

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie

Klassische Konditionierung immunologischer Funktionen bei nierentransplantierten Patienten und die Mechanismen der  $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelten Inhibition der IL-2-Produktion in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Julia Sophia Kirchhof  
aus Solingen  
2017

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer  
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. biol. hum. Dipl.-Psych. Manfred Schedlowski  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Karl Sebastian Lang

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 2018

**Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (SCHE 341/19-1 und 19-2).**

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:**

### **Publikationen**

Kahl, A. L., Kirchhof, J., Fütting, A., Hütter, B.-O., Wilde, B., Witzke, O., Benson, S., Hadamitzky, M. and Schedlowski, M. (2017): Acute administration of cyclosporine A does not impair attention or memory performance in healthy men. *Behavioural pharmacology* 28, 255-261.

Lückemann, L., Unteroberdörster, M., Kirchhof, J., Schedlowski, M. and Hadamitzky, M. (2017): Applications and limitations of behaviorally conditioned immunopharmacological responses. *Neurobiology of Learning and Memory* 142, 91-98.

Zhu, J., Zeng, Y., Dolff, S., Bienholz, A., Lindemann, M., Brinkhoff, A., Schedlowski, M., Xu, S., Sun, M., Guberina, H., Kirchhof, J., Kribben, A., Witzke, O. and Wilde, B. (2017): Granzyme B producing B-cells in renal transplant patients. *Clinical Immunology*. In Press.

### **In Bearbeitung**

Kirchhof, J., Petrakova, L., Brinkhoff, A., Benson, S., Schmidt, J., Unteroberdörster, M., Wilde, B., Kaptchuk, T., Witzke, O., Schedlowski, M.: Learned Immunosuppressive Placebo Response In Renal Transplant Patients.

# Inhalt

1. Einleitung.....	6
1.1. Psychoneuroimmunologie.....	6
1.2. Bidirektionale Kommunikation zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem ...	7
1.3. Klassische Konditionierung von Immunfunktionen .....	9
1.4. Klassische Konditionierung von Immunfunktionen im Tiermodell .....	11
1.5. Klassische Konditionierung von Immunfunktionen im Menschen .....	11
1.6. Mechanismen der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen.....	12
1.7. Klinische Relevanz der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen .....	14
1.8. $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Immunsuppression .....	15
1.9. Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden .....	23
2.1. Studienteilnehmer.....	23
2.2. Konditionierungsparadigma .....	25
2.2.1. Der unkonditionierte Stimulus .....	25
2.2.2. Der konditionierte Stimulus .....	27
2.3. Studiendesign.....	28
2.4. Immunologische Parameter .....	30
2.4.1. Zellisolierung .....	30
2.4.2. Stimulationsantikörper .....	30
2.4.3. Bestimmung der IL-2-Konzentration im Kulturüberstand.....	30
2.4.4. Bestimmung der IL-2-mRNA Expression .....	30
2.4.5. Bestimmung der IFN- $\gamma$ -mRNA Expression.....	31
2.4.6. Proliferation der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	31
2.4.7. Durchflusszytometrische Quantifizierung der zirkulierenden CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup> und CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	32
2.4.8. Bestimmung des CsA- und Tac-Spiegels.....	32
2.5. Neuroendokrine Parameter.....	32
2.5.1. Bestimmung der Cortisolkonzentration im Plasma.....	32
2.5.2. Bestimmung der Katecholaminkonzentration im Plasma .....	33
2.6. <i>In vitro</i> Experimente zur $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelten Immunsuppression in humanen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	34
2.6.1. Isolierung naiver CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	34
2.6.2. Verwendete Inhibitoren.....	34
2.6.3. Bestimmung der IL-2-Konzentration in Kulturüberstand.....	34

2.6.4.	Bestimmung der nukleären NFAT-Fraktion.....	35
2.6.5.	Bestimmung der cAMP-Konzentration .....	36
2.7.	Statistische Auswertung.....	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	Gelernte Suppression von T-Zellfunktionen in nierentransplantierten Patienten	37
3.2.	$\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Immunsuppression in humanen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	45
3.2.1.	Stimulation des $\beta_2$ -Adrenozeptors auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	45
3.2.2.	Inhibition der IL-2-Produktion wird nicht durch CaN vermittelt.....	46
3.2.3.	TERB-abhängiger Anstieg der cAMP-Konzentration.....	46
3.2.4.	Inhibition der IL-2-Produktion ist nicht PKA-abhängig .....	47
4.	Diskussion .....	51
4.1.	Klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte bei nierentransplantierten Patienten.....	51
4.2.	$\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Immunsuppression in humanen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	57
5.	Zusammenfassung .....	61
6.	Literatur .....	62
7.	Anhang .....	71
7.1.	Zusätzliche Tabellen.....	71
7.2.	Abbildungsverzeichnis .....	73
7.3.	Tabellenverzeichnis .....	73
7.4.	Abkürzungsverzeichnis .....	74
8.	Danksagung .....	77

# 1. Einleitung

## 1.1. Psychoneuroimmunologie

Das interdisziplinäre Forschungsgebiet der Psychoneuroimmunologie (PNI) befasst sich mit der Lehre von der Interaktion zwischen Verhalten, Nervensystem, endokrinem System und Immunsystem (Ziemssen and Kern 2007, Irwin 2008). Der Grundstein für dieses Forschungsfeld wurde in den frühen 1970er Jahren von dem Psychiater und Verhaltensforscher Robert Ader gelegt (Ader 2000). In einem Experiment untersuchte er die konditionierte Geschmacksaversion (CTA) bei Ratten. Dazu paarte er eine Saccharinlösung mit der Injektion von Cyclophosphamid, einem Immunsuppressivum. Durch die Paarung der beiden Reize lernten die Ratten, dass mit dem Geschmack der Lösung ein Unwohlsein einhergeht. Folglich mieden die Ratten die Saccharinlösung fortan (konditionierte Geschmacksaversion, CTA). Ader machte die Beobachtung, dass die Sterblichkeitsrate der konditionierten Ratten allein durch die Re-Exposition mit Saccharin anstieg. Daraufhin stellte er die Hypothese auf, dass sich der immunsuppressive Effekt von Cyclophosphamid klassisch konditionieren lässt (Ader 1974). Zusammen mit dem Immunologen Nicholas Cohen untersuchte Ader die konditionierte Immunsuppression genauer und gründete mit den aus der Zusammenarbeit der beiden Forscher entstandenen Pionierarbeiten das Feld der PNI (Ader and Cohen 1982, Ader et al. 1982).

Ebenfalls in den 1970er Jahren wurden die ersten Studien durchgeführt, die zeigten, dass eine Immunantwort zu Veränderungen im Gehirn führt und es einen Informationsfluss zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem geben muss (Besedovsky et al. 1977). Eben dieser Informationsfluss ist eine Voraussetzung, um über assoziative Lernprozesse Immunfunktionen modulieren zu können (Pavlov and Tracey 2017). Folglich sind beide Systeme nicht wie zuvor angenommen autonom zu betrachten, sondern sind über efferente und afferente Kommunikationswege eng miteinander verbunden (Elenkov et al. 2000). Kommuniziert das Nervensystem mit dem Immunsystem (efferent), geschieht dies über das sympathische Nervensystem (SNS) oder die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse (Pavlov and Tracey 2017). Dabei wird angenommen, dass über das SNS eine spezifischere Kommunikation stattfindet, da lymphatisches Gewebe von sympathischen Nervenfasern innerviert wird (Wrona 2006). Die afferenten Kommunikationswege sind hingegen noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass Neuronen Zytokinrezeptoren exprimieren und immunkompetente Zellen in der Lage sind Adrenocorticotropin (ACTH), Prolaktin und Wachstumshormone zu produzieren, die neuronale Funktionen beeinflussen können (Wrona 2006). Eine weitere Verbindung der beiden Systeme wird durch den Vagusnerv gebildet, der die Leber, Lunge, Milz, Nieren und

den Magen-Darm Trakt innerviert und das Gehirn über Veränderungen des Immunstatus informiert (Ziemssen and Kern 2007, Schedlowski and Pacheco-López 2010, Pavlov and Tracey 2017).

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Studien gezeigt, wie essentiell die funktionierende Wechselwirkung zwischen Nerven- und Immunsystem ist und welche Folgen eine Dysfunktion dieser Kommunikation haben kann. In einer aktuellen Studie konnte beispielsweise im Tiermodell gezeigt werden, dass ein Mangel an Interferon (IFN)- $\gamma$  zu einem autismusähnlichen Verhalten führt (Filiano et al. 2016).

Durch das detailreicher werdende Wissen über die Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem Nervensystem rückt eine klinisch therapeutische Anwendung dieser Kommunikation in Form der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen immer näher.

### **1.2. Bidirektionale Kommunikation zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem**

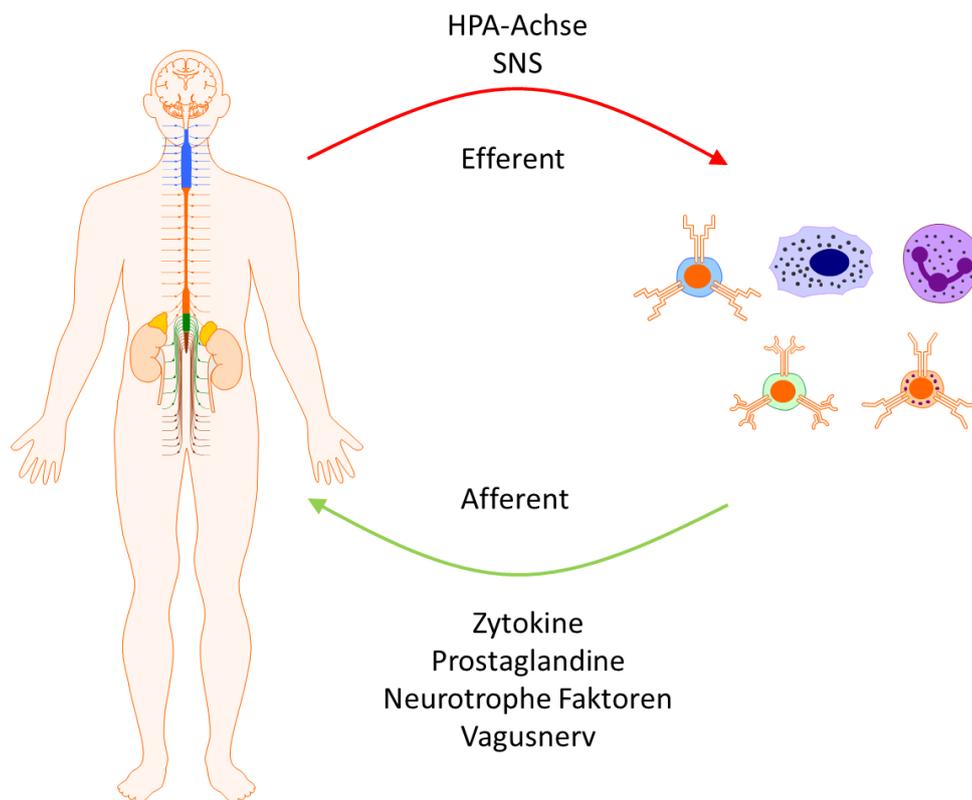
Vor etwa 40 Jahren wurde die funktionelle Autonomie des Nerven- und des Immunsystems erfolgreich in Frage gestellt. Durch die wachsende Forschung im Feld der Neuroimmunologie und PNI wurden afferente und efferente Kommunikationswege zwischen den beiden Systemen aufgedeckt, die die enge Interaktion zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und Immunsystem belegen (Abbildung 1).

#### **Afferente Kommunikation zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem**

Eine Aktivierung des Immunsystems geht einher mit Veränderungen von Prozessen im Hypothalamus (Besedovsky et al. 1977). Das bekannteste Beispiel der afferenten Kommunikation der beiden Systeme ist das „*Sickness Behavior*“. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine beeinflusst sowohl das Verhalten als auch die Stimmung. Dies äußert sich unter anderen in Anhedonie, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Hyperalgesie (Capuron and Miller 2011). Aktuell konnte gezeigt werden, dass die durch Lipopolysaccharid (LPS)-Injektionen hervorgerufene Inflammation bei gesunden Männern zu einem Anstieg von Interleukin (IL)-6 in der Rückenmarksflüssigkeit führt, und dass es eine starke Assoziation zwischen der IL-6-Konzentration im Liquor und der Empfindung depressiver Symptome im Rahmen des „*Sickness Behaviors*“ gibt (Engler et al. 2017). Aufgrund ihres Molekulargewichts können Zytokine die Bluthirnschranke nicht passieren. Allerdings ist es möglich, dass Zytokine über Diffusion ins zirkumventrikuläre Organ gelangen und somit das Gehirn erreichen. Des Weiteren gibt es im Gehirn endotheliumaktive Transportmechanismen für Zytokine (Schedlowski et al. 2014). Auch Endothelzellen des Gehirns und prävasculäre Makrophagen können inflammatorische

Signale empfangen und weiterleiten. Bei einer Interaktion der beiden Zelltypen wird Prostaglandin E2 (PGE 2) ausgeschüttet, das wiederum Neuronen in bestimmten Gehirnregionen aktivieren kann und somit zu einer Modulation der HPA-Achse führen kann. Zytokine und PGE 2 sind ebenfalls in der Lage Mikroglial zu stimulieren, die dann weitere Immunsignale aussenden (Schedlowski et al. 2014).

Bei der neuronalen Kommunikation des Immunsystems mit dem Nervensystem sind der Vagusnerv und das proinflammatorische Zytokin IL-1 Schlüsselemente. IL-1 kann nicht nur direkt auf das ZNS wirken, sondern es wird auch nach einer peripheren Immunstimulation im Gehirn produziert (Schedlowski et al. 2014). Die Einnahme von IL-1 führt zu einer Reihe von für das „*Sickness Behavior*“ typischen Symptomen wie Hyperalgesie, Anorexie und einer verminderten sozialen Interaktion (Tracey 2009). Durch IL-1-Rezeptoren auf dem Vagusnerv kann der Effekt des Zytokins an das Nervensystem weitergeleitet werden (Exton et al. 2001). Eine Vagotomie oder die Gabe eines kompetitiven IL-1-Rezeptorantagonists führen dazu, dass das durch eine IL-1-Injektion hervorgerufene „*Sickness Behavior*“ abnimmt (Tracey 2009).



