellzahl der B-Zellen gefunden werden. Ergebnisse aus der Literatur, die unter Licht-Dunkel-Bedingungen gemacht wurden, konnten somit bestätigt werden. Allerdings konnte hier erstmals gezeigt werden, dass eine circadiane Oszillation in der absoluten Zahl von B-Zellen existiert. Ein Einfluss von Kortisol auf das Oszillationsverhalten der absoluten Zahl der B-Zellen konnte

ebenso nicht gezeigt werden. In adrenaletomierten Mäusen besteht weiterhin eine circadiane Oszillation der absoluten Anzahl von B-Zellen.

### 6.3.4 Circadiane Oszillation der Anzahl der T-Zellen

Als dritte Subpopulation in der Milz wurde die circadiane Oszillation der CD90.2<sup>+</sup>-Zellen (T-Zellen) untersucht. T-Zellen zeigen eine statistisch signifikant circadiane Oszillation in ihrer relativen Anzahl in der Milz, aber nicht in ihrer absoluten Zahl. In adrenaletomierten Mäusen persistiert die Oszillation der relativen Anzahl an T-Zellen auch nach Wegfall von Kortisol (Abbildung 5-9). Somit hat Kortisol keinen statistisch regulatorischen Einfluss auf das Oszillationsverhalten des relativen Anteils der T-Zellen in der Milz. Obwohl Kortisol keinen Einfluss auf das Oszillationsverhalten von T-Zellen an sich besitzt, besteht doch ein signifikanter Einfluss auf die relative Zellzahl der T-Zellen, d. h. die Oszillation an sich bleibt bestehen, aber auf einem etwas höheren Level. Kortisol hat dagegen keinen Einfluss auf die absolute Zellzahl ( $p > 0,05$ ) der T-Zellen in der Milz.

Die hier gezeigten Ergebnisse stehen im Gegensatz zur Arbeit von Kurepa *et al.* [106], bei der keine Oszillation in der relativen T-Zellzahl in der Milz gezeigt werden konnte. Doch für die zitierte Arbeit wurden CBA-Mäuse verwendet, während in der hier vorliegenden Arbeit C57BL/6 Mäuse zum Einsatz kamen. Bei Kawate *et al.* [96] wurden wiederum C3H/HeN Mäuse verwendet, deren relative Milz-T-Zellen ebenfalls nur eine sehr schwache tageszeitliche Schwankung mit einem Maximum bei ZT12 aufweisen. Mittlerweile ist aber bekannt, dass Oszillationen der Blutzellen vom Mausstamm und vom Geschlecht abhängig sein können [72,135]. Für die T-Zellzahl-Oszillationen in der Milz trifft dies möglicherweise auch zu. Im Gegensatz dazu stimmen die Ergebnisse für Makrophagen und B-Zellen mit den publizierten Arbeiten überein und sind deshalb wahrscheinlich mausstamm-unabhängig. Die vorliegenden Ergebnisse für T-Zellen auf der Basis von C57BL/6 Mäusen können daher nur bedingt mit anderen wie Kawate oder Kurepa *et al.* verglichen werden.

Ebenso kann man unterschiedliche Antikörper als Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ausschließen, weil sie sowohl in beiden zitierten Arbeiten (Kurepa und Kawate) als auch in der vorliegenden Arbeit gleich sind. Bei allen drei Untersuchungen wurde der Thy1.2-Antikörper (anti-CD90.2-Ak) benutzt.

Im Vergleich zu anderen Immunkompartimenten konnte im Blut von Mäusen ebenso eine tageszeitliche Oszillation von T-Zellen mit einem Maximum bei ZT6 gezeigt werden [96]. Bei Ratten dagegen konnte keine Oszillation der relativen Zahl der T-Zellen in der Milz aufgenommen werden [91].

Eine circadiane Oszillation konnte für den relativen Anteil an T-Zellen in der Milz hier das erste Mal gezeigt werden. Diese Oszillation bleibt auch in adrenaletomierten Mäusen bestehen. Damit steht die Oszillation des relativen Anteils der T-Zellzahl im Gegensatz zur Literatur, bei der keine Oszillation beschrieben wurde. Da aber mit der verwendeten Methode (Durchflusszytometrie) bereits Ergebnisse aus der Literatur für andere Immunzellpopulationen bestätigt werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass der Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse in den verwendeten Mausstämmen liegt.

Die Ergebnisse aus der Literatur und die in dieser Arbeit gezeigten Daten in Mäusen zeigen eine um 180 Grad verschobene Acrophase der einzelnen Immunzellpopulationen im Vergleich zum menschlichen Blut. Im Gegensatz dazu ist die Expressionsphase der Uhrgene *Per2* und *Rev-Erb $\alpha$*  im SCN fast identisch zwischen nachtaktiven [146,166] und tagaktiven Säugetieren [30,44,129]. Die Uhrgenexpression von *Per1* in Immunzellen von tag- und nachtaktiven Organismen (murinen Knochenmarkzellen, periphere humane Blutzellen) besitzt ebenfalls die gleiche Phase [23,37,66,107]. Da der Zeitpunkt der maximalen Anzahl der Immunzellen in nacht- und tagaktiven Organismen gegensätzlich ist, kommt ihm eine besondere Bedeutung zu. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Maxima der Immunzellpopulationen in tag- bzw. nachtaktiven Organismen ist, dass neben dem SCN oder einer lokalen Uhr noch andere physiologische Rhythmen wie Körpertemperaturrhythmen oder systemische Rhythmen aber auch Futterangebot und lokomotorische Aktivität eine wichtige Rolle als Zeitgeber spielen könnten. Der systemische Zeitgeber Kortisol, der eine gegensätzliche Acrophase in tag- und nachtaktiven Säugetieren besitzt, kann hierbei ausgeschlossen werden, da in adrenaletomierten Mäusen die gleichen Ergebnisse wie in unoperierten Mäusen erzielt wurden. Eine Anpassung der Zellzahl an das tägliche Infektionsrisiko entsprechend der Aktivitätsphase ist ebenfalls möglich.

Der SCN steuert zwar rhythmische physiologische Prozesse im Körper, doch ein anderes Zentrum muss für das „Umschalten“ der Signale verantwortlich sein. Im Moment ist aber noch unklar, welche Signale für die Tag- oder Nachtaktivität verantwortlich sind. Ebenso ist noch nicht bekannt, wo das Umschaltzentrum liegt und wie seine genauen Mechanismen sind. Der SCN speist zwar dieses Zentrum mit Informationen, doch er kann nicht allein für die unterschiedlichen Acrophasen der Immunzellen in tag- und nachtaktiven Organismen verantwortlich sein.

Die Organisation der Immunpopulationen in der Milz scheint genau und vorhersagbar reguliert zu sein, da Ergebnisse aus vorherigen Experimenten, die unter Licht-Dunkel-Bedingungen durchgeführt wurden, mit den hier vorgestellten Ergebnissen bestätigt und sogar weiter untermauert werden konnten. Da die hier gezeigten Experimente unter konstanten Bedingungen durchgeführt wurden, kann Licht als Zeitgeber für die Oszillation der Anzahl der

Immunpopulationen ausgeschlossen werden. Auch ein statistischer Unterschied zwischen der Oszillation der Zellen von adrenaletomierten Mäusen und nicht-operierten Mäusen wurde nicht festgestellt, womit das Hormon Kortisol ebenfalls als Zeitgeber für die Oszillation ausgeschlossen werden kann. Zwar ist eine Regulation über andere systemische Faktoren möglich, sie wurde aber in dieser Arbeit nicht untersucht. Eine Regulation über eine intrinsische Uhr im Immunsystem, die die Gesamt-Zellzahl und die Anzahl der einzelnen Immunpopulationen steuert, ist vorstellbar.

## 6.4 Stimulation von Immunzellen

Die Analyse der rhythmischen Immunantwort, die eine Relevanz für die Krankheitsursache oder für Reaktionen des Körpers auf eine Krankheit haben könnte, wurde bislang sehr wenig untersucht, obwohl bekannt ist, dass es eine tageszeitlich schwankende Zahl an Immunzellen gibt. Bakterielle Infektionen aktivieren die angeborene und adaptive Immunantwort. Die Erkennung des LPS von gram-negativen Bakterien erfolgt dabei über den Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4), der hauptsächlich auf Makrophagen exprimiert wird. Dies führt zu einer Aktivierung einer Signaltransduktionskette, die in der Sekretion von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-1 und  $\text{IFN}\beta$  enden. Da eine autonome circadiane Uhr in Zellen und Geweben des Immunsystems gefunden wurde, stellt sich die Frage, ob diese Uhr spezifische lokale Funktionen im Immunsystem reguliert, z. B. die Zytokinantwort auf Stimulatoren wie LPS oder Concanavalin A.

Eine tageszeitlich unterschiedliche Reaktion auf einen Stimulus konnte bereits Halberg *et al.* [76] 1960 zeigen. Er beobachtete, dass unterschiedliche Zeitpunkte der Applikation des *Escherichia coli*-Endotoxin unterschiedliche Sterberaten der Mäuse bewirken. Die Mäuse zeigen eine maximale Sterberate, wenn das LPS am Ende der Licht- oder Ruhephase verabreicht wird, wogegen sie fast keine Reaktion auf LPS zeigen, wenn es in der Mitte der Aktivitäts- oder Dunkelphase verabreicht wird. Dabei sind vermutlich  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 neben anderen Zytokinen für den septischen Schock, das anschließende Multiorganversagen und damit für den Tod der Tiere verantwortlich. Aus diesem Grund wurden die für den Tod der Tiere relevanten Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 auf ihre circadiane Sekretion auf LPS untersucht.

Um zu testen, ob es eine circadiane Sekretion von Zytokinen auf einen Stimulus wie LPS gibt, wurden primäre Milzzellen und primäre Peritonealmakrophagen zu unterschiedlichen circadianen Zeiten stimuliert. Als Stimulus wurde LPS gewählt, weil es durch die Interaktion mit dem TLR4 auf den Makrophagen für die Induktion von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 bekannt ist [154]. Zudem erfolgt die Bildung dieser Zytokine innerhalb von vier Stunden nach Stimulation. Weiterhin sind Makrophagen Teil der initialen

Immunantwort bei einem Kontakt mit Antigenen und bewirken weitere Immunreaktionen im Organismus. Bei einer möglichen circadianen Regulation des Immunsystems sind diese Zellen also sehr wichtig, da viele weitere Immunreaktionen von diesen Zellen ausgelöst werden. Desweiteren wurden primäre Milzzellen mit Concanavalin A stimuliert, was zur Ausschüttung von  $\text{IFN}\gamma$  führte.