**Abbildung 1: Neuro-Immun-Interaktion.** Das Nervensystem und das Immunsystem können über unterschiedliche afferente und efferente Wege miteinander kommunizieren. Zu den wichtigsten efferenten Wegen gehören das SNS und die HPA-Achse. Afferent kommuniziert das Immunsystem über aktivierte Immunzellen, die Zytokine und neurotrophe Faktoren produzieren. Abbildung angefertigt mit Motifolio®. HPA-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse; SNS: Sympathisches Nervensystem.

### **Efferente Kommunikation zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem**

Es gibt viele Beweise dafür, dass Immunantworten über bestimmte Gehirnareale gesteuert werden. Dabei wurden besonders der Hypothalamus, das limbische System und der Neocortex als Hauptakteure identifiziert (Pavlov and Tracey 2017). Eine Läsion des anterior Hypothalamus führt zur Reduktion der Lymphozytenanzahl und der Antikörperproduktion. Läsionen des limbischen System hingegen scheinen gewisse Immunparameter eher zu verstärken, wie zum Beispiel den Anstieg an Thymus- und Milzzellen bei der Beschädigung des amygdoloiden Komplexes und des Hippocampus in Ratten. Die Funktion und Anzahl von T-Zellen lässt sich durch eine Läsion des linken zerebralen Cortex alternieren (Wrona 2006). Zusätzlich sind Neuronen des ZNS in der Lage Zytokine wie den Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und IL-1 zu produzieren (Breder et al. 1994) für die sie selbst die entsprechende Rezeptoren exprimieren (Rothwell et al. 1996).

Die Weiterleitung der im ZNS gesammelten Informationen erfolgt über neuroendokrine Signale an das SNS oder die HPA-Achse. Diese Kommunikation kann über das Blut stattfinden oder basiert auf der direkten Innervation primärer und sekundärer lymphatischer Organe (Pavlov and Tracey 2017).

Bei der Aktivierung der HPA-Achse kommt es zur Ausschüttung des Corticotropin-Releasing Hormons (CRH) im Hypothalamus, was die Sekretion von ACTH durch die Hypophyse bedingt. ACTH stimuliert die Produktion von Glucocorticoiden, wie Cortisol, in der Nebenniere (Tsigos and Chrousos 2002). Vermittelt durch Glucocorticoidrezeptoren (GR) kann Cortisol verschiedene Effekte auf Immunzellen ausüben (Webster et al. 2002). Primär haben sie eine immunsuppressive Wirkung (Wrona 2006).

In elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass Nervenfasern des SNS die weiße Pulpa der Milz innervieren und sich somit in direkter Nähe zu T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen befinden (Felten et al. 1987). Diese Nerven bestehen zu großen Teilen aus noradrenergen Nervenfasern, die Norepinephrine als Neurotransmitter ausschütten (Madden et al. 1995). Im Verlauf einer Immunantwort werden folglich autonome Zentren im Gehirn aktiviert und es kommt zur Ausschüttung von Noradrenalin (NA) in den postganglionären sympathischen Nervenfasern. Gleichzeitig führt eine Sympathikusaktivierung zu einer vermehrten Ausschüttung von Adrenalin (ADR) aus dem Nebennierenmark. Die von den Nervenenden sezernierten Katecholamine können dann direkt auf immunkompetente Zellen wirken (Kohm and Sanders 2001).

### **1.3. Klassische Konditionierung von Immunfunktionen**

Die Kommunikation zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem spiegelt sich besonders am Beispiel der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen wider. Diese

beruht auf einem von Pavlov bereits Anfang 1900 beschriebenen assoziativen Lernprozess. Für die Konditionierung von Hunden wurde der Klang einer Glocke mit einer Futtergabe gepaart. Bei der Glocke handelte es sich um den konditionierten Stimulus (CS), der wiederholt mit einem unkonditionierten Stimulus (US, Futter) in der Akquisitionsphase dargeboten wurde. Durch den Anblick und den Geruch des Futters kam es bei den Hunden zum Speichelfluss. Dieser Speichelfluss war zunächst eine unkonditionierte Reaktion (UR). Wenn man nach einer wiederholten Paarung der beiden Stimuli in der Evokationsphase den CS ohne den US darbot, in diesem Falle der Klang der Glocke ohne eine Futtergabe, kam es dennoch bei den Hunden zum Speichelfluss. Dabei handelte es sich dann um eine gelernte Antwort auf den CS, die konditionierte Reaktion (CR) (Pavlov and Anrep 2003).

In den 1920er Jahren bediente sich ein Schüler Pavlovs dieses Lernprozesses und zeigte erstmals die Konditionierbarkeit des Immunsystems. In Tierexperimenten paarte er die Injektion eines Extrakts der Tapiokapflanze, das einen Leukozytenanstieg in der Peripherie bewirkt (US), mit dem Erhitzen der Haut oder einem kleinen Einschnitt in die Haut (CS). Nach wiederholter Paarung der beiden Stimuli führte bereits die Re-Exposition mit dem CS zu einem Anstieg der Leukozytenanzahl. In weiteren Experimenten konnte er zeigen, dass dieser Anstieg es den Tieren ermöglichte eine normalerweise tödliche Infektion zu überleben und wies bereits damals die potentielle klinische Relevanz der Konditionierung des Immunsystems auf (Metalnikov and Chorine 1926). Erst ein halbes Jahrhundert später rückte die Immunkonditionierung im Rahmen der Gründung der PNI durch Robert Ader und Nicholas Cohen wieder in das Interesse der Wissenschaft, als sie zeigten, dass sich der immunsuppressive Effekt von Cyclophosphamid konditionieren lässt (Ader 1974).

Im Laufe der Evolution könnten sich diese assoziativen Lernprozesse und ihr Einfluss auf das Immunsystem entwickelt haben, um als Anpassungsmechanismus den Organismus davor zu schützen sich einer potentiell schädlichen Immunantwort auszuliefern, indem der Kontakt oder die Aufnahme von immunmodulierenden Substanzen vermieden wird (Schedlowski and Pacheco-López 2010). Diese erlernte Aversion stellt ein typisches Protokoll zur Konditionierung von Immunfunktionen dar. Dabei wird meist ein neuartiger Geschmack (CS) mit der Injektion eines immunmodulativen Medikaments (US) gepaart. Nach ein- oder mehrmaliger Paarung genügt die Präsentation des CS alleine zum Hervorrufen einer CR auf der Verhaltensweise in Form einer Meidung des CS. Einhergehend mit der CTA zeigen die Tiere eine konditionierte Veränderung von Immunfunktionen (Lückemann et al. 2017).

#### **1.4. Klassische Konditionierung von Immunfunktionen im Tiermodell**

Nach den Pionierarbeiten von Robert Ader und Nicholas Cohen, in denen sie Cyclophosphamid (US) mit einer Saccharinlösung (CS) paarten und so neben der CTA eine erhöhte Mortalität der konditionierten Tiere beobachteten (Ader 1974, Ader and Cohen 1982, Ader et al. 1982), folgten viele weitere Studien, die die Konditionierbarkeit des Immunsystems untersucht haben. Neben einer Immunsuppression konnte in anderen Studien auch eine Immunstimulation konditioniert werden. Die Paarung von Hühnereiweiß-Lysozym (US) mit dem Geschmacksreiz einer Saccharin-Lösung (CS) führte bei Ratten zu einem konditionierten Anstieg der Antikörperproduktion (Alvarezborda et al. 1995). Auch die Ausschüttung von Corticosteronen konnte konditioniert werden. Dafür wurde eine intraperitoneale Injektion des *Staphylococcus* Enterotoxin B (US) zusammen mit dem süßen Geschmack einer Saccharin-Lösung dargeboten. Neben einer starken CTA und einer verstärkten IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion zeigten die Tiere bei der Re-Exposition des CS ebenfalls erhöhte Plasma-Corticosteronspiegel (Pacheco-Lopez et al. 2004). Anfang der 1990er Jahre wurde erstmalig ein Konditionierungsparadigma entworfen, in dem das immunsuppressive Medikament Cyclosporin A (CsA) als US mit einer Saccharin-Lösung (CS) gepaart wurde (Grochowicz et al. 1991). Die mit CsA konditionierten Tiere zeigten eine reduzierte Splenozytenproliferationsrate und eine inhibierte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion (Exton et al. 1998a, Exton et al. 1998b).

#### **1.5. Klassische Konditionierung von Immunfunktionen im Menschen**

Das stetig wachsende Wissen über die Neuro-Immun-Kommunikation und die experimentellen Erkenntnisse aus Tierstudien lieferten die Basis zur Untersuchung der Konditionierung von Immunfunktionen im Menschen. Eine erste Studie diesbezüglich wurde bereits 1886 durchgeführt als MacKenzie beschrieb, dass man mit der Darbietung einer künstlichen Rose bei Allergikern einen Asthmaanfall auslösen kann (MacKenzie 1886). In späteren Studien konnte die Konditionierung von weiteren allergischen Symptomen gezeigt werden, wie eine Überempfindlichkeitsreaktion der Haut (Smith Jr and Mcdaniel 1983), ein Anstieg der Mastzelltrypaseaktivität (Gauci et al. 1994) oder eine verstärkte Histaminausschüttung (Barrett et al. 2000). Auch andere Immunfunktionen können konditioniert werden. Mittels einer wiederholten Kombination aus einem süßen Geschmack und einem Rauschgeräusch zusammen mit Epinephrin-Injektionen, konnte die Arbeitsgruppe um Buske-Kirschbaum eine Immunaktivierung in Form eines Anstieges der Anzahl natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) konditionieren (Buske-Kirschbaum et al. 1994).

Basierend auf den Erkenntnissen tierexperimenteller Studien wurde ebenfalls ein Paradigma zur Konditionierung immunsuppressiver Effekte entwickelt. Durch eine viermalige Paarung von CsA mit einem neuartigen grünen Getränk konnte in gesunden

männlichen Probanden der immunsuppressive Effekt des Medikaments auf die T-Helferzellen Typ 1 (TH1)-Zytokineproduktion (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) konditioniert werden (Goebel et al. 2002, Wirth et al. 2011, Ober et al. 2012, Albring et al. 2014). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die konditionierten immunsuppressiven Effekte nicht nur mehrmals abgerufen werden können (Wirth et al. 2011), sondern auch dass die Konditionierung durch die Gabe subtherapeutischer CsA-Dosen über mindestens zwei Wochen aufrecht erhalten werden kann (Albring et al. 2014). Dabei ist der Erfolg der klassischen Konditionierung immunsuppressiver Effekte in der Einzelperson abhängig von psychologischen Faktoren wie der Zustandsangst und physiologischen Faktoren wie dem NA-Spiegel im Plasma (Ober et al. 2012).

### **1.6. Mechanismen der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen**

Bei einem assoziativen Lernprozess muss der US mit dem CS verknüpft werden. Das ZNS muss also die Signale, die der CS und der US aussenden empfangen können. Die neuronalen Mechanismen bei der Wahrnehmung von gustatorischen und olfaktorischen Reizen sind gut erforscht. Weniger bekannt hingegen sind die Signalwege, die das ZNS nutzt um die Stimuli der Konditionierungsparadigmen miteinander in Verbindung zu bringen (Schedlowski and Pacheco-López 2010).

Mittels einer N-Methyl-D-Aspartat-induzierten Läsion des Inselkortexes bei Ratten konnte man herausfinden, dass dieser eine große Rolle bei Lernprozessen wie der konditionierten Geschmacksaversion spielt. Eine Verletzung des Inselkortexes verhinderte sowohl die Akquisition als auch die Evokation nicht nur der CTA, sondern auch einer konditionierten Immunsuppression auf Zytokin- und Proliferationsebene (Bermudez-Rattoni and McGaugh 1991, Pacheco-López et al. 2005). Eine Läsion der Amygdala hingegen hatte keinen Einfluss auf die CTA (Bermudez-Rattoni and McGaugh 1991). Es ist wahrscheinlich, dass die Amygdala eher neuronale Mechanismen vermittelt und dabei wichtig ist für das Feedback von Informationen zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem (Ramírez-Amaya et al. 1998).

Die Weiterleitung dieser Signale in die Peripherie scheint bezogen auf die Konditionierung immunsuppressiver Effekte hauptsächlich über das SNS, beziehungsweise den Milznerv stattzufinden. Eine Durchtrennung des Milznerves bei Ratten hat zur Folge, dass die konditionierte Immunantwort auf Zytokin- und Proliferationsebene vollständig verhindert wird (Exton et al. 1998b). Auch eine chemische Sympathektomie mittels 6-Hydroxydopamin bei Ratten führt zu einer Reduktion des Katecholamingehalts der Milz und blockiert den Effekt einer konditionierten Immunsuppression auf Zytokin- und Proliferationsebene vollständig (Exton et al. 2002). Dies lässt darauf schließen, dass die gelernte Antwort von

Immunzellfunktionen durch das SNS hervorgerufen wird (Felten et al. 1987, Madden et al. 1995). Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimieren Rezeptoren für die neuroendokrinen Produkte der SAM (Sympathetic Adrenal Medullary)-Achse. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt unter anderem zur Veränderung des zellulären *Trafficking*, der Proliferation, der Zytokinproduktion und der Antikörperproduktion (Wrona 2006). Bei der Aktivierung des SNS kommt es zur Ausschüttung von ADR und NA (Kohm and Sanders 2001). Durch die Innervation der Milz mit noradrenergen Nervenfasern, können die Katecholamine auf B-Zellen, T-Zellen und dendritische Zellen wirken (Felten et al. 1987). Der Effekt von Katecholaminen wird durch Adrenozeptoren (AR) vermittelt. Dabei unterscheidet man in  $\alpha$ - und  $\beta$ AR, die jeweils noch zwei ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) bzw. drei ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ ) Subtypen aufweisen. Fast alle Immunzellen exprimieren AR (Elenkov et al. 2000), dabei wird der  $\beta_2$ AR am stärksten exprimiert (Kohm and Sanders 2000). Lediglich TH2-Zellen stellen eine Ausnahme dar (Madden 2003).  $\alpha$ AR sind unter normalen Bedingungen auf Immunzellen nicht zu finden. Einige Autoimmunerkrankungen zeigen allerdings eine Änderung des Expressionsmusters von  $\alpha$ AR (Madden 2003). Die Dichte der  $\beta_2$ AR auf der Zelloberfläche unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp. Im Falle von humanen T-Zellen zeigen Suppressor-T-Zellen die höchste Dichte gefolgt von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen (Madden et al. 1995). Dabei muss die Dichte der AR nicht zwangsweise eine Aussage über die Signalstärke geben. B-Zellen weisen beispielsweise eine hohe Dichte an AR auf. Diese besitzen allerdings nur eine geringe Ligandenaffinität, sodass das ans Zellinnere weitergeleitete Signal entsprechend schwach ausfällt (Elenkov et al. 2000).