#### **6.4.1 Circadiane Zytokinsekretion von primären Milzzellen nach Stimulation mit LPS**

In der vorgelegten Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die LPS-induzierte Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 in primären Milzzellen eine circadiane Oszillation aufweist. Dazu wurden unter konstanten Bedingungen entnommene primäre Milzzellen in 4-Stunden-Intervallen mit LPS stimuliert und  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 im Kulturüberstand gemessen. Bei CT8 erreichen beide Zytokine ihr Sekretionsmaximum, bei CT16 ihr Minimum (Abbildung 5-10).

Mit diesen Ergebnissen können die unterschiedlichen Sterberaten bei den zuvor beschriebenen Versuchen von Halberg *et al.* [76] auf molekularer Ebene erklärt werden. Die Mäuse zeigen eine Sterberate, wenn sie um ZT9 mit LPS stimuliert werden. Auch primäre Milzzellen reagieren bei Stimulation mit LPS um CT8 mit einer maximalen Ausschüttung an  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6. Dies lässt die Vermutung zu, dass die hohe Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 nach Stimulation mit LPS ein Multiorganversagen und damit die hohe Sterberate zu dieser Tageszeit auslöst. Ebenfalls im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen steht die tageszeitlich unterschiedliche Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen oder phagozytierenden Zellen. In Mäusen ist die Phagozytoseaktivität dieser beiden Zelltypen in der Mitte der Ruhephase am größten [84,100]. Dadurch kann zusätzlich suggeriert werden, dass murine Makrophagen in der Mitte des subjektiven Tages eine erhöhte Phagozytoseaktivität und damit eine erhöhte Sensitivität gegenüber LPS haben.

Normalisiert man allerdings die Zytokinausschüttung auf die vorhandene Makrophagenzahl in der Milz, ergibt sich ein etwas anderes Oszillationsmuster. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung pro Makrophage ist nach Normalisierung bei CT16 am höchsten. Zu diesem Zeitpunkt sind auch die wenigsten Makrophagen in der Milz vorhanden. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Kompensation des Immunsystems auf Infektionen. Das bedeutet, dass wahrscheinlich die geringe Anzahl der Makrophagen in der Milz zu diesem Zeitpunkt durch eine größere Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  ausgeglichen wird, damit das Immunsystem bei einer Stimulation ausreichend reagieren kann.

#### 6.4.2 TNF $\alpha$ -Sekretion von Peritonealmakrophagen nach LPS-Stimulation

Die oben diskutierten Ergebnisse zeigen Zytokin-Sekretionen von primären Zellen der gesamten Milz. Um zu zeigen, dass die circadiane Oszillation von TNF $\alpha$  und IL-6 hauptsächlich von Makrophagen ausgebildet wird, wurden Peritonealmakrophagen mit LPS stimuliert. Bei dieser Stimulation konnte keine statistisch signifikant circadiane Sekretion von TNF $\alpha$  festgestellt werden (Abbildung 5-11). Auf die Messung von IL-6 wurde verzichtet. Die fehlende circadiane Oszillation ist wahrscheinlich auf die schwierige Zellgewinnung zurück zu führen. Eine Normalisierung auf die tatsächliche Anzahl der Makrophagen war nicht möglich, da sich adhärenzte Makrophagen sehr schlecht von der Kulturschale ablösen lassen. Auch andere Normalisierungen mit Hilfe des Proteingehaltes oder Daten der Durchflusszytometrie brachten keine Veränderung der Rhythmik. Eine eindeutige Aussage über das circadiane Sekretionsverhalten von Peritonealmakrophagen kann wahrscheinlich nur an Hand einer einheitlichen „reinen“ Population von Makrophagen gemacht werden. Eine andere mögliche Erklärung für das Ergebnis wäre, das Peritonealmakrophagen ein anderes Sekretionsverhalten haben als Milzmakrophagen. Dass Peritonealmakrophagen eine circadiane Uhr besitzen, die Immunfunktionen beeinflussen könnte, wurde bereits durch die hier vorgestellten circadianen Biolumineszenzdaten der Peritonealmakrophagen von PER2::LUC-Mäusen gezeigt. Auch die Gruppe um Hayashi *et al.* [84] konnte in peritonealen Makrophagen eine diurnale Expression von Uhrgenen zeigen. Eine tageszeitlich unterschiedliche Phagozytoseaktivität und eine diurnale Schwankung der mRNA von verschiedenen Zytokinen konnte ebenfalls in diesen Zellen nachgewiesen werden [84,100].

Immunantworten beim Menschen auf einen Stimulus wurden hingegen besser untersucht. Eine ältere Arbeit zeigt zum Beispiel eine tageszeitlich unterschiedliche Immunantwort auf Tuberkulin mit einer maximalen Hautreaktion bei ZT7 mit einer 2,5fachen Amplitude gegenüber ZT22 [40]. Im humanen Blut wurden ebenfalls Stimulationen mit LPS durchgeführt. Die Zytokine IFN $\gamma$  und IL-8 zeigten daraufhin eine diurnale Oszillation, aber weder für TNF $\alpha$  noch für IL-6 konnte eine signifikante Oszillation gefunden werden [86]. TNF $\alpha$  zeigt lediglich eine schwache Oszillation mit einer sehr geringen Amplitude und mit einem Maximum in der Mitte der Ruhephase. Diese früheren Ergebnisse sind genau um 180 Grad verschoben zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Der Grund dafür liegt möglicherweise an der umgekehrten Phase der Zellzahloszillationen.



### 6.4.3 IFN $\gamma$ -Sekretion von primären Milzzellen nach Concanavalin A-Stimulation

Um zu testen, ob auch T-Zellen nach einer Stimulation Zytokine circadian sekretieren, wurden primäre Milzzellen mit dem T-Zell-spezifischen Mitogen Concanavalin A behandelt. Diese sekretieren daraufhin IFN $\gamma$ . Der Prozess der Stimulation dauert mindestens 24 Stunden oder länger. Bei der Stimulation von primären Milzzellen mit Concanavalin A konnte keine statistisch signifikant circadiane Sekretion gezeigt werden (Abbildung 5-12). Dennoch ist ein rhythmischer Trend der Sekretion zu erkennen, mit einem Maximum bei CT0 und einem Minimum bei CT12. Da die Abweichungen der Sekretion bei CT0 jedoch sehr groß sind, bewertet das Statistikprogramm CircWave möglicherweise deshalb die Oszillation als nicht signifikant. Eine andere mögliche Ursache für die statistische Nicht-Signifikanz könnte die Zeitspanne der Stimulation der Zellen mit dem Mitogen sein. Entweder wurden die Zellen nicht lang genug mit Concanavalin A stimuliert oder die Zellen wurden zu lange mit dem Stimulus inkubiert. Literaturangaben zu Folge ist eine Inkubation der Zellen von 24 Stunden üblich, was auch hier erfolgte. Weiterhin zeigten Vorversuche mit ConA erst nach einer Inkubation von 24 Stunden eine messbare Zytokinkonzentration. Andererseits ist ConA vielleicht ungeeignet für den Test, um eine circadiane Sekretion in T-Zellen hervorzurufen. Ebenso ist vorstellbar, dass generell keine circadiane Sekretion von IFN $\gamma$  von T-Zellen existiert.

Diese letzte Erklärung ist aber unwahrscheinlich, da bereits Petrovsky *et al.* [148] in einem anderen System eine tageszeitlich unterschiedliche Sekretion von IFN $\gamma$  zeigen konnte. Dabei wurde humanes Blut mit einem Tetanustoxin stimuliert. Ein weiteres Beispiel zeigte Esquefino *et al.* [57] mit einer tageszeitlich variierenden Sekretion von IFN $\gamma$  in Rattenlymphknoten, allerdings ohne Stimulation. Auch eine tageszeitliche Oszillation der IFN $\gamma$  mRNA in der Milz konnte bereits beobachtet werden [10]. Dieser Rhythmus der mRNA verschwindet allerdings in mutanten Per<sup>Brdml</sup>-Mäusen, wogegen er für die mRNA des Zytokins *Perforin* beibehalten wird. Unterschiedliche Mechanismen scheinen die Zytokintranslation zu regulieren, die aber dennoch darauf hinweisen, dass Zytokine von der circadianen Uhr reguliert werden könnten.

Zusammenfassend kann mit den hier gezeigten Ergebnissen keine eindeutige Aussage über das circadiane Sekretionsverhalten von T-Zellen in der Milz gemacht werden. Dennoch liefern die Ergebnisse weitere Hinweise auf eine funktionelle circadiane Uhr im Immunsystem.

## 6.5 Abkopplung der Zellen von körpereigenen Signalen bei der Stimulation

Obwohl Zellen und Gewebe des Immunsystems eine gewebeautonome circadiane Uhr besitzen, könnten auch humorale systemische Faktoren (Zeitgeber) die Outputmechanismen des Immunsystems beeinflussen oder steuern. So werden rhythmische Zytokinsekretionen fast immer mit der circadianen Sekretion von Kortisol in Verbindung gebracht [83,86,149,175]. Kortisol ist bei Mäusen zu Beginn der Dunkel- bzw. Aktivitätsphase am höchsten, nimmt im Laufe der Nacht wieder ab und ist in der Lichtphase am geringsten. Beim Menschen ist Kortisol ebenfalls in der Aktivitätsphase am höchsten, nur entspricht dies der Lichtphase. Da die gemessene sekretierte  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Konzentration am subjektiven Tag am höchsten (geringe Konzentration von Kortisol) und in der subjektiven Nacht am niedrigsten ist, wäre eine supprimierende Wirkung von Kortisol auf die Zellen des Immunsystems, insbesondere auf Makrophagen, möglich.

Als weiterer Zeitgeber könnte theoretisch Melatonin fungieren. Dieses Hormon kann aber ausgeschlossen werden, da in C57BL/6 Mäusen kein Melatonin mehr nachweisbar ist. Auch ein Einfluss der Körpertemperatur auf die Ausschüttung von Zytokinen ist in der Literatur beschrieben [217] worden. Dies würde mit den Ergebnissen von Brown *et al.* in Einklang stehen, der zeigte, dass periphere Uhren durch Körpertemperaturrhythmen entrainiert werden können [25]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Zytokinproduktion vom Schlaf beeinflusst wird [19,202]. Da diese Prozesse (Kortisol, Körpertemperatur, Schlaf, Aktivität) aber alle vom SCN gesteuert und koordiniert werden, ist wahrscheinlich eine intrinsische Immun-Uhr für die circadiane Steuerung der Sekretion von Zytokinen verantwortlich.

Um zu untersuchen, ob es bei einer teilweisen oder gänzlichen Abkopplung von körpereigenen Signalen weiterhin zu einer circadianen Sekretion der Zytokine kommt, wurden Zellen/Gewebe *ex vivo* unter konstanten Bedingungen kultiviert.

### 6.5.1 Stimulation einer primären Lang-Zeit-Milzzellkultur mit LPS

Zur Beantwortung der Frage, ob es bei einer Abkopplung von systemischen Signalen weiterhin zu einer circadianen Sekretion der Zytokine kommt, wurden zunächst primäre Makrophagen in einer Langzeitkultur mit LPS stimuliert. Damit sind die Zellen unabhängig von systemischen Zeitgebern des Körpers. Es konnte keine statistisch signifikant circadiane  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion von einer primären Milzzellkultur nachgewiesen werden (Abbildung 5-13). Jedoch ist eine Zunahme der  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Überstand der Zellkultur zu erkennen, die zudem einer geringen tageszeitlichen Rhythmik unterliegt. Diese Rhythmik ist aber statistisch nicht signifikant. Die

Zunahme der  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand könnte mit der zunehmenden Reifung der Zellen, insbesondere der Makrophagen zu erklären sein. „Reifende“ Zellen produzieren mehr  $\text{TNF}\alpha$  pro Zelle. Eine eventuelle vorhandene Rhythmik ist durch die generell zunehmende Sekretion des Zytokins maskiert. Zusätzlich spricht auch die  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion der unstimulierten Zellen für eine zunehmende Reifung der Zellen. Eine eindeutige Aussage über eine systemische oder autonom circadian regulierte Sekretion von Zytokinen konnte mit dieser Herangehensweise jedoch nicht getroffen werden.

### **6.5.2 Circadiane $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Sekretion von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen nach Stimulation mit LPS**

Bislang wurde in der Literatur meist spekuliert, dass Kortisolrhythmen für die unterschiedliche Sterberate der Mäuse nach einer Stimulation und damit für die tageszeitlich unterschiedliche Abgabe der Zytokine verantwortlich sind [83,86,149,175]. Die Kortisol-Konzentration weist eine circadiane Rhythmik im Blut auf. Es erreicht sein Maximum in Mäusen zum Aktivitätsbeginn, das heißt zu Beginn der Dunkelphase. Beim Menschen zeigt Kortisol ebenso sein Maximum zu Beginn der Bewegungsaktivität, was aber dem Beginn der Lichtphase entspricht. Kortisol wirkt unter anderem immunsupprimierend, d. h. es unterdrückt die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  durch Regulation der Translation und Transkription des Zytokins [94]. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Zahl der circadian regulierten Gene in der Leber von adrenaletomierten Mäusen im Vergleich zu sham-operierten Mäusen drastisch reduziert ist [136]. Somit kann Kortisol direkt als Zeitgeber für viele rhythmisch exprimierte Gene wirken. Weiterhin korrelieren die rhythmisch immunsupprimierende Wirkung des Kortisols und die Ergebnisse der LPS-Stimulation in nicht-operierten Mäuse indirekt miteinander. Ist die Konzentration von Kortisol im Plasma hoch, ist die Zytokinausschüttung der Zellen nach LPS-Stimulation gering und umgekehrt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun getestet, ob der systemische Faktor Kortisol die Sekretionsmuster von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 beeinflusst. Für diese Untersuchung wurden adrenaletomierte Mäuse verwendet. Deren primäre Milzzellen zeigen nach Stimulation mit LPS eine ähnliche circadiane Oszillation der sekretierten Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 wie unoperierte Mäuse. Beide weisen eine statistisch signifikante Oszillation auf, deren Maximum bei ungefähr CT12 liegt (Abbildung 5-15). Kortisol hat damit keinen Einfluss auf das circadiane Sekretionsverhalten der beiden Zytokine nach LPS-Stimulation. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass ein Makrophagen-intrinsisches Uhrwerk die Zytokinsekretion reguliert. Dennoch können auch andere systemische Faktoren für eine Regulation nicht ausgeschlossen werden, die in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht wurden.

Eventuell könnte Kortisol eine Rolle bei der Phase der Sekretion zugesprochen werden, weil sich das Maximum der sekretierten Zytokine in adrenaletomierten Mäusen leicht verschiebt. Da aber die Mess-Intervalle vier Stunden betragen, kann kein genaues Maximum ermittelt werden, sondern nur eine Zeitspanne, in der die Zytokinsekretion maximal war. Da es sich nur um eine leichte Verschiebung des Maximums handelt, kann Kortisol nur eine minimale oder gar keine Wirkung auf die Phase haben.

Kortisol scheint aber einen Einfluss auf die Sekretionsmenge von IL-6 zu haben. Sie ist bei adrenaletomierten Mäusen fast doppelt so hoch, wie in nicht-operierten Mäusen. Im Gegensatz dazu besitzt Kortisol keinen Einfluss auf die Sekretionsmenge von  $\text{TNF}\alpha$ . Kortisol kann demnach eine gewisse immunregulierende Wirkung für IL-6 in Bezug auf die Sekretionsmenge zugesprochen werden, aber es hat keinen Einfluss auf die circadiane Sekretion der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 nach LPS-Stimulation.

Bei der Normalisierung der sekretierten Zytokine von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen auf die Makrophagenanzahl in der Milz dieser Mäuse ergibt sich das gleiche Sekretionsmuster wie ohne Normalisierung. Bei CT12 wird pro Makrophage die höchste Menge an  $\text{TNF}\alpha$  ausgeschüttet. Im Gegensatz zu nicht-operierten Mäusen kann hier keine kompensatorische Wirkung der Zellzahl auf das System beobachtet werden.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass wahrscheinlich nicht Kortisol als Immunmodulator, sondern ein Makrophagen-intrinsisches Uhrwerk die circadiane Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 reguliert.

### **6.5.3 Circadiane Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ nach Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS**

Um neben Kortisol weitere systemische Faktoren auszuschließen, die die Sekretion der Zytokine regulieren könnte, muss auf ein Zellkultursystem zurückgegriffen werden. Da viele systemische Signale in der Maus neben einer möglichen circadianen Regulation der Zytokinsekretion auch andere überlebenswichtige Funktionen besitzen, ist es unmöglich, alle systemischen Signale, die für eine Regulation in Frage kommen, auszuschalten. Deshalb wurden Versuche unternommen, die circadiane Sekretion von Zytokinen in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 nachzuweisen. Diese Zelllinie zeigt, wie oben erwähnt, eine circadiane Uhrgenexpression und ist deshalb geeignet, mögliche Funktionen der potentiellen circadianen Immun-Uhr – wie Zytokinsekretion nach Stimulation – zu testen.

Dazu wurden je Zeitpunkt synchronisierte Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 vier Stunden mit LPS stimuliert. Diese Stimulation führte zu einer statistisch signifikant circadianen Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  in das Kulturmedium (Abbildung 5-16). Jedoch kann auch

bei den unstimulierten Zellen eine  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion beobachtet werden, was für eine sehr hohe Sensitivität der Zellen gegenüber LPS spricht. Aufgrund der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die Zytokinsekretion in RAW 264.7 Zellen von der circadianen Uhr und nicht von systemischen Faktoren reguliert wird, da sie in der Kulturschale abgekoppelt von humoralen oder neuronalen Signalen des Körpers kultiviert werden. Die Möglichkeit der Stimulation und die darauf folgende circadiane Sekretion von Zytokinen erheben die RAW 264.7 Zellen zu einem Modellsystem für die Untersuchung der molekularen circadianen Abläufe in Immunzellen.

Weitere Hinweise für eine circadiane Uhr im Immunsystem, die bestimmte Funktionen reguliert, konnten bereits andere Gruppen zeigen. So wurde beobachtet, dass bei einer Stimulation von *Per2*-Knockout-Mäusen mit LPS zu unterschiedlichen Tageszeiten im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen fast alle Mäuse überlebten, egal zu welcher Zeit sie stimuliert wurden [76,113]. Damit haben *Per2*-Knockout-Mäuse die gleiche Unempfindlichkeit gegenüber LPS wie *Tlr4*-Knockout-Mäuse, was auf eine Regulation des Uhrproteins PER2 auf den TLR4-Signalweg hinweist. Gleichzeitig sind viele proinflammatorische Zytokine nach der Stimulation in *Per2*-Knockout-Mäusen drastisch reduziert [113]. Damit wird, wie bereits erwähnt, vermutet, dass die Zytokinsekretion von der circadianen Uhr reguliert wird. In einem weiteren Beispiel konnte gezeigt werden, dass *Bmal1* für die B-Zellentwicklung notwendig ist [189].

#### **6.5.4 IFN $\gamma$ -Sekretion nach Concanavalin A-Stimulation von primären Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen**

Weiterhin wurde untersucht, ob Kortisol die Sekretion von IFN $\gamma$  beeinflusst. Dafür wurden primäre Milzzellen aus adrenaletomierten Mäusen mit dem Mitogen Concanavalin A stimuliert. Bei der Stimulation der T-Zellen mit Concanavalin A aus adrenaletomierten Mäusen lag keine circadiane Oszillation vor (Abbildung 5-17). Das Muster der Sekretion sieht zudem im Vergleich zu unoperierten Mäusen völlig unterschiedlich aus. Eine Aussage über eine Regulation von Kortisol auf das rhythmische Sekretionsverhalten von T-Zellen kann nicht getroffen werden.

### **6.6 Globale Genexpression in CD11b<sup>+</sup>-Zellen**

Im Moment ist bereits bekannt, dass in anderen peripheren Geweben wie Leber oder Herz bis zu zehn Prozent des gesamten Transkriptomts von der circadianen Uhr reguliert sind [143,187]. Dabei überlappen sich die potenziell circadianen Gene aus den beiden Geweben nur sehr gering. Eine Untersuchung über eine circadiane Beeinflussung des Immunsystems ist bislang nicht bekannt. Um eine generelle Vorstellung zu bekommen, wie und in welchem Umfang die

circadiane Uhr auf das Immunsystem und seine Funktionen wirkt, wurde eine Expressionsanalyse von Immunzellen mit Hilfe von Microarrays durchgeführt.

Als Zeitpunkte wurden CT10 und CT22 ausgewählt, weil in der Milz die Uhrgene *Rev-Erb $\alpha$*  und *Per2* maximal um CT9 und CT12-15 bzw. minimal zu CT22 exprimiert werden. Als geeignete Subpopulation wurden CD11b<sup>+</sup>-Zellen ausgesucht, weil diese Zellen nach magnetischer Zellsortierung, ähnlich wie in der Milz, einen signifikanten Unterschied zwischen CT10 und CT22 des Uhrgens *Rev-Erb $\alpha$*  (Abbildung 5-21) zeigen. *Per2* zeigte zu diesen Zeitpunkten in CD11b<sup>+</sup>-Zellen keinen signifikanten Unterschied. Dies ist möglich, da *Per2* in der Milz eine um drei Stunden verschobene Phase zu *Rev-Erb $\alpha$*  aufweist und dadurch möglicherweise nicht beim Maximum und Minimum der Genexpression gemessen wurde. Ein weiterer Grund, warum CD11b<sup>+</sup>-Zellen ausgesucht wurden, ist, dass nach Auswertung der Uhrgenexpression in B- und T-Zellen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 kein signifikanter Unterschied in den Uhrgenen zu beobachten war (Abbildung 5-19).