Verabreicht man Ratten einen Tag nach der Akquisition Propranolol, einen  $\beta$ AR-Antagonisten, blockt dieser vollständig die konditionierte Suppression der Splenozytenproliferation. Zusätzlich führt die Stimulation des  $\beta$ AR mittels Isoproterenol bei Splenozyten unbehauelter Ratten *in vitro* dazu, dass die durch Concanavalin A herbeigeführte Aktivierung der Zellen unterdrückt wird. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von Propranolol vollständig aufgehoben werden. Agonisten des  $\alpha_1$ - oder  $\alpha_2$ AR haben keinerlei Einfluss auf die Zytokinproduktion der Splenozyten (Exton et al. 2002). Schon früher wurde gezeigt, dass ein Anstieg an Katecholaminen vor allem die Migration von NK-Zellen beeinflusst und einen Lymphozytenanstieg bewirkt. Dieser Anstieg wurde durch Propranolol inhibiert, während ein selektiver  $\beta_1$ AR Antagonist keinen Einfluss hatte (Schedlowski et al. 1996). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass gelernte Suppression von Immunfunktionen über  $\beta_2$ AR vermittelt wird.

Kurze Zeit wurde diskutiert, ob die gelernte Unterdrückung von Immunfunktionen durch die HPA-Achse vermittelt wird. In einem Experiment zur CTA mittels Saccharin und Lithiumchlorid (LiCl), einer toxischen aber nicht immunsuppressiven wirkender Substanz,

zeigten die Ratten dennoch eine geringere Immunantwort auf Schafserythrozyten. Man stellte fest, dass die Tiere nach der Re-Exposition mit dem CS einen signifikant höheren Glucocorticoidspiegel aufwiesen (Kelley et al. 1985). Daraus stellte sich die Frage, ob die Immunsuppression nach Repräsentation des CS eher auf dem ausgelösten Stress beruht als auf einer Konditionierung von Immunfunktionen. In weiteren Studien wurde allerdings gezeigt, dass die Re-Exposition des CS keinen Anstieg des Glucocorticoidspiegels zur Folge hat und die beobachtete Immunsuppression nicht in Zusammenhang mit Stress stand (Exton et al. 1999, Wirth et al. 2011).

Bei einem Konditionierungsparadigma, das CsA als US einschließt, muss auch beachtet werden, dass CsA die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und nach einer intraperitonealen Injektion in den für die Konditionierung relevanten Hirnstrukturen nachweisbar ist. Dies weist einen potentiellen afferenten Signalweg für die Konditionierung immunsuppressiver Effekte auf (Lückemann et al. 2017).

### **1.7. Klinische Relevanz der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen**

In vielen Studien wurde bereits untersucht, ob es möglich ist durch die klassische Konditionierung des Immunsystems einen Krankheitsverlauf zu verändern. Dazu wurden unterschiedliche Tiermodelle stellvertretend für verschiedene Krankheiten eingesetzt, wie Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen, allergische Erkrankungen und auch für Organtransplantationen. Dabei konnte die Immunantwort sowohl auf humoraler Ebene als auch auf zellulärer Ebene beeinflusst werden (Schedlowski and Pacheco-López 2010).

An einem Mausmodell für die Autoimmunerkrankung *Lupus Erythematoses* wurde beispielsweise eine konditionierte Verzögerung der Proteinurie und der Mortalität durch eine Paarung von Saccharin und Cyclophosphamid erreicht (Ader and Cohen 1982). Weitere Studien haben sich mit der Verhaltenskonditionierung von asthmaähnlichen Symptomen, anaphylaktischem Schock oder der Histaminfreisetzung beschäftigt. Die Ergebnisse indizieren, dass vor allem Mastzellfunktionen konditioniert werden können (Lückemann et al. 2017). Durch die Konditionierung der NK-Zellantwort mittels Poly-I:C-Injektionen, die mit dem Geruch von Campher gepaart wurden, konnte die Überlebensdauer von an Myelomen erkrankten Mäusen verlängert werden (Ghanta et al. 1987). In einem Modell für rheumatoide Arthritis bei Ratten konnte durch die Assoziation von einem neuartigen Geschmack und Cyclophosphamid oder CsA eine signifikante Abnahme der Gelenkentzündung gezeigt werden (Klosterhalfen and Klosterhalfen 1990).

Eines der am besten etablierten Modelle zur Konditionierung von Immunfunktionen in Ratten kombiniert eine Saccharinlösung (CS) mit der Injektion des immunsuppressiven Medikaments CsA (US) (Grochowicz et al. 1991, Exton et al. 1998b, Exton et al. 2001, Wirth

et al. 2011, Hadamitzky et al. 2016). Mit diesem Paradigma zur Konditionierung immunsuppressiver Effekte konnte die Abstoßung MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-inkompatibler Herztransplantate verzögert werden (Grochowicz et al. 1991). Später konnte der gleiche Erfolg für heterotrophe Herztransplantationen erzielt werden (Hadamitzky et al. 2016). Dabei konnte *in vitro* eine signifikant reduzierte Splenozytenproliferation und Zytokinproduktion (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) beobachtet werden (Exton et al. 1998a, Exton et al. 1998b). Eine konditionierte Reduktion der durch Kontakthypersensibilität mit DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) hervorgerufenen Hautanschwellung konnte im Rahmen dieses Paradigmas ebenfalls gezeigt werden (Exton et al. 2000).

Studien, die eine klinische Applikation der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen im Menschen aufweisen, wurden ebenfalls bereits durchgeführt. Bei Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie konnte die anti-histaminerge Wirkung von Desloratadin, unter anderem in Form einer reduzierten Basophilenaktivität, konditioniert werden. Dafür wurde das Medikament (US) mit einem neuartig schmeckenden grünen Getränk (CS) gepaart (Goebel et al. 2008). Ein weiteres Beispiel ist die durch Cyclophosphamid hervorgerufene Abnahme von Leukozyten, die bei Patienten mit multipler Sklerose konditioniert werden konnte, indem die Patienten angewiesen wurden kurz vor der Einnahme des Medikaments einen nach Anis schmeckenden Sirup zu trinken (Giang et al. 1996).

Sowohl die vielen tierexperimentellen Studien als auch die Befunde aus Humanstudien zeigen die mannigfaltigen Möglichkeiten einer klinischen Anwendung der klassischen Konditionierung von Immunfunktionen.

### **1.8. $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Immunsuppression**

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte durch die Aktivierung des SNS vermittelt wird und dass der Milznerv dabei eine essentielle Rolle spielt (Exton et al. 1998b, Exton et al. 2002). Die noradrenergen Nervenfasern des Milznervs innervieren bis in die weiße Pulpa, sodass die sezernierten Katecholamine direkt an die entsprechenden AR der immunkompetenten Zellen binden können (Felten et al. 1987, Madden et al. 1995). Ferner konnten weitere Studien nachweisen, dass die konditionierten immunsuppressiven Effekte wahrscheinlich über  $\beta_2$ AR an Lymphozyten vermittelt werden (Schedlowski et al. 1996, Exton et al. 2002). Die Stimulation des  $\beta$ AR auf Immunzellen führt wiederum zur Veränderung der Anzahl und der Funktion dieser Zellen (Wrona 2006). Bei dendritischen Zellen wird die Kapazität zur Modulation der Antigenpräsentation verändert. Ferner wird die klonale Expansion von

Lymphozyten beeinflusst sowie die Migration, das *Trafficking* der Zellen und die zelluläre Immunantwort (Tracey 2009). Weniger bekannt sind bis jetzt allerdings die durch die Aktivierung des  $\beta_2$ AR ausgelösten intrazellulären Signalwege, die letztendlich zur Suppression der Immunzellfunktionen führen. Um das volle Potential der klassischen Konditionierung immunsuppressiver Effekte analysieren zu können, ist es von wichtiger Bedeutung die zugrunde liegenden Signalwege zu erfassen.

Bei AR handelt es sich um aus sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices bestehende G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Ein G-Protein besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Bei der Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP) in der  $\alpha$ -Untereinheit. Dadurch diffundiert diese ab und aktiviert die Adenylatcyclase (AC). Diese produziert auf dieses Signal hin den *Second Messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP aktiviert und reguliert die Proteinkinase A (PKA). Von der PKA existieren zwei Isoformen, die entweder an der Zellmembran lokalisiert sind (PKA-1) oder sich im intrazellulären Raum befinden (PKA-2). Die PKA vermittelt einen Großteil der resultierenden Gentranskription. Die Signaltransduktion wird durch den Abbau von cAMP über Phosphodiesterasen (PDE) terminiert. Diese klassische Kaskade nach der Aktivierung des  $\beta_2$ AR wird von G-Proteinen der Klasse  $G_s$  vermittelt (Lorton and Bellinger 2015).

Die Stimulation des  $\beta_2$ AR auf  $CD4^+$  T-Zellen führt zur Suppression wichtiger T-Zellfunktionen wie der antigen- und mitogeninduzierten Produktion von IL-2 und der Expression des IL-2 Rezeptors (IL-2 R) (Sanders 1995). Zusätzlich verhindert die Aktivierung des  $\beta_2$ AR die Differenzierung naiver  $CD4^+$  T-Zellen zu TH1-Zellen (Panina-Bordignon et al. 1997). Ursächlich für die durch die Aktivierung des AR hervorgerufenen Effekte ist der intrazelluläre Anstieg von cAMP, der zu einer Inhibition einer Reihe biochemischer Reaktionen führt (Mary et al. 1987). Der cAMP-Spiegel in der Zelle ist ein Resultat der gegensätzlichen Aktivität der AC und PDE (Torgersen et al. 2002). Obwohl bekannt ist, dass cAMP weitere Zielproteine aufweist, bleibt die PKA dennoch das Haupttarget des *Second Messengers*. Die große Spanne an zellulären Mechanismen, die durch die Kinase reguliert werden und das breite Substratspektrum des Enzyms implizieren das Vorhandensein von Regulationsprozessen, die eine spezifische Reaktion gewährleisten. Zu diesen Regulationsmechanismen gehören die verschiedenen Isoformen der PKA, die unterschiedliche Expression dieser Isoformen in verschiedenen Zelltypen und die Kompartimentierung durch Gerüstproteine (Torgersen et al. 2002). Die PKA vermittelt verschiedene Signalwege, die die Inhibition der IL-2-Expression nach  $\beta_2$ AR-Stimulation erklären können.

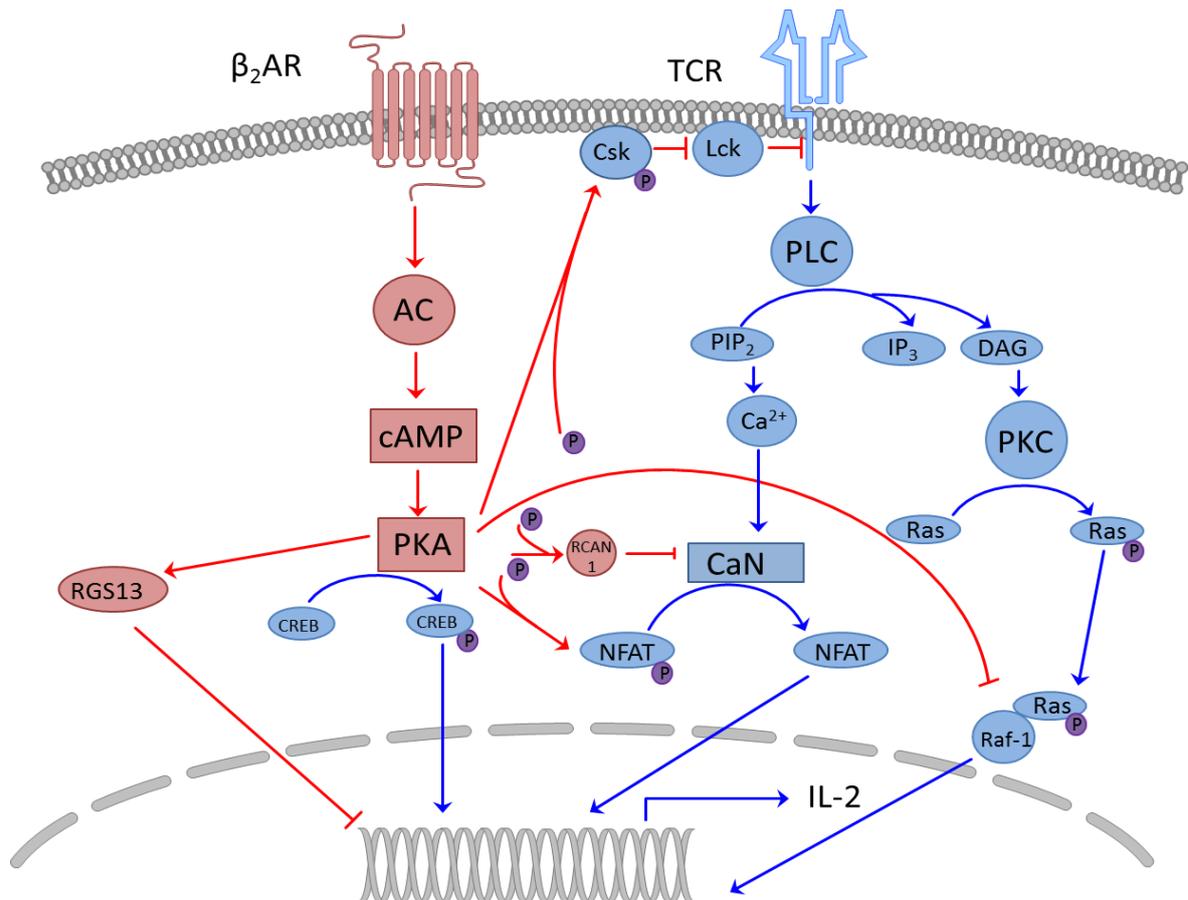
Proximal zum T-Zell-Rezeptor (TCR) befinden sich intrazellulär *Lipid Rafts*, kleine Regionen detergentenresistenter Lipiddomänen der Membran. Sowohl die cAMP-herstellende Maschinerie (AC) als auch die Effektoren dieser (PKA und Csk) sind in einem solchen *Lipid Raft* lokalisiert. Steigt der cAMP-Spiegel an, wird die PKA aktiviert. Diese phosphoryliert wiederum die C-terminale Src-Kinase (Csk), wodurch diese einen zwei- bis vierfachen Anstieg ihrer Aktivität erfährt. Die Csk reguliert die lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase (Lck) negativ, ebenfalls über eine spezifische Phosphorylierung. Dadurch nimmt die Aktivität der Lck ab. Diese ist so nicht mehr in der Lage die  $\zeta$ -Kette des TCR zu phosphorylieren und es kommt zu Inhibition der TCR induzierten IL-2-Produktion in Jurkat-Zellen (Vang et al. 2001) (Abbildung 2).

Die Aktivierung des TCRs durch eine antigenpräsentierende Zelle führt zu Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> führt zu einem Anstieg des intrazellulären Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-Spiegels, während DAG die Proteinkinase C (PKC) induziert. Die PKC phosphoryliert und aktiviert so Ras. Ras bindet Raf-1 (*rapidly accelerated fibrosarcoma-1* Protein), wodurch Raf-1 vom Zytosol zur Membran transloziert. Dort wird es von membranständigen Kinasen aktiviert. Dies startet die mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK)/ mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)/ extrazelluläre signalregulierende Kinase (ERK)-Kaskade, die letztendlich den Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1) aktiviert. AP-1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Expression von IL-2. In Jurkat-Zellen konnte gezeigt werden, dass Raf-1 eine *Phosphosite* besitzt, die direkt durch die PKA phosphoryliert werden kann und Raf-1 inhibiert (Ramstad et al. 2000). Durch die Inhibition von Raf-1 kann die MEK/MAPK/ERK-Kaskade nicht gestartet werden und die Aktivierung von AP-1 fällt aus, wodurch ein wichtiges Signal für die IL-2-Expression fehlt (Abbildung 2).

Proteine der RGS (*Regulator of G-Protein Signaling*)-Familie regulieren das GPCR-Signaling an der Membran. Eines der kleinsten RGS-Proteine ist das RGS13. Die Aktivierung der PKA durch cAMP führt in HEK293T- und NIH 3T3-Zellen ebenfalls zu Aktivierung des RGS13, das daraufhin im Kern akkumuliert und mit dem phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP Response Element-Binding* Protein) reagiert. CREB ist ein wichtiger Faktor für die Expression von IL-2. RGS13 reduziert die Bindung von CREB an CRE (*cAMP Response Elemente*) im Promoter und verhindert die notwendige Assoziation von CREB mit dem Co-Faktor CBP (*CREB Binding Protein*) oder p300 (Xie et al. 2008) (Abbildung 2).

In EL4-TB6 Zellen, einer Mauslymphomzelllinie, wurde gezeigt, dass die PKA nach der Aktivierung durch cAMP in der Lage ist NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) zu phosphorylieren. Somit wird die Nukleustranslokation verhindert und die IL-2-Expression inhibiert (Beals et al. 1997). Die PKA phosphoryliert NFAT an einer konservierten Stelle nahe der Kernlokalisierungssequenz. Diese Phosphorylierung reguliert die Bindung des 14-3-3-Proteins an NFAT. Wenn 14-3-3 gebunden ist, kann keine Kerntranslokation stattfinden. Durch die Dephosphorylierung von NFAT via Calcineurin (CaN) löst sich die Bindung zu 14-3-3. Die PKA und CaN sind folglich gegensätzlich arbeitende NFAT-Regulatoren (Chow and Davis 2000) (Abbildung 2). Ferner phosphoryliert die PKA einen endogenen Regulator von CaN (RCAN1). Dieser bindet die Phosphatase und inhibiert das Enzym, was ebenfalls zu einer reduzierten IL-2-Expression führt (Kim et al. 2015) (Abbildung 2).

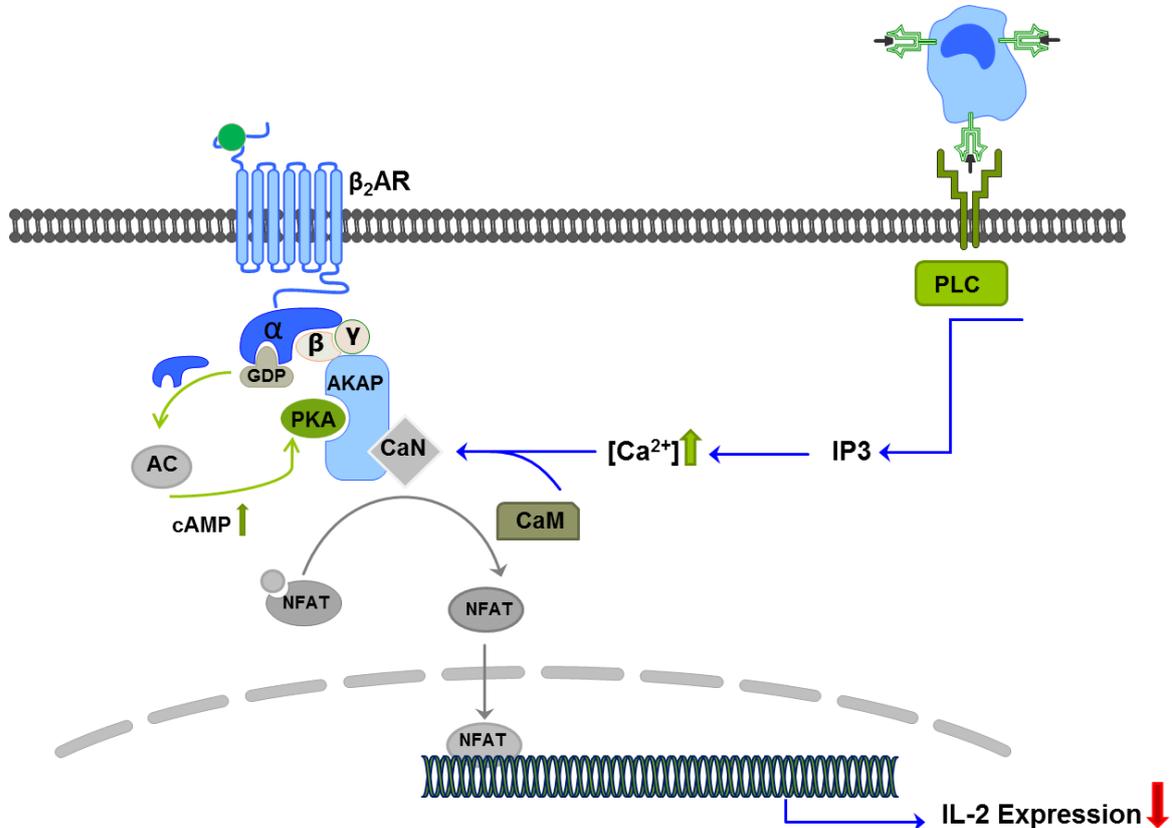
Bei der Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist CaN von maßgeblicher Bedeutung. Der durch die Aktivierung der T-Zellen entstandene Anstieg des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels führt dazu, dass Ca<sup>2+</sup> an Calmodulin (CaM) bindet. Dieser Komplex bindet wiederum CaN und es kommt zu einer vollständigen Aktivierung der Phosphatase. So kann CaN NFAT dephosphorylieren, welches in dieser Form in den Nukleus translozieren kann und zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression von IL-2 initiiert (Liu 1993) (Abbildung 2). Durch die Konditionierung immunsuppressiver Effekte in Ratten mit der Hilfe einer Kombination von Saccharin als CS und CsA als US konnte eine verminderte CaN-Aktivität in den Splenozyten konditionierter Tiere nach CS Re-Exposition gemessen werden. Des Weiteren führt eine Behandlung von Splenozyten mit dem  $\beta_2$ AR-Agonisten Terbutalin (TERB) ebenfalls zu einer reduzierten CaN-Aktivität (Pacheco-López et al. 2009). So liegt die Vermutung nahe, dass CaN ein Schlüsselenzym in der durch  $\beta_2$ AR vermittelten Immunsuppression ist.



**Abbildung 2:  $\beta_2$ AR-Signaling in  $CD4^+$  T-Zellen.** Wird der TCR auf  $CD4^+$  T-Zellen aktiviert, kommt es zur Aktivierung der PLC. Diese spaltet  $PIP_2$  zu  $IP_3$  und DAG. DAG aktiviert die PKC, worauf diese Ras phosphoryliert. In dieser Form kann Ras an den Transkriptionsfaktor Raf-1 binden, der die Expression von IL-2 bedingt.  $PIP_2$  sorgt für den Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels. Dieser Anstieg aktiviert die  $Ca^{2+}$ /CaM-abhängige Proteinphosphatase CaN. CaN dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT. Dieser transloziert so in den Nucleus und startet ebenfalls die Expression von IL-2. Ein weiterer Transkriptionsfaktor für die T-Zell-Aktivierung ist die phosphorylierte Form von CREB. Wird der  $\beta_2$ AR auf T-Zellen durch die Bindung eines Agonisten wie ADR oder NA stimuliert, kommt es durch das an den an Rezeptor assoziierte G-Protein zur Aktivierung der AC, die auf dieses Signal hin cAMP produziert. Der Hauptdownstreamfaktor von cAMP ist die PKA. Die Proteinkinase ist in der Lage Raf-1 zu phosphorylieren und so zu inhibieren. Hohe Konzentrationen des *Second Messengers* und die Aktivierung der PKA führen zur Akkumulation von RGS13 im Nucleus, wodurch die Bindung von CREB an die DNA negativ beeinflusst wird, was eine verminderte IL-2-Produktion zur Folge hat. Überdies kann die PKA NFAT phosphorylieren und so eine Kerntanslokation verhindern. Auch Csk kann durch die PKA phosphoryliert werden. In der phosphorylierten Form inhibiert Csk Lck, wodurch wiederum der TCR inhibiert wird. Die PKA phosphoryliert und aktiviert ebenfalls den endogenen Regulator von CaN RCAN1, der inhibierend auf CaN wirkt. Abbildung angefertigt mit Motifolio®. AC: Adenylatcyclase; ADR: Adrenalin; CaM: Calmodulin; CaN: Calcineurin; Csk: C-terminale Src-Kinase; DAG: Diacylglycerol;  $IP_3$ : Inositoltriphosphat; Lck: Lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase; NA: Noradrenalin;  $PIP_2$ : Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; RCAN: endogener Regulator von Calcineurin; RGS: Regulator of G-Protein Signaling; TCR: T-Zellrezeptor;  $\beta_2$ AR:  $\beta_2$ -Adrenozeptor.

Da die PKA ein Enzym mit einem sehr breiten Substratspektrum ist, bedient sich die Zelle sogenannter Gerüstproteine. Dazu gehören die A Kinase-Anker-Proteine (AKAP), diese binden sowohl die PKA als auch ihre Effektorproteine, so dass die Kinase spezifisch Substrate umsetzen kann.  $CD4^+$  T-Zellen exprimieren sowohl AKAP 79 als auch AKAP 250, die in der Lage sind den  $\beta_2$ AR, PKA und CaN zu binden (Riether et al. 2011). CaN ist das Target der immunsuppressiven Wirkstoffe CsA und Tacrolimus (Tac) (Liu et al. 1991). In aus der Rattenmilz isolierten  $CD4^+$  T-Zellen führt die Aktivierung des  $\beta_2$ AR zur Rekrutierung

von CaN an AKAP 79. Durch die Bindung selbst oder durch einen indirekten Einfluss der PKA kommt es zur Inhibition von CaN. So ist die Phosphatase nicht mehr in der Lage NFAT zu dephosphorylieren, wodurch die IL-2 Produktion inhibiert wird (Riether et al. 2011) (Abbildung 3).



**Abbildung 3:  $\beta_2$ AR-abhängige Inhibition der IL-2-Produktion über CaN.** Von Riether et al. (2011) wurde ein weiterer möglicher Signalweg für die Inhibition der IL-2 Produktion für isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Ratte beschrieben. Der  $\beta_2$ AR ist intrazellulär an der Membran mit einem AKAP verankert. Dieses bindet nicht nur die PKA, sondern auch Substrate der PKA und ermöglicht so die Bildung eines Mikroreaktionsraums, in dem die PKA Substrate spezifisch umsetzen kann. Es konnte gezeigt werden, dass das AKAP 79 in der Lage ist, neben dem  $\beta_2$ AR und der PKA auch CaN zu binden. Durch diese Bindung kommt es zu einer Inhibition von CaN. Wird der TCR gleichzeitig stimuliert, führt die Inhibition von CaN dazu, dass NFAT nicht dephosphoryliert werden kann, somit nicht in den Nucleus translozieren kann und folglich nicht die IL-2-Expression bedingen kann. Abbildung angefertigt mit Motifolio®. AC: Adenylatcyclase; AKAP: A Kinase-Anker-Protein; CaM: Calmodulin; CaN: Calcineurin; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C;  $\beta_2$ AR:  $\beta_2$ -Adrenozeptor.

Welcher oder welche der beschriebenen Signalwege in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Stimulation des  $\beta_2$ AR zur Inhibition der IL-2-Produktion führen, ist unbekannt. Der von Riether et al. (2011) beschriebene Signalweg bietet über das gemeinsame Schlüsselenzym CaN eine direkte Verbindung zwischen der Wirkung von CsA und der klassischen Konditionierung immunsuppressiver Effekte wie sie für die Paarung von CsA mit Saccharin oder einem grünen Getränk beschrieben wurden (Goebel et al. 2002, Wirth et al. 2011, Ober et al. 2012, Albring et al. 2014).

### **1.9. Zielsetzung der Arbeit**

Nach einer Organtransplantation sind die Empfänger ein Leben lang auf die Einnahme immunsuppressiver Medikamente angewiesen. Die bekanntesten Immunsuppressiva sind die CaN-Inhibitoren CsA und Tac (Halloran 2004). Sie verhindern die IL-2-Produktion von CD4<sup>+</sup> T Zellen, wodurch die Aktivität des Immunsystems reduziert wird (Liu et al. 1991). Leider ist die Einnahme dieser Medikamente mit immensen Nebenwirkungen verknüpft. Nephrotoxizität, Bluthochdruck, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes und Tumorerkrankungen sind nur wenige davon (de Mattos et al. 2000). Eine Reduktion der Nebenwirkungen würde die Lebensqualität transplantierter Patienten deutlich steigern.