Für die Analyse der Genexpression wurden CD11b<sup>+</sup>-Zellen aus den Milzen von je vier Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 isoliert. Die Expressionsanalyse, d. h. die Hybridisierung der Proben auf dem Array und die Auswertung der Roh-Daten erfolgte in Kooperation mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité.

Mit Hilfe von verschiedenen Kriterien (siehe Methoden) wurden insgesamt 1317 Gene in CD11b<sup>+</sup>-Zellen als reguliert gefunden. Um diesen Genen eine Funktion zu zuordnen und sie innerhalb eines Gennetzwerkes einzuordnen, wurden sie weiter mit Hilfe der Genontologie ausgewertet (Abbildung 5-22).

Zu den Zeitpunkten CT10 und CT22 sind in CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der Kategorie der biologischen Prozesse zirka 20 bis 30 Prozent der Gene, die an metabolischen und zellulären Prozessen beteiligt sind, reguliert. Sie machen in dieser Kategorie der Genontologie den größten Teil aus. Über 20 Prozent aller Gene des lysosomalen Transportes und über 18 Prozent der Phagozytosegene sind reguliert. Nur zirka fünf Prozent aller Gene zeigen bei der Antwort auf Stimuli Unterschiede. Zu dieser Unterkategorie gehört auch der TLR4-Signalweg. Tatsächlich konnten bei der Expressionsanalyse Gene des TLR4-Signalweges gefunden werden, die einen großen Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten aufweisen (Tabelle 5-3). Diese Gene sind *Lbp*, welches ganz am Anfang der Signalkaskade steht, und *Irak4*, welches zur Weiterleitung des Signals von MyD88 auf TRAF6 verantwortlich ist. Generell ist zu bemerken, dass sehr viele Gene des TLR4-Signalweges zu CT22 herunterreguliert sind. Durch die geringere Expression der Gene des TLR4-Signalweges zu CT22 ist wahrscheinlich auch die Sekretion der Zytokine geringer. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Sekretion der Zytokine nach Stimulation mit LPS zu CT22 sein und korreliert mit den hier vorliegenden Ergebnissen, bei denen es zu einer geringen Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-6 zwischen CT16-24

kommt. Zusammenfassend kann von einer Regulation des TLR4-Signalweges durch die circadiane Uhr ausgegangen werden. Zusätzlich wird diese Hypothese durch die Daten der LPS-stimulierten Milzzellen unterstützt, bei der es zu einer circadianen Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen kommt. Zur Klärung von Details der Regulation werden allerdings weitere Analysen benötigt.

Uhrgene oder Uhr-kontrollierte Gene zeigen dagegen gar keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten und das, obwohl in der Milz zu CT10 und CT22 ein großer Unterschied in der Uhrgenexpression besteht (Tabelle 5-2). Konkret zeigen die Gene *Per2*, *Rora* und *E4bp4* einen minimalen Unterschied, wogegen die Gene *Wdr5*, *Gsk3 $\beta$*  und *Fbxl3* eine deutliche Herabregulation zu CT22 zeigen.

Im Vergleich zu anderen peripheren Geweben zeigen 9,5 Prozent aller regulierten Gene im Herz auch eine Regulation in CD11b<sup>+</sup>-Zellen. In der Leber konnten 6,5 Prozent aller circadian exprimierten Gene auch in CD11b<sup>+</sup>-Zellen reguliert gefunden werden.

Da nur zwei Datenpunkte eines circadianen Tages im Rahmen dieser untersucht wurden, ist eine tageszeitliche Regulation der hier gefundenen Gene nur unter Vorbehalt zu betrachten. Für eine eindeutige Aussage über eine circadiane Oszillation der Gene müssen mehr Datenpunkte analysiert werden. Dadurch würden möglicherweise noch weitere Gene hinzukommen, die unter einer circadianen Regulation stehen, da bei vielen Genen nicht die Acrophase mit den zwei Zeitpunkten CT10 und CT22 getroffen wurde. Die hier gefundenen Gene geben aber auf jeden Fall Ansatzpunkte zu weiteren Untersuchungen und Hinweise auf eine circadiane Regulation des Immunsystems.

## **6.7 Mögliche Mechanismen, über welche die circadiane Uhr die Zytokinsekretion steuern könnte**

Wie bereits erwähnt, gibt es viele Ansatzpunkte, über welche die circadiane Uhr die Zytokinausschüttung nach der Stimulation mit LPS regulieren kann. Eine mögliche Regulation kann zum Beispiel über die Anzahl der Makrophagen und über die Anzahl ihrer Oberflächenmoleküle, die zur Erkennung von Antigenen erforderlich sind, erfolgen. Als einer der Kandidaten für eine circadiane Regulation ist das Plasmamembran-Glykoprotein CD14 zu nennen. CD14<sup>+</sup>-Zellen konnten in der Milz circadian mit einer maximalen Zellzahl zu CT8 und einer minimalen zu CT16 nachgewiesen werden. Die Phase der Zellzahl stimmt mit der Phase der Zytokinsekretion von primären Milzzellen nach Stimulation mit LPS überein. Eine circadiane Regulation dieses Oberflächenmoleküls würde ganz am Anfang einer Immunreaktion stehen, da dieses Protein zur Erkennung von LPS notwendig ist. Eine Regulation der Zytokinsekretion würde so über die Sensitivität der Zellen auf einen Stimulus erfolgen. Ebenso wie CD14 ist auch

das Serumprotein LBP an der Erkennung von LPS und zur Präsentation am TLR4 verantwortlich. *Lbp* konnte durch Expressionsanalysen mittels Microarray in dieser Arbeit mit einer 2,4fachen Herabregulation zum Zeitpunkt CT22 beobachtet werden. Eine circadiane Transkription und Translation dieses Gens konnte jedoch noch nicht gezeigt werden. Die rhythmische Regulation dieses Proteins könnte bei gleicher Phase mit CD14 die Immunreaktion verstärken oder abschwächen. Bei einer unterschiedlichen Phase der beiden Proteine könnte es vielleicht zu einer Abschwächung der Immunreaktion kommen.

Weiterhin wurde die circadiane Expression des *TLR4* in Paneth-Zellen des Dünndarms nachgewiesen [64]. Dabei konnte ein Maximum bei CT9 und ein Minimum bei CT15 festgestellt werden. Auch die Expressionsanalyse der CD11b<sup>+</sup>-Zellen ergab eine geringe Regulation des *TLR4* zwischen CT10 und CT22. Da hier aber vielleicht mit den gewählten Zeitpunkten nicht die maximale und minimale Expression des Gens getroffen wurde, ist ein größerer Unterschied zu anderen Zeitpunkten möglich. Ein weiterer Kandidat für eine circadiane Regulation ist *Irak4*, da bei der Expressionsanalyse eine dreifache Herunterregulation zu CT22 festgestellt werden konnte. Im TLR4-Signalweg spielt die Kinase eine Rolle bei der Signalübertragung von dem Adaptermolekül MyD88 zu TRAF6. *Traf6* selbst zeigt nur eine geringe Herabregulation zu CT22. *Irak4* könnte die Signalkaskade und somit die Zytokinsekretion nach einer Stimulation mit LPS durch die An- oder Abwesenheit des exprimierten Proteins weiter circadian regulieren. Zusammen mit LBP und CD14 stellen der Erkennungsprozess von LPS und die darauf folgende Signalkaskade schon viele Angriffspunkte für eine circadiane Regulation dar. Damit könnten möglicherweise die Sensitivität der Zellen und damit die initiale Immunreaktion circadian reguliert werden.

Viele Hinweise aus der Literatur sprechen außerdem für eine circadiane Regulation der Zytokinsekretion über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. Eine rhythmische Expression des Transkriptionsfaktors und seiner Komponenten p65 und p50 konnte zwar noch nicht gezeigt werden, dafür aber eine aktivierende Regulierung der NF $\kappa$ B-Aktivität durch BMAL1 [84]. Die Aktivität wird zudem noch durch den Phosphorylierungsstatus der Untereinheiten reguliert, der wiederum circadian reguliert sein könnte [219]. Zusätzlich wurde REV-ERB $\alpha$  als Inhibitor von NF $\kappa$ B-abhängigen Genen in Muskelzellen beschrieben, die zu einer Herunterregulation von proinflammatorischen Zytokinen führte [123]. Damit sind bereits zwei Uhr Gene mit einer gegensätzlichen Wirkung (Aktivierung, Inhibition) auf das Immunsystem beschrieben worden. Wenn die Aktivität von NF $\kappa$ B circadian reguliert sein sollte, sind wahrscheinlich auch weitere NF $\kappa$ B-abhängige Prozesse, wie einige Zytokinproduktionen von der Regulation betroffen. So wurden in der Promotorregion des TNF $\alpha$ -Gens vier NF $\kappa$ B-Bindungsstellen identifiziert [52], die zu einer circadianen Transkription des Zytokins führen könnten, wenn der Transkriptionsfaktor



NF $\kappa$ B circadian binden würde. Eine circadiane Regulation der Sekretion kann damit leider nicht bewiesen werden, da zusätzlich Sekretionsprozesse circadian reguliert sein könnten.

Ein weiterer Kandidat für eine circadiane Regulation ist die Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). GSK3 $\beta$  ist ein Homolog zu *Shaggy* aus *Drosophila* und kann im Säugetiersystem PER2, CRY2 und REV-ERB $\alpha$  phosphorylieren [89,105,215]. Zusätzlich unterstützt es den Kernimport. Im Immunsystem supprimiert diese Kinase die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit LPS und schützt so vor einem endotoxischen Schock, während es die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen steigert [118]. GSK3 $\beta$  wurde in den Microarray-Experimenten als reguliert mit einem mehr als zweifachen Unterschied zwischen CT10 und CT22 gefunden.

Die Regulation der circadianen Sekretion der Zytokine nach Stimulation mit LPS wird jedoch nicht allein über ein einziges Molekül stattfinden, wahrscheinlicher ist vielmehr ein Zusammenspiel vieler Komponenten. Die hier genannten Moleküle geben aber Hinweise für weitere Untersuchungen. Der detaillierte Mechanismus, durch den die circadiane Uhr auf das Immunsystem wirkt, muss durch weitere Analysen charakterisiert werden.