In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte beim Menschen möglich ist (Goebel et al. 2002, Albring et al. 2014). Das Ziel all dieser Studien ist eine klinische Anwendung der gelernten Immunsuppression. Nachdem tierexperimentelle Befunde bereits das therapeutische Potential aufgewiesen haben und gezeigt haben, dass eine Konditionierung auch nach einer Präexposition mit dem US noch möglich ist (Schedlowski and Pacheco-López 2010, Lückemann et al. 2017), galt es nun zu analysieren, ob die Einbettung eines Konditionierungsparadigmas in ein bereits bestehendes immunsuppressives pharmakologisches Regime bei Menschen möglich ist. Dafür wurde Paradigma entworfen, dass von den teilnehmenden nierentransplantierten Patienten ohne großen Aufwand in die tägliche Einnahme ihrer Medikamente eingebaut werden konnten. Die Studienteilnehmer wurden gebeten ihre morgendliche und abendliche Medikamenteneinnahme mit einem neuartig schmeckenden grünen Getränk an drei aufeinander folgenden Tagen zu kombinieren. Nach einer zweitägigen Pause wurde vier und acht Stunden nach der CsA- oder Tac-Einnahme die Einnahme von Placebokapseln integriert, die ebenfalls mit dem CS kombiniert wurden. Vor und nach der Konditionierung wurde zwei, sechs und zehn Stunden nach der Einnahme der immunsuppressiven Medikamente Blut abgenommen und die T-Zellfunktionen sowie neuroendokrine Parameter untersucht und miteinander verglichen. Ziel der Konditionierung war es, durch die zusätzliche Einnahme der Placebokapseln in Kombination mit dem CS, den zirkadianen Anstieg der T-Zellfunktionen zu reduzieren. Mit Hilfe dieser Befunde soll eine Grundlage gebildet werden, mit der die Konditionierung immunsuppressiver Effekte in Zukunft als eine ergänzende Therapieform genutzt werden kann. Diese könnte es ermöglichen die benötigte Medikation zu reduzieren und dennoch einen maximalen therapeutischen Effekt beizubehalten. Die Reduktion der Medikamentendosis hätte also eine Minimierung der Nebenwirkungen und somit eine

Maximierung der Lebensqualität von Betroffenen zur Folge (Schedlowski and Pacheco-López 2010).

Für den Erfolg der klassischen Konditionierung als ergänzende Therapie ist es ebenfalls wichtig zu verstehen, wie ein neuartig schmeckendes Getränk die T-Zellfunktionen inhibieren kann. Tierexperimentelle Befunde zeigen, dass die Konditionierung immunsuppressiver Effekte über das SNS und die Ausschüttung von ADR und NA vermittelt wird (Exton et al. 2002). ADR und NA können über  $\beta_2$ AR an  $CD4^+$  T-Zellen binden und eine Inhibition der IL-2-Produktion herbeiführen (Wrona 2006). Hingegen ist nicht bekannt, welche intrazellulären Signalwege in humanen  $CD4^+$  T-Zellen nach der Aktivierung des  $\beta_2$ AR zur IL-2-Inhibition führen. Vor diesem Hintergrund wurden humane  $CD4^+$  T-Zellen aus Vollblut isoliert und mit Hilfe von TERB stimuliert. In verschiedenen Experimenten wurden die möglichen zu Grunde liegenden Signalwege untersucht. Dies diente dem möglichst vollständigen Verständnis der Mechanismen der klassischen Konditionierung immunsuppressiver Effekte beim Menschen. Dabei diente als Ausgangspunkt die tierexperimentelle Studie von Riether et al. (2011), in der er zeigen konnte, dass CaN durch die Stimulation des  $\beta_2$ AR inhibiert wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienteilnehmer

Insgesamt nahmen 30 klinisch stabile nierentransplantierte Patienten (24 Männer und 6 Frauen) an der Studie teil. Alle Teilnehmer wurden mit einem CaN-Inhibitor behandelt (CsA: 22, Tac: 8). Das Durchschnittsalter der Teilnehmer lag bei  $55,53 \pm 11,72$  Jahren, der durchschnittliche BMI betrug  $27,12 \pm 4,69$  kg/m<sup>2</sup> und die Zeit zwischen der Transplantation und der Studienteilnahme betrug  $77,69 \pm 71,69$  Monaten (siehe Tabelle 1). Die Erkrankungen, die zu der Nierentransplantation führten, waren benigne Nephrosklerose, Nephroangiosklerose, Neuropathie (vaskulär, diabetisch, Reflux- und Analgetika-), polyzystische Nierenerkrankungen, Glomerulonephritis (chronisch, IgA-, Minimal Change-), Nierenzellkarzinome, IgA-Vaskulitis und interstitielle Nephritis (siehe Tabelle 2). Zwei Patienten wurden bereits einmal transplantiert, mussten aber erneut eine Spenderniere erhalten.

**Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Patientenkohorte.** \*Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD)

<b>Geschlecht</b> (männlich/weiblich)	24 / 6
<b>Alter</b> (in Jahren)	$55,53 \pm 11,72^*$
<b>BMI</b> (in kg/m <sup>2</sup> )	$27,12 \pm 4,69^*$
<b>Calcineurin Inhibitor</b> (CsA/Tac)	22 / 8
<b>CsA/Tac Spiegel</b> (10 h nach Einnahme, in ng/ml)	$93,86 \pm 41,11^*$ / $6,16 \pm 2,19^*$
<b>Zeit seit Transplantation</b> (in Monaten)	$77,21 \pm 71,69^*$
<b>Mehrfach Transplantierte</b>	2

Die Patienten nahmen ihre immunsuppressiven Medikamente zweimal täglich in einem 12 Stunden-Rhythmus ein. Die weitere pharmakologische Behandlung der Patienten und die kardiovaskulären Parameter der Teilnehmer an den Studientagen 1 und 8 sind Tabelle 4 und

Tabelle 5 im Anhang zu entnehmen. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte über eine Kooperation mit der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen. Bei regelmäßigen Kontrolluntersuchungen wurden potentielle Teilnehmer identifiziert, dann telefonisch kontaktiert und nach dem Interesse an einer Studienteilnahme gefragt. Bei Interesse wurden die Patienten über die Studie informiert und erhielten postalisch weitere Informationsmaterialien, mit Hilfe derer die Interessenten zusätzlich schriftlich über die Studienhypothese, den Studienablauf und potentielle Risiken aufgeklärt wurden. Die

teilnehmenden Patienten wurden über die Zusammensetzung des CS und die Einnahme der Placebos informiert („Open Label“). Die Teilnehmer wurden darauf hingewiesen, dass sie jeder Zeit ohne die Angabe von Gründen die Teilnahme beenden könnten. Für die Patienten bestand eine Wegeunfallversicherung über das Universitätsklinikum Essen. Weiterhin erhielten sie eine Aufwandsentschädigung von 250€. Eingeschlossen wurden Patienten mit einer stabilen Nierentransplantatfunktion von mindestens sechs Monaten. Die Ausschlusskriterien umfassten das Vorliegen akuter oder chronischer Infektionen, eine erhöhte CRP-Serum-Konzentration (zweifach über der Norm), Abstoßungsepisoden des Transplantats innerhalb der letzten sechs Monate, psychiatrische Erkrankungen, Tumorerkrankungen, Allergien gegen während der Studie verwendete Substanzen (Laktoseintoleranz), sowie die Teilnahme an einer anderen Studie innerhalb der letzten 30 Tage. Die durchgeführte Studie wurde durch das Ethik-Komitee des Universitätsklinikums Essen zugelassen und wurde in das deutsche Register klinischer Studien aufgenommen.

**Tabelle 2: Transplantationsursächliche Diagnosen der Patientenkohorte**

<b>Transplantationsursache</b>	<b>Nierentransplantierte Patienten (n=30)</b>
<b>Nephrosklerose</b>	
Benigne	2
Nephroangiosklerose	1
<b>Nephropathie</b>	
Analgetika	1
Vaskulär	1
Diabetisch	4
Reflux	2
<b>Polyzystische Nierenerkrankungen</b>	5
<b>Glomerulonephritis</b>	
Chronisch	3
IgA	2
Minimal Change	1
<b>Nierenzellkarzinom</b>	1
<b>IgA-Vaskulitis</b>	1
<b>Interstitielle Nephritis</b>	1
<b>Unbekannte Genese</b>	5

Des Weiteren wurden im Rahmen einer anderen Konditionierungsstudie Studie 29 gesunde, männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 50 untersucht und deren immunologische Parameter vor (Baselinemessung) und zwei Stunden nach der Einnahme von CsA gemessen. Dafür wurde zu beiden Zeitpunkten Blut entnommen. Die Probanden erhielten eine CsA-Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über Aushänge und Anzeigen in Internet-Jobbörsen für Studenten. In einem Gespräch wurden die Probanden über die Risiken der Studie aufgeklärt und darüber

informiert, dass sie die Studie jederzeit ohne die Angabe von Gründen abbrechen könnten. Nach einer schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte die Voruntersuchung der Probanden durch die Klinik für Nephrologie, um das Vorliegen immunologischer, endokriner, kardiovaskulärer, hämatologischer oder psychischer Erkrankungen ausschließen zu können. Weitere Ausschlusskriterien waren Allergien gegen in der Studie eingesetzte Substanzen, Alkohol- oder Drogenabusus, Diabetes, größere Blutabnahmen innerhalb der letzten zwei Monate (>200 ml), eine Behandlung mit immunmodulierenden Medikamenten oder Impfungen innerhalb von drei Monaten vor der Studienteilnahme bzw. während der Studienteilnahme. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen genehmigt und die Probanden wurden für die Studienteilnahme versichert. Zusätzlich erhielten sie eine Aufwandsentschädigung von 350€.

**Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Probandenkohorte.** Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD

<b>Alter</b> (in Jahren)	26,10 $\pm$ 4,23
<b>BMI</b> (in kg/m <sup>2</sup> )	24,75 $\pm$ 2,91

## 2.2. Konditionierungsparadigma

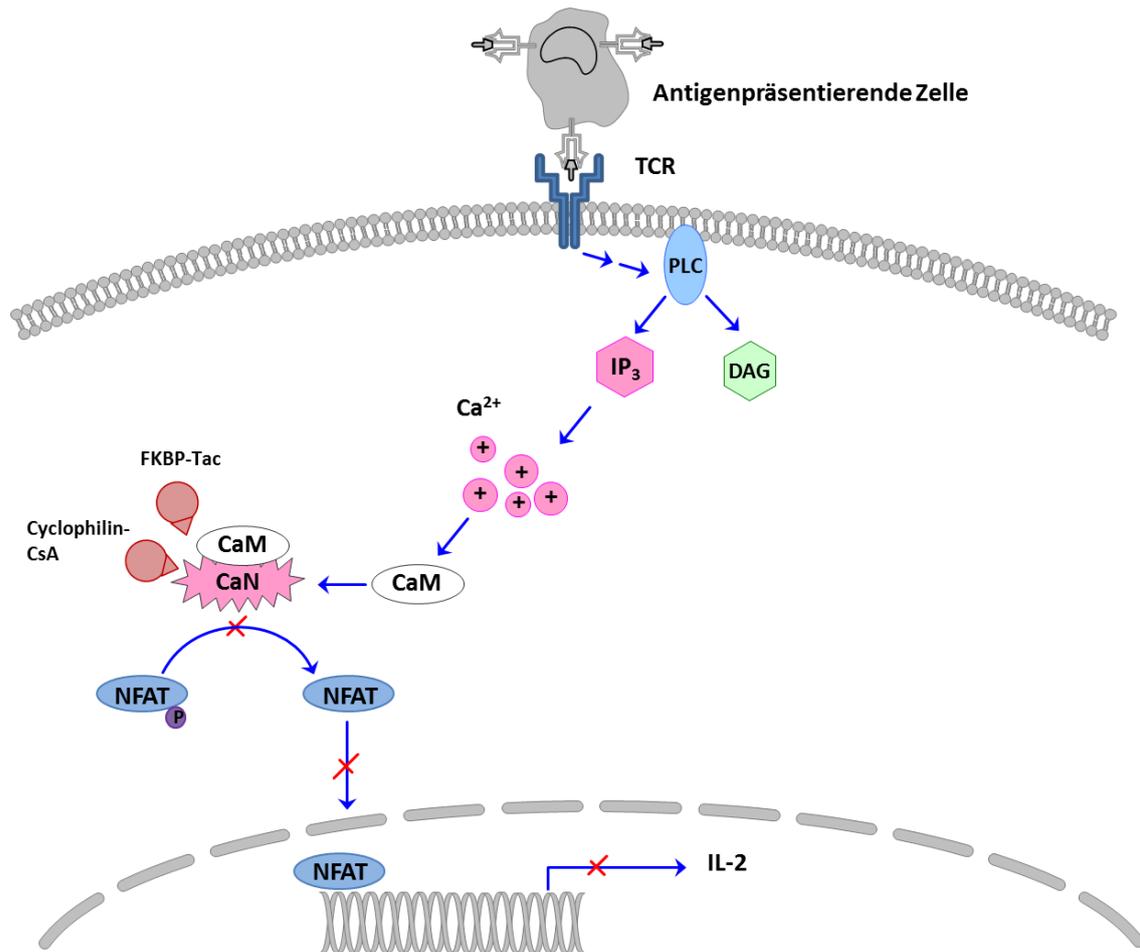
### 2.2.1. Der unkonditionierte Stimulus

Als unkonditionierter Stimulus dienten die von den Patienten eingenommenen CaN-Inhibitoren CsA oder Tac. Artur Rügger und seine Kollegen entdeckten CsA bei der Untersuchung von Metaboliten des Pilzstamms *Trichoderma polysporum Rifai*. Diesen hatten sie in Bodenproben gefunden, die sie zuvor in Norwegen gesammelt hatten. Einer der Metaboliten fiel durch seine antifungische Aktivität auf. Überraschenderweise zeigte er auch eine starke Hemmung der humoralen und zellulären Immunität (Rügger et al. 1976). CsA unterschied sich von den bisherigen Immunsuppressiva sowohl im Wirkmechanismus als auch in dem geringeren Grad an Myelotoxizität (Borel et al. 1994). Kino et al. entdeckte 1987 dann FK506 (Tac), das er aus *Streptomyces tsukubaensis* isolierte, als er auf der Suche nach einem ähnlich erfolgreichen immunsuppressiven Medikament war (Kino et al. 1987). Obwohl beide Substanzen eine sehr unterschiedliche Struktur aufweisen, sind die biologischen Eigenschaften von CsA und Tac sehr ähnlich. In ihrer Wirkungsweise auf T-Zellen und Mastzellen unterscheiden sie sich lediglich durch die Antwort auf Rapamycin und das Immunophilin 506BD. Bei Rapamycin handelt es sich ebenfalls um ein Immunsuppressivum, das über die Inhibition von mTor (*mammalian Target of Rapamycin*) antiproliferativ wirkt. 506BD blockiert die Wirkung von Tac, aber nicht die von CsA, während Tac, aber nicht CsA, die Wirkung von Rapamycin verhindert (Liu et al. 1991). CsA und Tac

inhibieren bestimmte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse, wie die durch Immunglobulin (Ig) E stimulierte Exocytose von Mastzellen und die Transkription von IL-2 in T-Helferzellen nach der Aktivierung des TCR (Liu 1993).

Nach dem Eintritt in die T-Helferzellen bindet CsA an Cyclophilin A und Tac an FKBP-12 (*FK506 Binding Protein*), sogenannte Immunophiline bzw. Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen, die für die Aktivität der Inhibitoren benötigt werden. Der Komplex aus dem Immunophilin und dem Immunsuppressivum inhibiert CaN, indem es an eine hydrophobe Region zwischen der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit bindet (Steinbach et al. 2007) (Abbildung 4).

CaN spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Wird der TCR stimuliert, führt dies zur Aktivierung der PLC, die  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und DAG hydrolysiert.  $\text{IP}_3$  bindet an den entsprechenden Rezeptor und es kommt zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Der resultierende Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels führt dazu, dass  $\text{Ca}^{2+}$  an den *Second Messenger* Calmodulin (CaM) bindet. Ebenso bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an CaN und bedingt eine Teilaktivierung der Proteinphosphatase. Durch diese Konformationsänderung kann nun auch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM an das Enzym binden. Es folgt eine erneute Konformationsänderung und die vollständige Aktivierung von CaN. CaN dephosphoryliert NFAT, wodurch dieser in den Kern transloziert und dort im Verbund mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  startet. Die pharmakologische Inhibition von CaN durch CsA und Tac hat zur Folge, dass NFAT nicht dephosphoryliert wird und somit nicht in den Kern wandern kann. Folglich kommt es zu einer Inhibition der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion (Liu 1993) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Wirkmechanismus von CsA/Tac.** Die Aktivierung des TCRs auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch eine antigenpräsentierende Zelle initiiert eine Signalkaskade, die die PLC aktiviert. Diese spaltet PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub>. Während DAG die PKC aktiviert, führt IP<sub>3</sub> zum Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels. Ca<sup>2+</sup> bindet an CaM und aktiviert die *Second Messenger*. Ca<sup>2+</sup> bindet ebenfalls an CaN selbst, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, die eine Teilaktivierung der Proteinphosphatase zur Folge hat. In dieser Form kann Ca<sup>2+</sup>/CaM ebenfalls an CaN binden, es kommt zu einer erneuten Konformationsänderung und damit zur vollständigen Aktivierung von CaN. So kann CaN NFAT dephosphorylieren, welches in dieser Form in den Nucleus translozieren kann und zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Expression von IL-2 startet. CaN ist das Zielprotein einer Immunsuppression durch CsA oder Tac. Nach dem Eintritt in die T-Helferzellen bindet CsA an Cyclophilin A und Tac an FKBP12. Der Komplex aus dem Immunophilin und dem Immunsuppressivum inhibiert CaN, indem es an eine hydrophobe Region zwischen der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit bindet. Abbildung angefertigt mit Motifolio®. CaM: Calmodulin; CaN: Calcineurin; DAG: Diacylglycerol; FKBP: FK506 Binding Protein; IP<sub>3</sub>: Insositoltriphosphat; PLC: Phospholipase C; TCR: T-Zellrezeptor.

### 2.2.2. Der konditionierte Stimulus

Als konditionierter Stimulus diente ein neuartig schmeckendes grünes Getränk, das aus einer grün gefärbten und mit Lavendelöl versetzten Erdbeermilch bestand. Die Grünfärbung diente der Entfremdung des Getränks.

Dieses Getränk wurde in einer ähnlichen Zusammensetzung bereits in mehreren Studien erfolgreich als konditionierter Stimulus verwendet (Goebel et al. 2002, Wirth et al. 2011, Albring et al. 2012, Ober et al. 2012, Albring et al. 2014). Für diese Studie wurden der

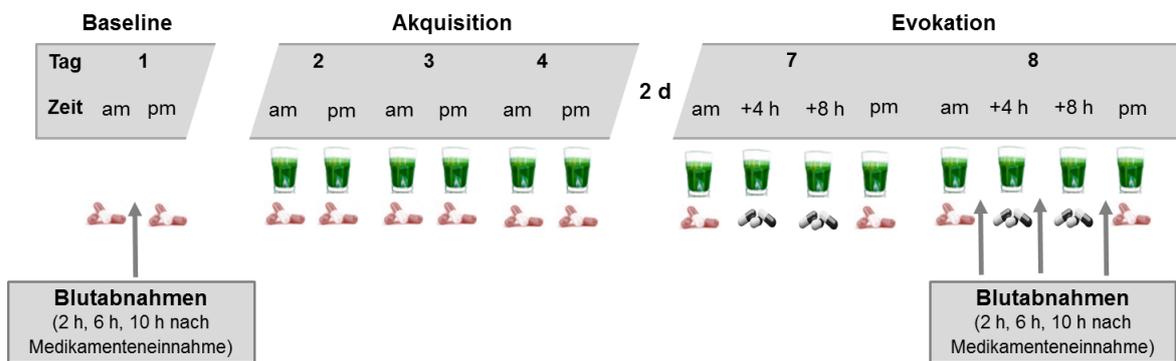
Geschmack und die Farbe des Getränks intensiviert, sodass die zu trinkende Menge reduziert werden konnte.

Die Patienten wurden gebeten je 50 ml des Getränks bei der Einnahme der immunsuppressiven Medikamente morgens und abends zu trinken. Dabei wurden sie dazu angehalten, sich auf die Einnahme der Medikamente und das Trinken des CS zu konzentrieren und, wenn möglich, dies auch immer in der gleichen Umgebung durchzuführen. Idealerweise sollten die Teilnehmer nach dem grünen Getränk reichlich kohlenensäurehaltiges Mineralwasser konsumieren. Dies bedingt ein Aufstoßen des Lavendelgeschmacks, wodurch der Geschmacksreiz des konditionierten Stimulus länger erhalten bleiben soll und so eine länger anhaltende Verbindung zwischen dem Geschmacksreiz und der Medikamenteneinnahme hergestellt wird.

### **2.3. Studiendesign**

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Studie basierte auf einem bereits etablierten Konditionierungsparadigma, in dem ein neuartig schmeckendes grünes Getränk als CS diente und mit den von den Patienten eingenommenen CaN-Inhibitoren kombiniert wird. Die Studie lief über einen Zeitraum von acht Tagen. Es handelte sich um ein „*Open Label*“- und „*Within Subject*“-Design. Die Teilnehmer wurden über die Inhaltsstoffe des grünen Getränks und über die Einnahme von Placebos informiert. An Tag 1 erschienen die Patienten zwei Stunden nach der morgendlichen Medikamenteneinnahme vor Ort. Über den Tag wurden zwei, sechs und zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme Blutproben entnommen, um wichtige immunologische und neuroendokrine Parameter bestimmen zu können. Dies diente der Messung einer Baselinekinetik. Nach der letzten Blutentnahme erhielten die Teilnehmer die nötigen Materialien, um einen Großteil der Studie zu Hause absolvieren zu können. An Tag 2 bis 4, im Rahmen der Akquisitionsphase, tranken die Teilnehmer zu ihren morgendlichen und abendlichen Medikamenteneinnahmen je 50 ml des grünen Getränks. Nach einer zweitägigen Pause begann die Evokationsphase an Tag 7 und 8. Zusätzlich zu der täglichen Einnahme der CaN-Inhibitoren wurden die Patienten gebeten, jeweils 4 und 8 Stunden nach der ersten Medikation Placebokapseln einzunehmen und diese ebenfalls mit dem CS zu paaren. Dies sollte den zirkadianen Anstieg der Immunparameter, der durch die Abnahme des Medikamentenspiegels bedingt wird, entgegenwirken. An Tag 8 (Post Conditioning) erschienen die Versuchsteilnehmer erneut vor Ort und es wurden zu den gleichen Zeitpunkten wie zuvor an Tag 1 Blutproben entnommen. Die immunologischen und neuroendokrinen Parameter wurden erneut gemessen und mit Tag 1 (Pre Conditioning) verglichen, um den Erfolg der Konditionierung bestimmen zu können. Weder vor, noch während oder nach der Studie wurde die Medikation der Patienten verändert.

Bei den erhobenen immunologischen Immunparametern handelte es sich um die IL-2-Konzentration im Kulturüberstand von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC), die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion auf mRNA Ebene, eine quantitative Bestimmung der T-Zellsubpopulationen und die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Als neuroendokrinologische Parameter wurden die Cortisol-, ADR- und NA-Spiegel im Plasma erfasst. Zusätzlich wurde zu allen Zeitpunkten der CsA- oder Tac-Spiegel im Blut bestimmt. Damit die nierentransplantierten Patienten ihre jeweiligen Zeitpunkte der Medikamenteneinnahme nicht zu sehr verschieben mussten, wurden Patienten mit ähnlichen Einnahmezeitpunkten für die Studienteilnahme in Gruppen zusammengefasst.



**Abbildung 5: Studiendesign.** Die Studiendauer betrug acht Tage. Es handelte sich um ein „*Within Subject*“-Design. Am ersten Tag wurde den Patienten zu drei Zeitpunkten (zwei, sechs und zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme) vor Ort Blut abgenommen, um eine Baselinekinetik immunologischer und neuroendokriner Parameter messen zu können. Von Tag 2 bis 4 fand die Akquisition statt. Zusammen mit den morgendlichen und abendlichen Medikamenten tranken die Patienten je 50 ml des grünen Getränks. Nach sechsmaliger Paarung der Medikamente mit dem CS, fand eine zweitägige Pause statt. Anschließend startete die Evokation an Tag 7 und 8. Neben der morgendlichen und abendlichen Einnahme der immunsuppressiven Medikamente zusammen mit dem grünen Getränk, wurde die Einnahme eines Placebos integriert. Dieser wurde ebenfalls in Kombination mit dem Getränk vier und acht Stunden nach der Medikamenteneinnahme eingenommen. Während die Patienten die Tage 2 bis 7 zu Hause ableisteten, fanden an Tag 8 erneute Blutabnahmen zwei, sechs und zehn Stunden nach der CsA-/Tac-Einnahme vor Ort statt. Wieder wurde eine Kinetik verschiedener immunologischer und neuroendokriner Parameter gemessen und die Werte von Tag 1 (Pre Conditioning) mit den Werten von Tag 8 (Post Conditioning) verglichen.

## 2.4. Immunologische Parameter

### 2.4.1. Zellisolierung

Mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMCs aus heparinisiertem Vollblut isoliert (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Dazu wurde das Blut zunächst in einem 1:2 Verhältnis mit 1 x DPBS (Gibco®, life technology, Darmstadt, Deutschland) verdünnt und dann auf Ficoll (Ficoll-Paque™ Plus, GE Health Care, Uppsala, Schweden) aufgeschichtet. Durch eine Zentrifugation (450 x g, Raumtemperatur (RT), 30 min, R0) wandern die unterschiedlichen Zelltypen zum Punkt der eigenen Dichte. Dabei sammeln sich PBMCs und Thrombozyten in einer Schicht zwischen dem Plasma-DPBS-Gemisch und dem Ficoll. Diese Schicht wurde vorsichtig abgenommen und zur Reinigung von Ficoll- und Plasmaresten sowie von Thrombozyten zwei Mal mit HBSS (Gibco®, life technologies, Darmstadt, Deutschland) gewaschen (Zentrifugation bei 450 x g, RT, 10 min). Das Zellpellet wurde anschließend in 7 ml Medium (RPMI 1640, GlutaMAX, 25mM HEPES, 10% fetales Kälberserum, 50 µg/ml Gentamicin, Gibco®, life technologies, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und die gewünschte Zellkonzentration mit Hilfe eines Hämatologie-Analysators (XP-300, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) eingestellt.

### 2.4.2. Stimulationsantikörper

Für die Stimulation der PBMCs und der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden lösliche, monoklonale, murine, anti-humane CD3 Antikörper (LEAF™ Purified anti-human CD3, Klon HIT3a, BioLegend, San Diego, USA) verwendet. Bei der Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusätzlich lösliche, monoklonale, murine, anti-humane CD28 Antikörper (LEAF™ Purified anti-human CD28, Klon CD28.2, BioLegend, San Diego, USA) genutzt.

### 2.4.3. Bestimmung der IL-2-Konzentration im Kulturüberstand

500.000 PBMCs wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte (Zellkulturtestplatte 96F, TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät und mit 20 ng/ml anti-humanen CD3 Antikörpern für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für mindestens 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Die IL-2-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISAs (*Enzyme linked immunosorbent Assay*, Human IL-2 ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, San Diego, USA) nach Herstellerangaben bestimmt und mit Hilfe des Fluostar OPTIMA Microplate Readers (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) ausgewertet. Zuvor wurden die Proben 1:5 mit dem im ELISA Kit beiliegenden *Assay Diluent* verdünnt.

### 2.4.4. Bestimmung der IL-2-mRNA Expression

5.000.000 PBMCs wurden in eine 24-Well Mikrotiterplatte (Zellkulturtestplatten 24F, TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät und mit 40 ng/ml anti-humanen CD3 Antikörpern für 4

Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm wurde die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA spektrometrisch bestimmt (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die reverse Transkription wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben vorgenommen (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung des Takyon™ Low Rox Probe MasterMix UNG (Eurogentec, Köln, Deutschland) und folgender Primer (forward: 5'-CCAGGA TGCTCACATTTAAGTTTTAC-3'; reverse: 5'-GAGGTTTGAGTTCTTC TTCTAGACACTGA-3') und Sonden (5'-6-FAM-TGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAA-BHQ1-3') (Mircosynth, Balgach, Schweiz) bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 5 min bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen à 3 sek. bei 95°C, 20 sek. bei 60°C und 26 sek. bei 72°C. Die Quantifizierung der IL-2-mRNA-Expression wurde über eine Standardkurve vorgenommen. Dafür wurden seriell verdünnte cDNA-Proben eingesetzt, die zuvor aus aufgereinigten, spezifischen PCR-Produkten hergestellt wurden (High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

#### **2.4.5. Bestimmung der IFN- $\gamma$ -mRNA Expression**

Die Bestimmung der IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression wurde, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben, durchgeführt unter der Verwendung der folgenden Primer und Sonden: Primer forward 5'-TCAGCTCTGCATCGTTTTGG-3', reverse 5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3'; Sonde 5'-TTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGT-3' (Mircosynth, Balgach, Schweiz). Die Quantifizierung der IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression wurde über eine Standardkurve vorgenommen. Dafür wurden seriell verdünnte cDNA-Proben eingesetzt, die zuvor aus aufgereinigten, spezifischen PCR-Produkten hergestellt wurden (High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

#### **2.4.6. Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay Kit (Molecular Probes™, ThermoFisher scientific, München, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt. 250.000 PBMCs wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit 2,5  $\mu$ g/ml anti-humanen CD3 Antikörper für insgesamt 72 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Nach 24 Stunden wurden 10  $\mu$ M des Thymidin Analogon 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) hinzugefügt. EdU wird bei der DNA Synthese von den Zellen eingebaut. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit FACS (Fluorescence Associated Cell Sorting)-Puffer (DPBS versetzt mit 5% fetalen Kälberserum,

1 µg/ml Natrium Azid, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen und mit einem APC konjugierten anti-humanen CD4 Antikörpern (APC Mouse anti-human CD4, BD Pharmingen™, BD Bioscience, San Diego, USA) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit einem saponinhaltigen Puffer permeabilisiert (im Kit enthalten). Es folgte die Inkubation mit dem Click-iT Reaktion-Cocktail. Der prozentuale Anteil der proliferierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit Hilfe des FACS Canto II durchflusszytometrisch bestimmt und mit der FACS Diva Software ausgewertet (BD FACS Canto II, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA).