## 6.8 Die Rolle der circadianen Uhr im Immunsystem

Es gibt immer mehr Hinweise, dass eine circadiane Uhr im Immunsystem existiert. Doch macht eine Oszillation in der Menge der Zellzahlen, oder eine tageszeitlich unterschiedliche Reaktion auf Antigene für den Körper überhaupt Sinn?

Da Makrophagen wichtige Elemente der ersten Immunabwehr darstellen, könnte eine Antizipation des täglichen Infektionsrisikos der Zellen einen großen Vorteil darstellen. Auf der anderen Seite ist eine übermäßige Empfindlichkeit der Zellen schädlich für den Organismus und deshalb ist eine genaue Zeitregulation der Immunantworten unabdingbar. Eine Hypothese besagt zudem, dass eine Adaption der tageszeitlichen Organisation des Immunsystems existieren muss und zwar zu den Zeiten, in denen Tiere mehr Pathogene antreffen während sie in der Umgebung herumstreunen. Deshalb sollte die Immunaktivität, verbunden mit dem initialen Kontakt des Antigens und dessen Eliminierung, zu dem Zeitpunkt am größten sein, wenn das Tier aktiv ist. Die Immunantwort ist aber energetisch sehr aufwendig, weshalb ein Organismus im aktiven Zustand zusätzlich mehr metabolische Energie einsetzen muss, um eine Infektion zu bekämpfen. Die Reduzierung des Energieaufwands könnte einen möglichen Vorteil für den Organismus darstellen. Deshalb wäre es sinnvoller, die Immunantwort während der Ruhe- oder Schlafphase zu verstärken. Die hier vorgelegten Daten unterstützen die letztere These, da die Sekretion von TNF $\alpha$  und auch IL-6 nach Stimulation mit LPS am subjektiven Tag zu CT8 maximal ist. Dieser Zeitpunkt liegt genau in der Mitte der Ruhephase der Mäuse. Beim

Menschen ist dieser Zeitpunkt um zirka zwölf Stunden verschoben. Auch dort liegt das Sekretionsmaximum bei einer Stimulation meist in der Schlaf- und Ruhephase.

Im Moment wird angenommen, dass periphere Uhren individuell zum SCN mit ihrem gewebespezifischen Phasenverhältnis synchronisiert sind. Dabei ist die Phase selektiver zum SCN als die Periode in diesen Organen. Ein abgestimmtes Phasenverhältnis zwischen SCN und Immunsystem ist bei tag- und nachtaktiven Tieren wichtig. Denn gerät es aus dem Takt kann es wahrscheinlich zu einem erhöhten Infektionsrisiko kommen, wie z. B. bei Langstreckenflügen über mehrere Zeitzonen. Das Immunsystem ist dann noch nicht auf das veränderte Lichtregime und damit auf eine veränderte Aktivphase angepasst.

Deshalb ist die Aufklärung der Funktionen der circadianen Uhrgene im Immunsystem wichtig für die zugrunde liegenden Mechanismen der circadianen Veränderungen in den Immunfunktionen. Die hier vorliegenden Daten könnten außerdem Auswirkungen auf die Medikamentenverabreichung bei unerwünschten Reaktionen des Immunsystems (Autoimmunerkrankungen, Allergie) haben. Weiterhin könnten manche Erkrankungen zu ihrem besseren Verständnis eher in einer dynamischen Weise als in einer Momentaufnahme untersucht werden [99]. Schließlich könnte die rhythmische Variation in der Funktion von Geweben oder Organen wichtig für die Verabreichung von Medikamenten und Hormonen sein.

## 6.9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird eine Immun-Uhr postuliert, welche Immunfunktionen steuert. Für eine eindeutige Bestätigung, dass die circadiane Uhr z. B. die Zytokinantwort reguliert, müssten Untersuchungen an Uhrgen-Knockout-Mäusen gemacht werden. Dazu würden sich *Bmal1*-Knockout Mäuse eignen, da sie in konstanter Dunkelheit sofort arrhythmisch werden und somit gewährleistet werden kann, dass die circadiane Uhr nicht mehr funktioniert [27]. Mit primären Milzzellen von diesen Mäusen könnten die gleichen Stimulationsexperimente mit LPS wie mit Wildtyp-Mäusen durchgeführt werden. Wenn die Oszillation der Zytokinsekretion von der circadianen Uhr gesteuert wird, sollte der Rhythmus in Knockout-Mäusen nicht mehr bestehen.

Weiterhin wären adaptive Transferexperimente von Immunzellen aus Uhrgen-mutanten Mäusen in Wildtyp-Mäuse und umgekehrt denkbar. Diese Versuche würden weitere Aufschlüsse über das Zusammenspiel von lokaler Immun-Uhr und systemischen Einflüssen geben.

Da in der vorliegenden Arbeit die Genexpression der Makrophagen an nur zwei circadianen Zeitpunkten untersucht wurde, könnten noch weitere Datenpunkte von diesen Zellen generiert werden. Damit hätte man ein vollständiges Bild der Gene, die in Makrophagen circadian exprimiert werden. Die gefundenen circadianen Gene sollten auf ihre Regulation durch die circadiane Uhr näher untersucht werden, z. B. auf circadiane Genexpression und auf

Bindungsstellen für circadiane Transkriptionsfaktoren. Daraus ergäben sich wiederum neue Ansatzpunkte, die auf eine molekulare Verbindung zwischen Immunsystem und circadianer Uhr schließen lassen.

Weiterhin könnte bei einer Herunterregulation der Uhrgene mit Hilfe der RNAi-Technologie in RAW 267.4 oder in Primärzellen herausgefunden werden, wie und welche Gene das Immunsystem und ihre Funktionen beeinflussen. Ebenso wäre es möglich, circadian exprimierte Kandidatengene aus den Microarrayexperimenten mit dieser Technik herunterzuregulieren und ihre Auswirkungen auf circadiane Funktionen zu analysieren.

## Literaturverzeichnis

- 1 Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., and Block, G. D. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J.Neurosci.* 2002; 22[1]: 350-356
- 2 Abo, T., Kawate, T., Itoh, K., and Kumagai, K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J.Immunol.* 1981; 126[4]: 1360-1363
- 3 Akashi, M. and Takumi, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2005; 12[5]: 441-448
- 4 Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., and Nishida, E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol.Cell Biol.* 2002; 22[6]: 1693-1703
- 5 Albers, H. E., Yogev, L., Todd, R. B., and Goldman, B. D. Adrenal corticoids in hamsters: role in circadian timing. *Am.J.Physiol* 1985; 248[4 Pt 2]: R434-R438
- 6 Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., and Lee, C. C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* 1997; 91[7]: 1055-1064
- 7 Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S., and Lee, C. C. MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J.Biol.Rhythms* 2001; 16[2]: 100-104
- 8 Anderson, K. V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 2000; 12[1]: 13-19
- 9 Applied Biosystems. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Applied Biosystems User Manual 2004; 1-60
- 10 Arjona, A., Boyadjieva, N., and Sarkar, D. K. Circadian Rhythms of Granzyme B, Perforin, IFN-gamma, and NK Cell Cytolytic Activity in the Spleen: Effects of Chronic Ethanol. *J.Immunol.* 2004; 172[5]: 2811-2817
- 11 Arjona, A. and Sarkar, D. K. Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. *Brain Behav.Immun.* 2006; 20[5]: 469-476
- 12 Arjona, A. and Sarkar, D. K. The circadian gene mPer2 regulates the daily rhythm of IFN-gamma. *J.Interferon Cytokine Res.* 2006; 26[9]: 645-649
- 13 Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat.Genet.* 2000; 25[1]: 25-29

- 14 Balsalobre, A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 2002; 309[1]: 193-199
- 15 Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., and Schibler, U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000; 289[5488]: 2344-2347
- 16 Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998; 93[6]: 929-937
- 17 Balsalobre, A., Marcacci, L., and Schibler, U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr.Biol.* 2000; 10[20]: 1291-1294
- 18 Bartness, T. J., Song, C. K., and Demas, G. E. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J.Biol.Rhythms* 2001; 16[3]: 196-204
- 19 Bauer, J., Hohagen, F., Ebert, T., Timmer, J., Ganter, U., Krieger, S., Lis, S., Postler, E., Voderholzer, U., and Berger, M. Interleukin-6 serum levels in healthy persons correspond to the sleep-wake cycle. *Clin.Investig.* 1994; 72[4]: 315
- 20 Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., and Zoran, M. J. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat.Rev.Genet.* 2005; 6[7]: 544-556
- 21 Blalock, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev.* 1989; 69[1]: 1-32
- 22 Blau, J. and Young, M. W. Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 1999; 99[6]: 661-671
- 23 Boivin, D. B., James, F. O., Wu, A., Cho-Park, P. F., Xiong, H., and Sun, Z. S. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2003; 102[12]: 4143-4145
- 24 Born, J., Lange, T., Hansen, K., Molle, M., and Fehm, H. L. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J.Immunol.* 1997; 158[9]: 4454-4464
- 25 Brown, S. A., Ripperger, J., Kadener, S., Fleury-Olela, F., Vilbois, F., Rosbash, M., and Schibler, U. PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator. *Science* 2005; 308[5722]: 693-696
- 26 Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., and Schibler, U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr.Biol.* 2002; 12[18]: 1574-1583
- 27 Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S., and Bradfield, C. A. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000; 103[7]: 1009-1017
- 28 Bünning, E. Über die Erbllichkeit des Tageszeitperiodizität bei den Phaseolus Blättern. *J.wiss.Bot.* 1932; 81: 411-418

- 29 Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I., Draetta, G. F., and Pagano, M. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* 2007; 316[5826]: 900-904
- 30 Caldelas, I., Poirel, V. J., Sicard, B., Pevet, P., and Challet, E. Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 2003; 116[2]: 583-591
- 31 Cardinali, D. P., Brusco, L. I., Cutrera, R. A., Castrillon, P., and Esquifino, A. I. Melatonin as a time-meaningful signal in circadian organization of immune response. *Biol. Signals Recept.* 1999; 8[1-2]: 41-48
- 32 Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J. J., and Sassone-Corsi, P. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 2005; 309[5739]: 1390-1394
- 33 Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R. J., and Guerrero, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004; 18[3]: 537-539
- 34 Carrillo-Vico, A., Garcia-Perganeda, A., Najj, L., Calvo, J. R., Romero, M. P., and Guerrero, J. M. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol. Life Sci.* 2003; 60[10]: 2272-2278
- 35 Cavadini, G., Petrzilka, S., Kohler, P., Jud, C., Tobler, I., Birchler, T., and Fontana, A. TNF- $\alpha$  suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007; 104[31]: 12843-12848
- 36 Charles River Laboratories. Endocrine/Exocrine Modification Procedures. Charles River Laboratories Reference Paper 2005; 13[2]: 1-6
- 37 Chen, Y. G., Mantalaris, A., Bourne, P., Keng, P., and Wu, J. H. Expression of mPer1 and mPer2, two mammalian clock genes, in murine bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 276[2]: 724-728
- 38 Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M., and Zhou, Q. Y. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 2002; 417[6887]: 405-410
- 39 Claridge-Chang, A., Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Rajewsky, N., and Young, M. W. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 2001; 32[4]: 657-671
- 40 Cove-Smith, J. R., Kabler, P., Pownall, R., and Knapp, M. S. Circadian variation in an immune response in man. *Br. Med. J.* 1978; 2[6132]: 253-254
- 41 Cugini, P., Cavallini, M., Pozzilli, P., Scibilia, G., Letizia, C., Di Palma, L., Battisti, P., Sepe, M., Cassisi, A., Macchiarelli, A. G., and . Circadian rhythms of T lymphocyte subpopulations and cortisol in kidney and heart transplantation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990; 341A: 543-553
- 42 Cutolo, M., Serio, B., Craviotto, C., Pizzorni, C., and Sulli, A. Circadian rhythms in RA. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62[7]: 593-596

- 43 Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., and Schibler, U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 2000; 14[23]: 2950-2961
- 44 Dardente, H., Klosin, P., Caldelas, I., Pevet, P., and Masson-Pevet, M. Phenotype of Per1- and Per2-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent (*Arvicanthis ansorgei*): comparison with a nocturnal species, the rat. *Cell Tissue Res.* 2002; 310[1]: 85-92
- 45 Davidson, A. J., Stokkan, K. A., Yamazaki, S., and Menaker, M. Food-anticipatory activity and liver per1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav.* 2002; 76[1]: 21-26
- 46 De Mairan, J. J. d. O. Observation botanique. *Histoire de l'Academie Royale des Sciences* 1729; 35-36
- 47 Debruyne, J. P., Noton, E., Lambert, C. M., Maywood, E. S., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 2006; 50[3]: 465-477
- 48 Debruyne, J. P., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat. Neurosci.* 2007; 10[5]: 543-545
- 49 Delaunay, F. and Laudet, V. Circadian clock and microarrays: mammalian genome gets rhythm. *Trends Genet.* 2002; 18[12]: 595-597
- 50 Depres-Brummer, P., Bourin, P., Pages, N., Metzger, G., and Levi, F. Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am.J.Physiol* 1997; 273[6 Pt 2]: R1891-R1899
- 51 Dickstein, J. B. and Moldofsky, H. Sleep, cytokines and immune function. *Sleep Med.Rev.* 1999; 3[3]: 219-228
- 52 Drouet, C., Shakhov, A. N., and Jongeneel, C. V. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J.Immunol.* 1991; 147[5]: 1694-1700
- 53 Duffield, G. E. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J.Neuroendocrinol.* 2003; 15[10]: 991-1002
- 54 Dunlap, J. C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; 96[2]: 271-290
- 55 Dunlap, J. C. and Loros, J. J. How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr.Opin.Microbiol.* 2006; 9[6]: 579-587
- 56 Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., and Virshup, D. M. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J.Biol.Chem.* 2002; 277[19]: 17248-17254
- 57 Esquifino, A. I., Chacon, F., Cano, P., Marcos, A., Cutrera, R. A., and Cardinali, D. P. Twenty-four-hour rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and amino acid content in submaxillary lymph nodes of growing male rats subjected to calorie restriction. *J.Neuroimmunol.* 2004; 156[1-2]: 66-73

- 58 Etchegaray, J. P., Lee, C., Wade, P. A., and Reppert, S. M. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 2003; 421[6919]: 177-182
- 59 Ewer, J., Frisch, B., Hamblen-Coyle, M. J., Rosbash, M., and Hall, J. C. Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J.Neurosci.* 1992; 12[9]: 3321-3349
- 60 Feigin, R. D., San Joaquin, V. H., Haymond, M. W., and Wyatt, R. G. Daily periodicity of susceptibility of mice to pneumococcal infection. *Nature* 1969; 224[5217]: 379-380
- 61 Fernandes, G., Carandente, F., Halberg, E., Halberg, F., and Good, R. A. Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of Fischer rats. *J.Immunol.* 1979; 123[2]: 622-625
- 62 Fischer, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc.Immunol.Rev.* 2006; 12: 6-33
- 63 Foster, R. G. and Hankins, M. W. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog.Retin.Eye Res.* 2002; 21[6]: 507-527
- 64 Froy, O. and Chapnik, N. Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol.Immunol.* 2007; 44[8]: 1964-1970
- 65 Fukui, M., Imamura, R., Umemura, M., Kawabe, T., and Suda, T. Pathogen-associated molecular patterns sensitize macrophages to Fas ligand-induced apoptosis and IL-1 beta release. *J.Immunol.* 2003; 171[4]: 1868-1874
- 66 Fukuya, H., Emoto, N., Nonaka, H., Yagita, K., Okamura, H., and Yokoyama, M. Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007; 354[4]: 924-928
- 67 Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., and Weitz, C. J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280[5369]: 1564-1569
- 68 Gillette, M. U. and Mitchell, J. W. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 2002; 309[1]: 99-107
- 69 Godinho, S. I., Maywood, E. S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A. R., Busino, L., Pagano, M., Kendall, R., Quwillid, M. M., Romero, M. R., O'Neill, J., Chesham, J. E., Brooker, D., Lallanne, Z., Hastings, M. H., and Nolan, P. M. The after-hours mutant reveals a role for *Fbxl3* in determining mammalian circadian period. *Science* 2007; 316[5826]: 897-900
- 70 Golden, S. S. and Canales, S. R. Cyanobacterial circadian clocks--timing is everything. *Nat.Rev.Microbiol.* 2003; 1[3]: 191-199
- 71 Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., and Saper, C. B. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat.Neurosci.* 2001; 4[12]: 1165
- 72 Griffin, A. C. and Whitacre, C. C. Sex and strain differences in the circadian rhythm fluctuation of endocrine and immune function in the rat: implications for rodent models of autoimmune disease. *J.Neuroimmunol.* 1991; 35[1-3]: 53-64



- 73 Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., and Cermakian, N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J.Biol.Rhythms* 2005; 20[5]: 391-403
- 74 Hack, C. E., Aarden, L. A., and Thijs, L. G. Role of cytokines in sepsis. *Adv.Immunol.* 1997; 66: 101-195
- 75 Hakim, H., DeBernardo, A. P., and Silver, R. Circadian locomotor rhythms, but not photoperiodic responses, survive surgical isolation of the SCN in hamsters. *J.Biol.Rhythms* 1991; 6[2]: 97-113
- 76 Halberg, F., JOHNSON, E. A., BROWN, B. W., and BITTNER, J. J. Susceptibility rhythm to *E. coli* endotoxin and bioassay. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1960; 103: 142-144
- 77 Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B., and Fahrenkrug, J. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J.Neurosci.* 2002; 22[1]: RC191
- 78 Hardin, P. E. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr.Biol.* 2005; 15[17]: R714-R722
- 79 Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52[2]: 269-279
- 80 Hastings, M. H., Reddy, A. B., and Maywood, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 2003; 4[8]: 649-661
- 81 Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., and Yau, K. W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295[5557]: 1065-1070
- 82 Haus, E., Lakatua, D. J., Swoyer, J., and Sackett-Lundeen, L. Chronobiology in hematology and immunology. *Am.J.Anat.* 1983; 168[4]: 467-517
- 83 Haus, E. and Smolensky, M. H. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol.Int.* 1999; 16[5]: 581-622
- 84 Hayashi, M., Shimba, S., and Tezuka, M. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol.Pharm.Bull.* 2007; 30[4]: 621-626
- 85 Helfgott, D. C., May, L. T., Stoeber, Z., Tamm, I., and Sehgal, P. B. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J.Exp.Med.* 1987; 166[5]: 1300-1309
- 86 Hermann, C., von Aulock, S., Dehus, O., Keller, M., Okigami, H., Gantner, F., Wendel, A., and Hartung, T. Endogenous cortisol determines the circadian rhythm of lipopolysaccharide- but not lipoteichoic acid- inducible cytokine release. *Eur.J.Immunol.* 2006; 36[2]: 371-379
- 87 Hernandez, R. E., Kuhl, J. F., Halberg, E., Halberg, F., Shiotsuka, R. N., and Haus, E. Circadian susceptibility rhythm of the rat to alloxan. *Chronobiologia* 1978; 5[4]: 369-378
- 88 Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to

- lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* 1999; 162[7]: 3749-3752
- 89 Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. A role for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mammalian circadian clock. *J.Biol.Chem.* 2005; 280[33]: 29397-29402
- 90 Inouye, S. T. and Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1979; 76[11]: 5962-5966
- 91 Jimenez, V., Cardinali, D. P., Alvarez, M. P., Fernandez, M. P., Boggio, V., and Esquifino, A. I. Effect of chronic ethanol feeding on 24-hour rhythms of mitogenic responses and lymphocyte subset populations in thymus and spleen of peripubertal male rats. *Neuroimmunomodulation.* 2005; 12[6]: 357-365
- 92 Johnson, C. H. Precise circadian clocks in prokaryotic cyanobacteria. *Curr.Issues Mol.Biol.* 2004; 6[2]: 103-110
- 93 Jones, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J.Immunol.* 2005; 175[6]: 3463-3468
- 94 Joyce, D. A., Gimblett, G., and Steer, J. H. Targets of glucocorticoid action on TNF- $\alpha$  release by macrophages. *Inflamm.Res.* 2001; 50[7]: 337-340
- 95 Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999; 11[1]: 115-122
- 96 Kawate, T., Abo, T., Hinuma, S., and Kumagai, K. Studies of the bioperiodicity of the immune response. II. Co-variations of murine T and B cells and a role of corticosteroid. *J.Immunol.* 1981; 126[4]: 1364-1367
- 97 King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M., Antoch, M. P., Steeves, T. D., Vitaterna, M. H., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., Turek, F. W., and Takahashi, J. S. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 1997; 89[4]: 641-653
- 98 Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., and Young, M. W. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I $\epsilon$ . *Cell* 1998; 94[1]: 97-107
- 99 Knapp, M. S. and Pownall, R. Lymphocytes are rhythmic: is this important? *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* 1984; 289[6455]: 1328-1330
- 100 Knyszynski, A. and Fischer, H. Circadian fluctuations in the activity of phagocytic cells in blood, spleen, and peritoneal cavity of mice as measured by zymosan-induced chemiluminescence. *J.Immunol.* 1981; 127[6]: 2508-2511
- 101 Konopka, R. J. and Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1971; 68[9]: 2112-2116
- 102 Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J. S., and Schibler, U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS.Biol.* 2007; 5[2]: e34