#### **2.4.7. Durchflusszytometrische Quantifizierung der zirkulierenden CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Zur Bestimmung der zirkulierenden CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden 250.000 PBMCs mit den folgenden fluorochromkonjugierten Antikörpern für 45 min inkubiert: anti-humaner CD3 PE-Cy 7 Antikörper (PE-Cy™ 7 Maus anti-human CD3, Klon SK7, BD Pharmingen™, BD Bioscience, San Diego, USA) und anti-humaner CD4 Alexa Fluor 405 Antikörper (Maus anti-human CD4 Alexa 405, Serotec, Bio-Rad Antibodies, Bio-Rad, München, Deutschland). Anschließend erfolgte die Lyse eventueller Erythorzytenreste mittels FACS™ Lysing Solution (1:10 mit Aqua dest., BD Bioscience, San Diego, USA) gefolgt von einem Waschschrift mit FACS-Puffer. Der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen wurde mit Hilfe des FACS Canto II durchflusszytometrisch bestimmt und mit der FACS Diva Software ausgewertet.

#### **2.4.8. Bestimmung des CsA- und Tac-Spiegels**

Die CsA oder Tac-Konzentration im Vollblut wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen bestimmt. Zur Bestimmung des CsA-Spiegels wurde dabei ein ACMIA (*Affinity Chromatography mediated Immunoassay*), ein Immunoassay mit bichromatischer, kinetischer Auswertung nach Herstellerangaben genutzt und mittels DIMENSION Xpand (Siemens Health Care GmbH, Erlangen, Deutschland) ausgewertet. Die Tac-Spiegel wurden mit einem Einschnitt-Immunoassay nach Herstellerangaben gemessen und anhand von Chemilumineszenz mit Hilfe des Architect i1000SR (Abbott, Chicago, USA) ausgewertet.

### **2.5. Neuroendokrine Parameter**

#### **2.5.1. Bestimmung der Cortisolkonzentration im Plasma**

EDTA-Blut wurde zentrifugiert (4°C, 2000 x g, 10 min) und das Plasma anschließend bei -80°C eingefroren. Die Cortisolkonzentration im Plasma wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISAs nach Herstellerangaben bestimmt (Cortisol ELISA für humanes Serum

oder Plasma, IBL international, Hamburg, Deutschland) und mit Hilfe des Fluostar OPTIMA Microplate Readers ausgewertet.

### **2.5.2. Bestimmung der Katecholaminkonzentration im Plasma**

Zuvor auf Eis gekühltes EDTA-Blut wurde zentrifugiert (4°C, 2000 x g, 10 min) und das Plasma anschließend bei -80°C eingefroren. Die Isolation der Katecholamine erfolgte mit Hilfe eines Kits zur Aufreinigung von Katecholaminen aus Plasma nach Herstellerangaben (Kit für Katecholamine im Plasma – HPLC, Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Deutschland). Die Bestimmung der Konzentration von ADR und NA mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) fand in Kooperation mit der Klinik für Nephrologie statt. Für die Quantifizierung wurden ausgewählte HPLC-Trennsäulen und eine für das Trennvorhaben optimierte mobile Phase verwendet (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Deutschland).

## **2.6. *In vitro* Experimente zur $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelten Immunsuppression in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

### **2.6.1. Isolierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

In einem ersten Schritt wurden zunächst wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben PBMCs aus heparinisiertem Vollblut gewonnen. Nach den Waschschrritten wurden die Zellen in MACS-Puffer (autoMACS™ Rinsing Solution, 1:20 MACS™ BSA Stock Solution, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aufgenommen und die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels Magnet Associated Cell Sorting (MACS) negativ isoliert. Dafür wurde das CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Herstellergaben genutzt. Die gewünschte Zellkonzentration wurde mit Hilfe eines Hämatologie-Analysators eingestellt und die Zellen in der entsprechenden Menge Medium (RPMI 1640, GlutaMAX, 25mM HEPES, 10% fetales Kälberserum, 50 µg/ml Gentamicin, Gibco®, life technology, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen.

### **2.6.2. Verwendete Inhibitoren**

Zur Inhibition der PKA wurden H-89 (H-89 Dihydrochlorid Hydrat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und das Inhibitorfragment 14-22 (Protein Kinase A Inhibitorfragment 14-22, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) eingesetzt. Die PKA-AKAP-Bindung wurde mit St-Ht 31 (InCELLtec™ AKAP St-Ht 31 Inhibitor Peptid, Promega, Mannheim, Deutschland) inhibiert. Des Weiteren wurden der  $\beta_2$ AR-Agonist TERB (Terbutalin Hemisulfat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und der  $\beta$ -Antagonist Nadolol (NAD, Nadolol FLUKA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) genutzt. Von H-89, 14-22 und St-Ht 31 wurden Stammlösungen in destilliertem Wasser angesetzt. TERB und NAD wurden vor der Nutzung in Medium gelöst.

### **2.6.3. Bestimmung der IL-2-Konzentration in Kulturüberstand**

Für die Bestimmung der IL-2-Konzentration im Kulturüberstand wurden 250.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit 2,5 µg/ml anti-humanen CD3 Antikörpern und 2,5 µg/ml anti-humanen CD28 Antikörpern oder 5 µg/ml anti-humanen CD3 Antikörpern und 5 µg/ml anti-humanen CD28 Antikörpern in der An- oder Abwesenheit unterschiedlicher Inhibitoren für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Abschließend wurden die Überstände abgenommen und für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert. Der ELISA wurde dann wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

#### 2.6.4. Bestimmung der nukleären NFAT-Fraktion

5.000.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in einer 24-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit 25 µl ImmunoCult™ CD3/CD28 T Cell Activator (Stemcell Technologies, Köln, Deutschland) pro 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen und den in den Ergebnissen angezeigten Konzentrationen an TERB und NAD für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zelllösungen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und eine nukleäre Extraktion mit Hilfe des Nuclear Extract Kits (Active Motif, La Hulpe, Belgien) nach Herstellerangaben vorgenommen. Die dabei entstandene nukleäre Fraktion wurden anschließend mit einer Zentrifugation im Vakuum aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit einem Pierce™ 660nm Protein Assay (Thermo scientific, München, Deutschland) bestimmt.

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wurden die Proben mit Probenpuffer Roti®-Load 1 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und anschließend 5 min auf 95°C erhitzt. Verwendet wurden 10%ige Bis-Tris-Gele. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 120 V vorgenommen. Nach der Gelelektrophorese wurde der Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, München, Deutschland) mit den zugehörigen Membranpacks verwendet (Trans-Blot® Turbo Transferpacks, Bio-Rad, München, Deutschland). Vor der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde eine Blockierung unspezifischer Bindestellen mit einer Magermilch-Lösung vorgenommen. Die Inkubation mit dem anti-NFAT Antikörper (1:200 in Magermilchlösung, NFATC1 Goat pAB, R&D Systems, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) fand über Nacht bei 4°C statt. Nach zweimaligem Waschen wurde erneut blockiert und anschließend die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:1600 in Magermilchlösung, dokey anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) bei Raumtemperatur für 1 Stunde vorgenommen. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal gewaschen. Der Nachweis des gesuchten Proteins erfolgte über *Enhanced Chemoluminescence* (ECL, Immobilon™ Western, Millipore, Billerica, USA). Die Chemolumineszenz wurde mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad, München) detektiert. Je nach Anteil des nachzuweisenden Proteins in der Gesamtmenge wurden unterschiedliche Belichtungszeiten gewählt. Zu Kontrolle der Reinheit der nukleären und der zytosolischen Fraktion wurden zusätzlich β-Aktin (1:4000 in Magermilchlösung, β-Actin 8H10D10 Mouse mAB, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) und Lamin A/C (1:2000 in Magermilchlösung, Lamin A/C 4C11 Mouse mAb, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) nachgewiesen.

### **2.6.5. Bestimmung der cAMP-Konzentration**

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden 5.000.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf eine 24-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit 5 µg/ml anti-humanen CD3 Antikörpern und 5 µg/ml anti-humanen CD28 Antikörpern und in Ab- oder Anwesenheit der in den Ergebnissen angezeigten Konzentrationen an TERB und NAD für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit DPBS gewaschen und nach Herstellerangaben für den cAMP-ELISA vorbereitet. Die Zelllyse und der cAMP-ELISA wurden ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt (Parameter™ cAMP Assay, R&D Systems, Minneapolis, USA) und mit Hilfe des Fluostar OPTIMA Microplate Readers ausgewertet

### **2.7. Statistische Auswertung**

Die Daten der Konditionierungsstudie wurden mit Hilfe des Programms SPSS 22 (SPSS, Chicago, USA) ausgewertet. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Nicht-normalverteilte Daten wurden für weitere Berechnungen logarithmiert. Die immunologischen und neuroendokrinen Parameter wurden mittels mehrfaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) mit Messwiederholungen analysiert. Dabei galten als Faktoren die Konditionierungsphase (Pre/Post Conditioning) und die Zeit nach Medikamenteneinnahme (zwei, sechs und zehn Stunden). Bei signifikanten Effekten wurden Post-Hoc-t-Tests für abhängige Gruppen berechnet. Um für multiple Mittelwertsvergleiche zu kontrollieren, wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Bei signifikanten Interaktionen lag das  $\alpha$ -Niveau bei 0.05/3 (0.017), bei signifikanten Haupteffekten bei 0.05/4 (0.0125). Zum Vergleich der Patientendaten mit den Daten gesunder Probanden wurden t-Tests für abhängige Stichproben gerechnet und Bonferroni-korrigiert. Hier lag das  $\alpha$ -Niveau bei 0.05/7 (0.0071). In den Abbildungen sind zu illustrativen Zwecken die unkorrigierten p-Werte dargestellt. Bei einem Verstoß gegen die Varianzhomogenität wurde eine Greenhouse-Geisser-Korrektur durchgeführt.

Für die *in vitro* Experimente wurden die Daten mit Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet. Dafür wurden die Daten mit dem Shapiro Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Nicht-normalverteilte Daten wurden logarithmiert. Zur Auswertung wurde eine einfache ANOVA mit anschließendem Dunnetts t-Test gerechnet.

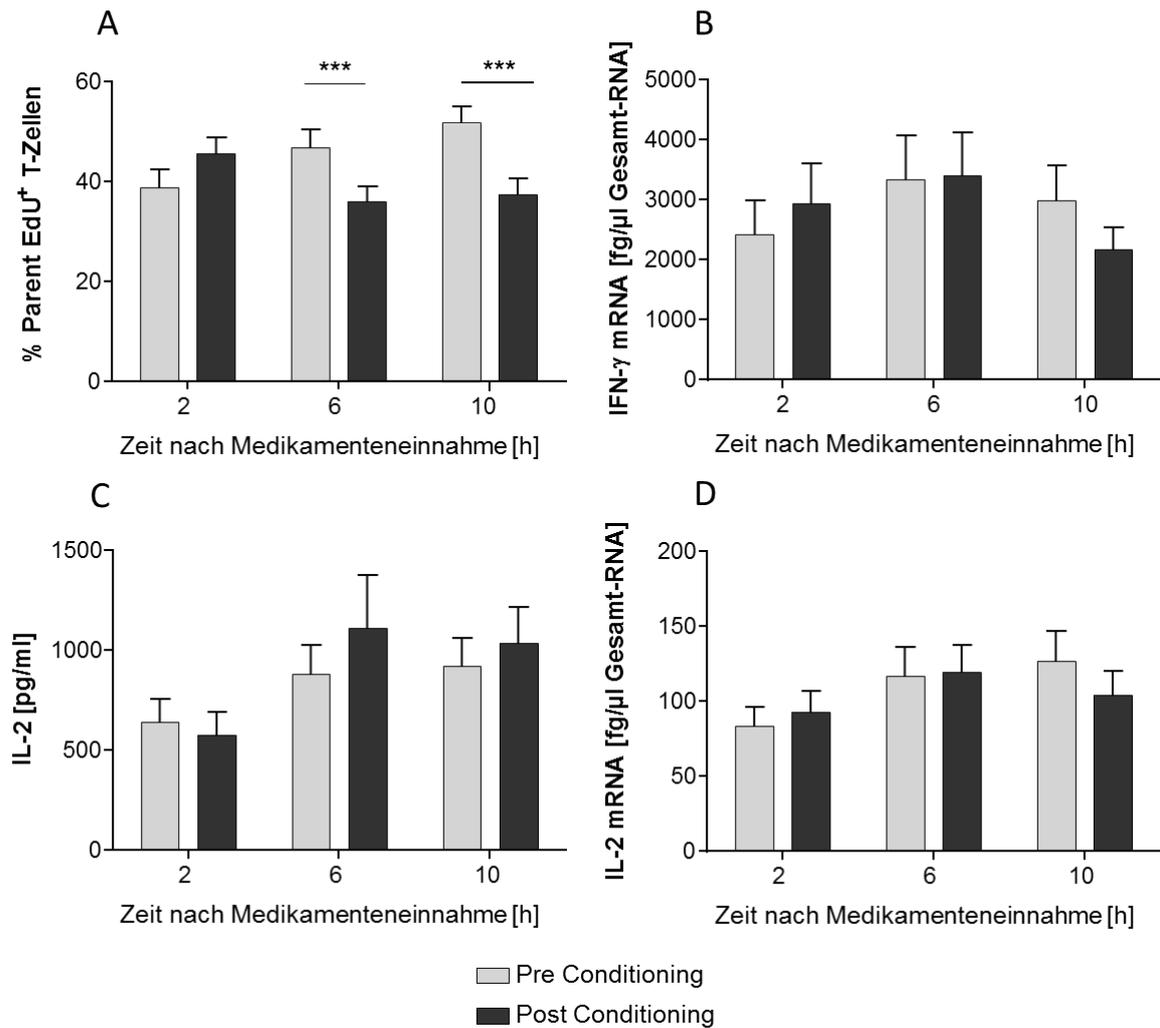
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Gelernte Suppression von T-Zellfunktionen in nierentransplantierten Patienten

Ziel der Experimente war es zu analysieren, ob die Einbettung eines Konditionierungsparadigmas in eine bereits bestehende Behandlung mit einem CaN-Inhibitor bei nierentransplantierten Patienten (n=30) möglich ist. Um den Konditionierungserfolg ausmachen zu können, wurden vor der Konditionierung (Pre Conditioning, Tag 1) und nach der Konditionierung bzw. während der Evokation (Post Conditioning, Tag 8) zu drei Zeitpunkten (zwei, sechs und zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme) Blut entnommen, verschiedene immunologische Parameter gemessen und anschließend miteinander verglichen.

Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte vor der Konditionierung deskriptiv einen zirkadianen Anstieg (Abbildung 6 A). Nach der Konditionierung bzw. während der Evokation konnte dieser Anstieg der Proliferationsrate verhindert werden. Es ergab sich ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen der Zeit nach der Medikamenteneinnahme und der Konditionierungsphase ( $F(2, 56)=14.36, p<0.001$ ). Sowohl sechs Stunden ( $t(28)=4.61, ***p<0.001$ ) als auch zehn Stunden ( $t(28)=5.27, ***p<0.001$ ) nach der Medikamenteneinnahme, also jeweils nach der Einnahme des Placebos gepaart mit dem CS, war die Proliferation signifikant geringer als an Tag 1 (Abbildung 6 A). Bei der IFN- $\gamma$ -mRNA-Konzentration zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt für die Zeit nach der Medikamenteneinnahme ( $F(1.22, 34.16)=6.03, p=0.01$ ) und eine signifikante Interaktion ( $F(1.24, 34.77)=3.83, p=0.05$ ). Leider ergaben sich Post-hoc keine signifikanten Unterschiede. Dennoch ist zu vermerken, dass nach der Konditionierung zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme ein Trend hin zu einer konditionierten Reduktion des IFN- $\gamma$ -mRNA-Levels zu erkennen war ( $t(28)=1.88, p=0.07$ ) (Abbildung 6 B).

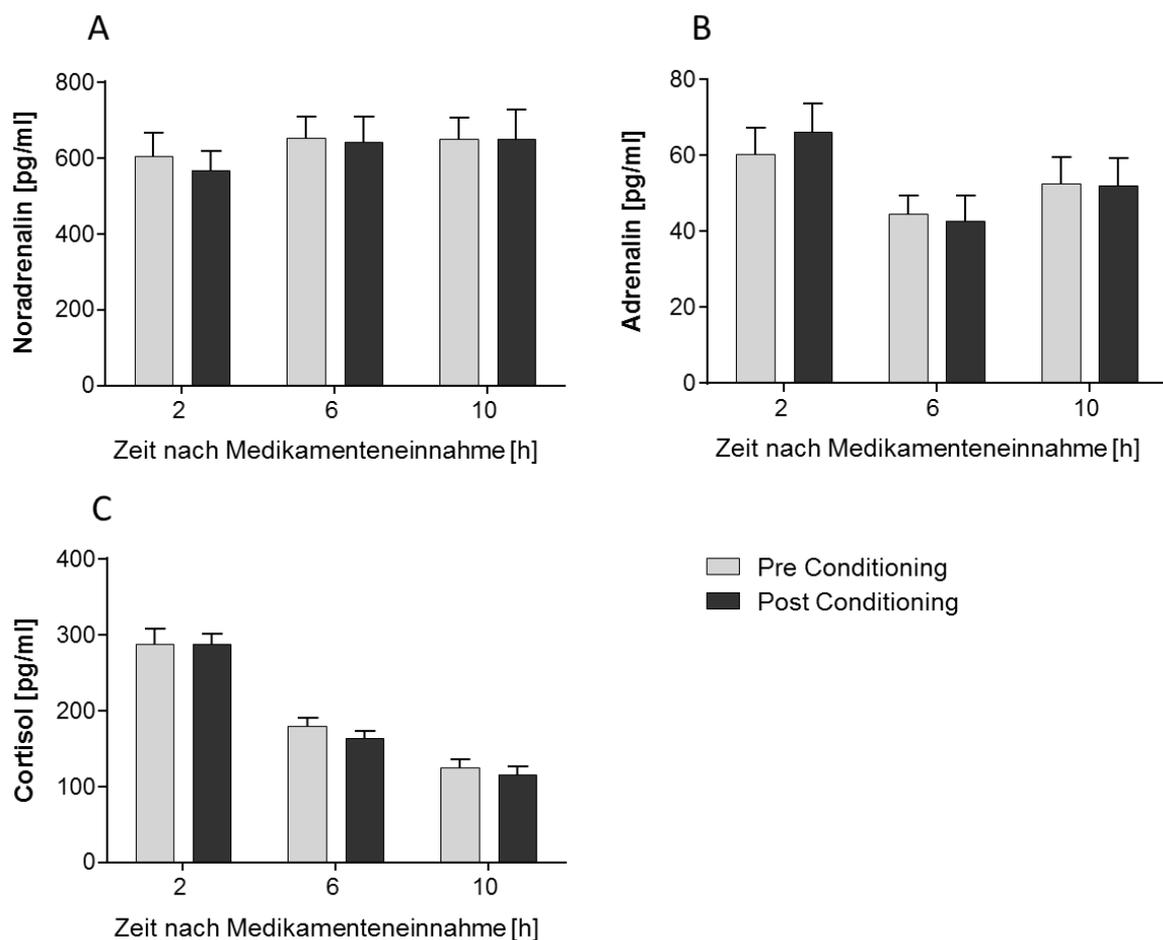
Sowohl vor als auch nach der Konditionierung kam es zu einem zirkadianen Anstieg der IL-2-Produktion, der sich aber zu keinem der drei Messzeitpunkte zwischen den Konditionierungsphasen unterschied (Abbildung 6 C und D). Die zweifaktorielle ANOVA (Analysis of Variance) mit Messwiederholung zeigte einen signifikanten Haupteffekt für die Zeit nach der Medikamenteneinnahme bei der IL-2-mRNA-Konzentration und die IL-2-Proteinkonzentration (mRNA:  $F(2, 58)=8.85, p<0.001$  Protein:  $F(2, 58)=42.12, p<0.001$ ) aber keine signifikante Interaktion (mRNA:  $F(1.60, 46.33)=1.41, \text{nicht signifikant (n.s.)}$  Protein:  $F(2, 58)=1.74, \text{n.s.}$ ).



**Abbildung 6: Gelernte Immunsuppression der T-Zellfunktionen.** An den Studientagen 1 (Pre Conditioning) und 8 (Post Conditioning) wurden den Teilnehmern zu drei Zeitpunkten (zwei, sechs und zehn Stunden nach Medikamenteneinnahme) Blut abgenommen. Aus dem Vollblut wurden die PBMCs isoliert und anschließend mit anti-humanen CD3 Antikörpern stimuliert und die IL-2-Expression auf mRNA-Ebene und Proteinebene, sowie die IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression und die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**A**) zeigte vor der Konditionierung deskriptiv einen zirkadianen Anstieg, der durch die Konditionierung verhindert werden konnte. Die Proliferationsrate war an Tag 8, sechs und zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme signifikant geringer als an Tag 1 (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ). Auf der Ebene der IFN- $\gamma$ -mRNA-Produktion (**B**) zeigte sich ebenfalls eine signifikante Interaktion ( $p = 0.05$ ), allerdings ergaben die Post-hoc-Tests keine signifikanten Unterschiede. Weder bei der IL-2-Proteinkonzentration (**C**) noch bei der IL-2-mRNA-Menge (**D**) war eine konditionierte Immunsuppression zu erkennen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zur Auswertung wurden die Daten gegebenenfalls logarithmiert (B, C, D) und anschließend eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Post-hoc wurde ein t-Test für abhängige Stichproben und eine Bonferroni-Korrektur gerechnet. Dabei ist  $***p < 0.001$ . Abgebildet wurden die unkorrigierten p-Werte. Die Bonferroni-korrigierten p-Werte sind dem Text zu entnehmen.

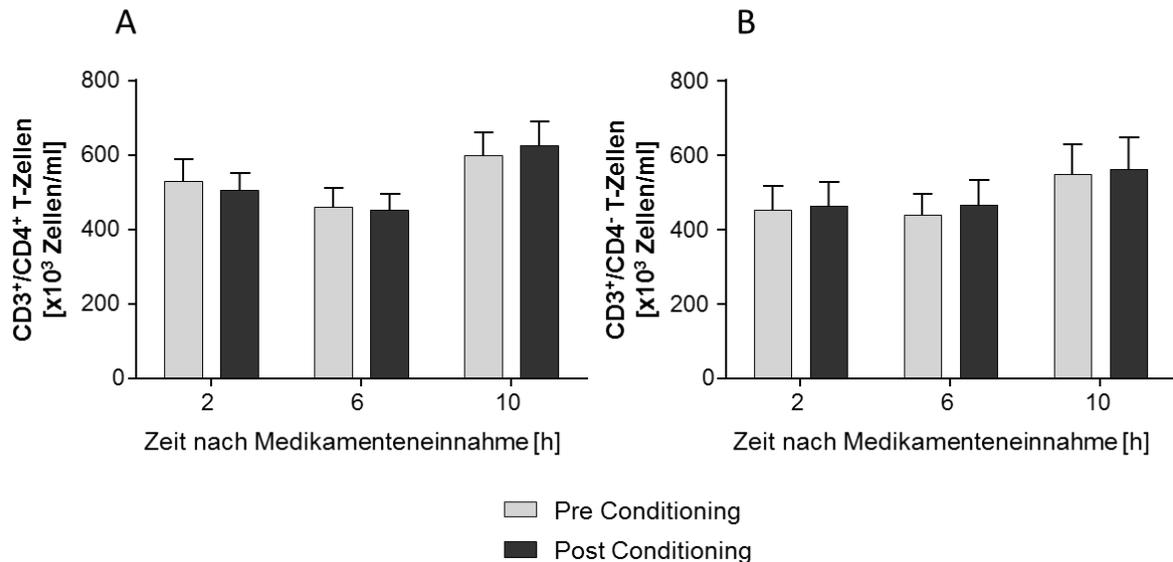
Die NA-, ADR- und Cortisolspiegel im Plasma wurden ebenfalls vor und nach der Konditionierung zu drei Messzeitpunkten (zwei, sechs und zehn Stunden nach Medikamenteneinnahme) bestimmt (Abbildung 7). Es ergab sich kein Unterschied der Spiegel der endokrinen Parameter zu den drei Messzeitpunkten an Tag 1 im Vergleich zu Tag 8. Folglich zeigte die zweifache ANOVA keine signifikante Interaktion für NA oder ADR (NA:  $F(2, 58) = 0.01$ , n.s. ADR:  $F(2, 58) = 0.80$ ; n.s.). Während der NA-Spiegel keine

zirkadianen Veränderungen aufwies (Abbildung 7 A), nahm der ADR-Spiegel über den Tag ab (Abbildung 7 B). Die ANOVA zeigte in diesem Fall einen signifikanten Haupteffekt für die Zeit nach der Medikamenteneinnahme ( $F(1, 29)=8.20, p=0.001$ ). Bei der Cortisolausschüttung ergab sich zwar eine signifikante Interaktion ( $F(2, 58)=4.94, p=0.01$ ), allerdings zeigte sich in den Post-hoc-Rechnungen kein Unterschied zwischen den Konditionierungsphasen zu den einzelnen Messzeitpunkten. Dennoch war ein Trend zu einer geringeren Cortisolproduktion an Tag 8 sechs Stunden nach der Einnahme zu erkennen ( $t(29)=1.95, p=0.06$ ). Wie erwartet nahm der Cortisolspiegel über den Tag hin ab, wodurch sich ein signifikanter Haupteffekt für die Zeit nach der Medikamenteneinnahme ergab ( $F(1.51, 43.76)=158.61, p<0.001$ ) (Abbildung 7 C).



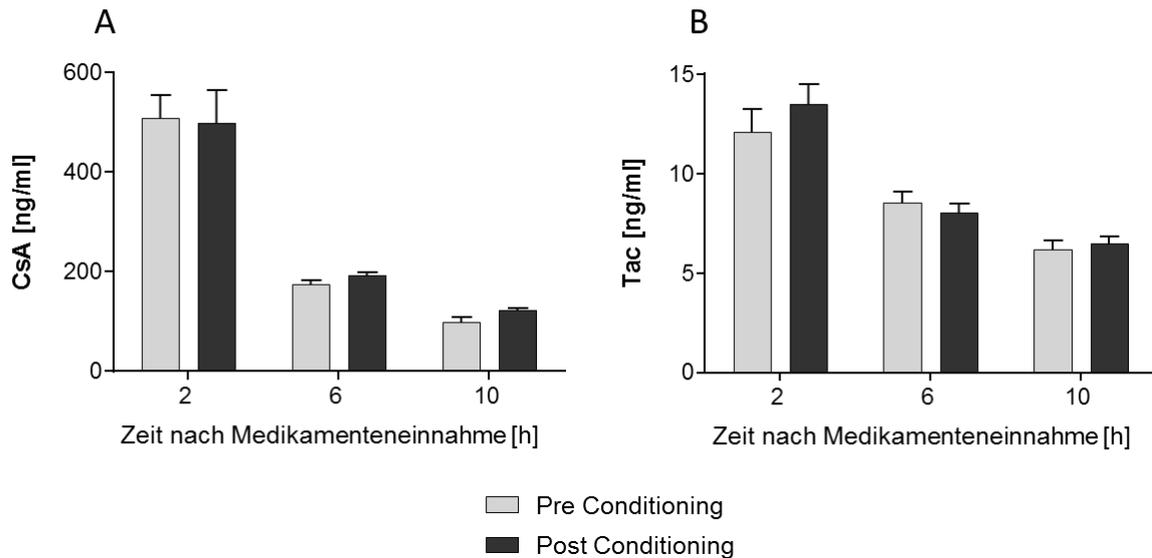
**Abbildung 7: ADR-, NA- und Cortisolspiegel im Plasma.** An Studientag 