- 103 Kramer, A., Yang, F. C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T. E., Davis, F. C., and Weitz, C. J. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 2001; 294[5551]: 2511-2515
- 104 Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 1999; 98[2]: 193-205
- 105 Kurabayashi N, Hirota T, Harada Y, Sakai M, and Fukada Y. Phosphorylation of mCRY2 at Ser557 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Chronobiol Int.* 2006; 23[1-2]: 129-134
- 106 Kurepa, Z., Rabatic, S., and Dekaris, D. Influence of circadian light-dark alternations on macrophages and lymphocytes of CBA mouse. *Chronobiol.Int.* 1992; 9[5]: 327-340
- 107 Kusanagi, H., Mishima, K., Satoh, K., Echizenya, M., Katoh, T., and Shimizu, T. Similar profiles in human period1 gene expression in peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Neurosci.Lett.* 2004; 365[2]: 124-127
- 108 Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schutz, G., and Schibler, U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 2001; 20[24]: 7128-7136
- 109 Lee, J-E. and Edery, I. Circadian regulation in the ability of drosophila to combat pathogenic infections. *Curr.Biol.* 2008; 18: 195-199
- 110 Leshner, A. I. The adrenals and the regulatory nature of running wheel activity. *Physiol Behav.* 1971; 6[5]: 551-558
- 111 Levi, F. A., Canon, C., Touitou, Y., Sulon, J., Mechkouri, M., Ponsart, E. D., Touboul, J. P., Vannetzel, J. M., Mowzowicz, I., Reinberg, A., and . Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin.Exp.Immunol.* 1988; 71[2]: 329-335
- 112 Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., Buhr, E. D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I. M., Doyle, F. J., III, Takahashi, J. S., and Kay, S. A. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 2007; 129[3]: 605-616
- 113 Liu, J., Mankani, G., Shi, X., Meyer, M., Cunningham-Runddles, S., Ma, X., and Sun, Z. S. The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect.Immun.* 2006; 74[8]: 4750-4756
- 114 Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25[4]: 402-408
- 115 Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M., and Takahashi, J. S. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000; 288[5465]: 483-492
- 116 Majde, J. A. and Krueger, J. M. Links between the innate immune system and sleep. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2005; 116[6]: 1188-1198

- 117 Marpegan, L., Bekinschtein, T. A., Costas, M. A., and Golombek, D. A. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *J.Neuroimmunol.* 2005; 160[1-2]: 102-109
- 118 Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S., and Michalek, S. M. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat.Immunol.* 2005; 6[8]: 777-784
- 119 Martin, R. J., Cicutto, L. C., Smith, H. R., Ballard, R. D., and Szefer, S. J. Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991; 143[2]: 351-357
- 120 McDonald, M. J. and Rosbash, M. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* 2001; 107[5]: 567-578
- 121 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388[6640]: 394-397
- 122 Meyer-Bernstein, E. L., Jetton, A. E., Matsumoto, S. I., Markuns, J. F., Lehman, M. N., and Bittman, E. L. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 1999; 140[1]: 207-218
- 123 Migita, H., Morser, J., and Kawai, K. Rev-erb $\alpha$  upregulates NF-kappaB-responsive genes in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2004; 561[1-3]: 69-74
- 124 Miller, B. H., McDearmon, E. L., Panda, S., Hayes, K. R., Zhang, J., Andrews, J. L., Antoch, M. P., Walker, J. R., Esser, K. A., Hogenesch, J. B., and Takahashi, J. S. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007; 104[9]: 3342-3347
- 125 Moberg, G. P. and Clark, C. R. Effect of adrenalectomy and dexamethasone treatment on circadian running in the rat. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1976; 4[5]: 617-619
- 126 Moore, R. Y. Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain Res.* 1973; 49[2]: 403-409
- 127 Moore, R. Y. and Eichler, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972; 42[1]: 201-206
- 128 Moore, R. Y., Speh, J. C., and Leak, R. K. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 2002; 309[1]: 89-98
- 129 Mrosovsky, N., Edelstein, K., Hastings, M. H., and Maywood, E. S. Cycle of period gene expression in a diurnal mammal (*Spermophilus tridecemlineatus*): implications for nonphotic phase shifting. *J.Biol.Rhythms* 2001; 16[5]: 471-478
- 130 Muller, J. E. Circadian variation in cardiovascular events. *Am.J.Hypertens.* 1999; 12[2 Pt 2]: 35S-42S
- 131 Murphy, B. A., Vick, M. M., Sessions, D. R., Cook, R. F., and Fitzgerald, B. P. Evidence of an oscillating peripheral clock in an equine fibroblast cell line and adipose tissue but not in peripheral blood. *J.Comp Physiol A Neuroethol.Sens.Neural Behav.Physiol* 2006; 192[7]: 743-751
- 132 Myers, M. P., Wager-Smith, K., Wesley, C. S., Young, M. W., and Sehgal, A. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* 1995; 270[5237]: 805-808

- 133 Nordan, R. P. and Potter, M. A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro. *Science* 1986; 233[4763]: 566-569
- 134 Nunez, A. A. and Stephan, F. K. The effects of hypothalamic knife cuts on drinking rhythms and the estrus cycle of the rat. *Behav.Biol.* 1977; 20[2]: 224-234
- 135 Ohkura, N., Oishi, K., Sekine, Y., Atsumi, G., Ishida, N., Matsuda, J., and Horie, S. Comparative study of circadian variation in numbers of peripheral blood cells among mouse strains: unique feature of C3H/HeN mice. *Biol.Pharm.Bull.* 2007; 30[6]: 1177-1180
- 136 Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N., and Ishida, N. Genome-wide Expression Analysis Reveals 100 Adrenal Gland-dependent Circadian Genes in the Mouse Liver. *DNA Res.* 2005; 12[3]: 191-202
- 137 Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M., Kudo, T., Shimizu, Y., Yano, M., Monden, M., Machida, K., Matsuda, J., Horie, S., Todo, T., and Ishida, N. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J.Biol.Chem.* 2003; 278[42]: 41519-41527
- 138 Oishi, K., Ohkura, N., Kadota, K., Kasamatsu, M., Shibusawa, K., Matsuda, J., Machida, K., Horie, S., and Ishida, N. Clock mutation affects circadian regulation of circulating blood cells. *J.Circadian.Rhythms* 2006; 4: 13
- 139 Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., and Ishida, N. Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci.Lett.* 1998; 256[2]: 117-119
- 140 Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J. H., and van der Horst, G. T. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 1999; 286[5449]: 2531-2534
- 141 Ottaway, C. A. and Husband, A. J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol.Today* 1994; 15[11]: 511-517
- 142 Palsson-McDermott, E. M. and O'Neill, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113[2]: 153-162
- 143 Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., and Hogenesch, J. B. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109[3]: 307-320
- 144 Panda, S., Sato, T. K., Castrucci, A. M., Rollag, M. D., DeGrip, W. J., Hogenesch, J. B., Provencio, I., and Kay, S. A. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 2002; 298[5601]: 2213-2216
- 145 Pando, M. P. and Sassone-Corsi, P. Molecular clocks. A vivid loop of light. *Nature* 2001; 410[6826]: 311-313
- 146 Pando, M. P. and Sassone-Corsi, P. Signaling to the mammalian circadian clocks: in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. *Sci.STKE.* 2001; 2001[107]: RE16

- 147 Pelegri, C., Vilaplana, J., Castellote, C., Rabanal, M., Franch, A., and Castell, M. Circadian rhythms in surface molecules of rat blood lymphocytes. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2003; 284[1]: C67-C76
- 148 Petrovsky, N., McNair, P., and Harrison, L. C. Circadian rhythmicity of interferon-gamma production in antigen-stimulated whole blood. *Chronobiologia* 1994; 21[3-4]: 293-300
- 149 Petrovsky, N., McNair, P., and Harrison, L. C. Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 1998; 10[4]: 307-312
- 150 Pittendrigh, C. S. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1967; 58[4]: 1762-1767
- 151 Plautz, J. D., Straume, M., Stanewsky, R., Jamison, C. F., Brandes, C., Dowse, H. B., Hall, J. C., and Kay, S. A. Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *J.Biol.Rhythms* 1997; 12[3]: 204-217
- 152 Plytycz, B. and Seljelid, R. Rhythms of immunity. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 1997; 45[2-3]: 157-162
- 153 Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282[5396]: 2085-2088
- 154 Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., McNally, O., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E. K., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S. N., and Beutler, B. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol.Dis.* 1998; 24[3]: 340-355
- 155 Pownall, R. and Knapp, M. S. Circadian rhythmicity of delayed hypersensitivity to oxazolone in the rat. *Clin.Sci.Mol.Med.* 1978; 54[4]: 447-449
- 156 Pownall, R. and Knapp, M. S. Immun responses have Rhythms: are they important? *Immunol.Today* 1980; 1: vii-x
- 157 Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110[2]: 251-260
- 158 Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., and Rollag, M. D. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; 95[1]: 340-345
- 159 Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., and Rollag, M. D. A novel human opsin in the inner retina. *J.Neurosci.* 2000; 20[2]: 600-605
- 160 Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J.Exp.Med.* 1999; 189[4]: 615-625
- 161 Rajaratnam, S. M. and Arendt, J. Health in a 24-h society. *Lancet* 2001; 358[9286]: 999-1005

- 162 Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., and Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 1990; 247[4945]: 975-978
- 163 Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978; 15[1]: 261-267
- 164 Ratajczak, H. V., Lange, R. W., Sothorn, R. B., Hagen, K. L., Vescei, P., Wu, J., Halberg, F., and Thomas, P. T. Surgical influence on murine immunity and tumor growth: relationship of body temperature and hormones with splenocytes. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1992; 199[4]: 432-440
- 165 Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., and McKnight, S. L. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 2001; 293[5529]: 506-509
- 166 Reppert, S. M. and Weaver, D. R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu.Rev.Physiol* 2001; 63: 647-676
- 167 Reppert, S. M. and Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418[6901]: 935-941
- 168 Ruby, N. F., Brennan, T. J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H. C., and O'Hara, B. F. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 2002; 298[5601]: 2211-2213
- 169 Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., and Hall, J. C. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 1998; 93[5]: 805-814
- 170 Sanada, K., Okano, T., and Fukada, Y. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J.Biol.Chem.* 2002; 277[1]: 267-271
- 171 Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., and Hogenesch, J. B. A functional genomics strategy reveals rora as a component of the Mammalian circadian clock. *Neuron* 2004; 43[4]: 527-537
- 172 Schibler, U. Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. *Prog.Brain Res.* 2006; 153: 271-282
- 173 Schibler, U., Ripperger, J., and Brown, S. A. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J.Biol.Rhythms* 2003; 18[3]: 250-260
- 174 Schromm, A. B., Lien, E., Henneke, P., Chow, J. C., Yoshimura, A., Heine, H., Latz, E., Monks, B. G., Schwartz, D. A., Miyake, K., and Golenbock, D. T. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J.Exp.Med.* 2001; 194[1]: 79-88
- 175 Seres, J., Herichova, I., Roman, O., Bornstein, S., and Jurcovicova, J. Evidence for daily rhythms of the expression of proopiomelanocortin, interleukin-1-beta and interleukin-6 in adenopituitaries of male long-evans rats: effect of adjuvant arthritis. *Neuroimmunomodulation.* 2004; 11[5]: 316-322

- 176 Shackelford, P. G. and Feigin, R. D. Periodicity of susceptibility to pneumococcal infection: influence of light and adrenocortical secretions. *Science* 1973; 182[109]: 285-287
- 177 Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C., and Okamura, H. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 1997; 91[7]: 1043-1053
- 178 Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 1999; 189[11]: 1777-1782
- 179 Shirasu-Hiza, M. M., Dionne, M. S., Pham, L. N., Ayres, J. S., and Schneider, D. S. Interactions between circadian rhythm and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Curr.Biol.* 15-5-2007; 17[10]: R353-R355
- 180 Siepka, S. M., Yoo, S. H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., and Takahashi, J. S. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* 2007; 129[5]: 1011-1023
- 181 Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P. A., and Lehman, M. N. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 1996; 382[6594]: 810-813
- 182 Skwarlo-Sonta, K., Majewski, P., Markowska, M., Oblap, R., and Olszanska, B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 2003; 81[4]: 342-349
- 183 Stanewsky, R. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 2002; 309[1]: 11-26
- 184 Stangegaard, M., Dufva, I. H., and Dufva, M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *Biotechniques* 2006; 40[5]: 649-657
- 185 Stehle, J., Vanecek, J., and Vollrath, L. Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J.Neural Transm.* 1989; 78[2]: 173-177
- 186 Stephan, F. K. and Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1972; 69[6]: 1583-1586
- 187 Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., and Weitz, C. J. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 2002; 417[6884]: 78-83
- 188 Sujino, M., Masumoto, K. H., Yamaguchi, S., van der Horst, G. T., Okamura, H., and Inouye, S. T. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr.Biol.* 2003; 13[8]: 664-668
- 189 Sun, Y., Yang, Z., Niu, Z., Peng, J., Li, Q., Xiong, W., Langnas, A. N., Ma, M. Y., and Zhao, Y. MOP3, a component of the molecular clock, regulates the development of B cells. *Immunology* 2006; 119[4]: 451-460



- 190 Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., and Lee, C. C. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 1997; 90[6]: 1003-1011
- 191 Sutherland, E. R. Nocturnal asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2005; 116[6]: 1179-1186
- 192 Suzuki, S., Toyabe, S., Moroda, T., Tada, T., Tsukahara, A., Iiai, T., Minagawa, M., Maruyama, S., Hatakeyama, K., Endoh, K., and Abo, T. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin.Exp.Immunol.* 1997; 110[3]: 500-508
- 193 Szafarczyk, A., Ixart, G., Alonso, G., Malaval, F., Nougquier-Soule, J., and Assenmacher, I. CNS control of the circadian adrenocortical rhythm. *J.Steroid Biochem.* 1983; 19[1C]: 1009-1015
- 194 Taveira da Silva, A. M., Kaulbach, H. C., Chuidian, F. S., Lambert, D. R., Suffredini, A. F., and Danner, R. L. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin. *N.Engl.J.Med.* 1993; 328[20]: 1457-1460
- 195 Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M., and Sakaki, Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 1997; 389[6650]: 512-516
- 196 Thomas, P. D., Mi, H., and Lewis, S. Ontology annotation: mapping genomic regions to biological function. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 2007; 11[1]: 4-11
- 197 Thomson, S. P., McMahon, L. J., and Nugent, C. A. Endogenous cortisol: a regulator of the number of lymphocytes in peripheral blood. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1980; 17[4]: 506-514
- 198 Tosini, G. and Menaker, M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996; 272[5260]: 419-421
- 199 Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., and Sassone-Corsi, P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99[11]: 7728-7733
- 200 Tsinkalovsky, O., Smaaland, R., Rosenlund, B., Sothorn, R. B., Hirt, A., Steine, S., Badiie, A., Abrahamsen, J. F., Eiken, H. G., and Laerum, O. D. Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells. *J.Biol.Rhythms* 2007; 22[2]: 140-150
- 201 Ueda, H. R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y., and Hashimoto, S. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002; 418[6897]: 534-539
- 202 Uthgenannt, D., Schoolmann, D., Pietrowsky, R., Fehm, H. L., and Born, J. Effects of sleep on the production of cytokines in humans. *Psychosom.Med.* 1995; 57[2]: 97-104
- 203 van Esseveldt, K. E., Lehman, M. N., and Boer, G. J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2000; 33[1]: 34-77
- 204 Vanselow, K., Vanselow, J. T., Westermarck, P. O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzog, H., Schlosser, A., and Kramer, A. Differential effects of PER2

- phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev.* 2006; 20[19]: 2660-2672
- 205 Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., and Takahashi, J. S. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 1994; 264[5159]: 719-725
- 206 Vitaterna, M. H., Selby, C. P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E. M., Hitomi, K., Thresher, R. J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J. S., and Sancar, A. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96[21]: 12114-12119
- 207 Wang, S. D., Huang, K. J., Lin, Y. S., and Lei, H. Y. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J.Immunol.* 1994; 152[10]: 5014-5021
- 208 Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., and Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; 14[4]: 697-706
- 209 Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249[4975]: 1431-1433
- 210 Wright, S. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Ramos, R. A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J.Exp.Med.* 1-10-1989; 170[4]: 1231-1241
- 211 Yagita, K. and Okamura, H. Forskolin induces circadian gene expression of *rPer1*, *rPer2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* 2000; 465[1]: 79-82
- 212 Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 2003; 302[5649]: 1408-1412
- 213 Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamme, T., and Takumi, T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC.Mol.Biol.* 2004; 5[1]: 18
- 214 Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000; 288[5466]: 682-685
- 215 Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., and Lazar, M. A. Nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 2006; 311[5763]: 1002-1005
- 216 Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., and Takahashi, J. S. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101[15]: 5339-5346
- 217 Zabel, P., Linnemann, K., and Schlaak, M. Circadian rhythm in cytokines. *Immun.Infekt.* 1993; 21 Suppl 1: 38-40

- 218 Zhao, W. N., Malinin, N., Yang, F. C., Staknis, D., Gekakis, N., Maier, B., Reischl, S., Kramer, A., and Weitz, C. J. CIPC is a mammalian circadian clock protein without invertebrate homologues. *Nat.Cell Biol.* 2007; 9[3]: 268-275
- 219 Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol.Cell* 1998; 1[5]: 661-671
- 220 Zylka, M. J., Shearman, L. P., Levine, J. D., Jin, X., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* 1998; 21[5]: 1115-1122
- 221 Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 1998; 20[6]: 1103-1110

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der chronobiologischen Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin in der Zeit von September 2003 bis September 2007 durchgeführt. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich bei Prof. Dr. Achim Kramer für die Möglichkeit der Bearbeitung des interessanten Themas und die Aufnahme in seine Gruppe, die mir bestmögliche Rahmenbedingungen für meine Doktorarbeit geboten hat. Mein Dank bezieht sich auf die intensive Betreuung, die wissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen und dass ich an der Arbeit wissenschaftlich wie menschlich wachsen konnte.

Herzlichst möchte ich mich auch bei allen Kollegen der AG Chronobiologie bedanken, die mir immer mit Erfahrungen und Ratschlägen zur Seite gestanden und mir dadurch eine angenehme Arbeitsatmosphäre bereitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Bert Maier. Durch seine ständige Bereitschaft für Diskussionen und Ratschläge ermöglichte er mir detaillierte Einsichten in die Immunologie und war somit an der Gestaltung dieser Arbeit maßgeblich beteiligt.

Astrid Grudziecki danke ich an dieser Stelle für die permanente Hilfsbereitschaft bei allen labortechnischen Dingen.

Mein weiterer Dank gilt meinen Mitstreitern Markus, Jens, Katja, Sabrina und Thomas für ihre Diskussionen und Anregungen, für ein angenehmes Arbeitsklima und für ihre freundliche Unterstützung. Sie haben dadurch sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Markus und Ute, ohne die ich manche Versuche zeitlich nicht hätte durchführen können und die mir mit vielen kleinen Leckereien oft die Arbeit versüßten.

Dr. Steven Brown danke ich für die Einweisung in der Herstellung von Viren.

Judith Klanck danke ich für die Hilfe bei der RNA-Isolierung der Lymphknoten.

Weiterhin sei auch allen Mitgliedern der AG Molekulare Bibliotheken für nette Frühstücks- und Kaffeerunden gedankt. Vielen Dank an Annette Hayungs, für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten.

Inga Gebuhr danke ich besonders für das schnelle und kritische Korrekturlesen der Arbeit und die vielen Hinweise bezüglich meiner Ausdrucksweise.

Danken möchte ich auch allen Kollegen aus dem Institut für Medizinische Immunologie, besonders denen im Ida-Simon-Haus für die Hilfestellungen bei den Elisass.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nur unter erschwerten Bedingungen möglich gewesen wäre – insbesondere Hans-Christoph Stephan, der mich sowohl motiviert als auch, wenn nötig, abgelenkt hat und mir stets den Rücken fürs Schreiben freigehalten hat.

## Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

**M Keller.** (2004). Circadian clock gene expression in murine spleen tissue. Vortrag bei der *14<sup>th</sup> Student Conference* in Berlin, Deutschland

**M Keller,** B Maier, H-D Volk A Kramer (2005). The Circadian Clock in the Immune System. Poster und Vortrag bei der *Summer school* in Groningen, Niederlande

B Maier, **M Keller,** U Abraham, E Herzog, HD Volk, and A Kramer. (2006). Circadian Regulation of Immune Functions in Splenic Macrophages. Vortrag auf dem *Tenth Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms (SRBR)*, Sandestin, Florida, USA,

**M Keller,** B Maier, U Abraham, E Herzog, HD Volk, and A Kramer. (2006). Circadian Regulation of Immune Functions in Splenic Macrophages. Vortrag auf dem *16<sup>th</sup> European Congress of Immunology*, Paris, Frankreich

**M Keller,** B Maier, U Abraham, E Herzog, HD Volk, A. Kramer. (2007). Circadian Clockwork in Immune System. Veröffentlichung in Vorbereitung

## Erklärung

„Ich, Maren Keller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: 'Die Circadiane Uhr und das Immunsystem' selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift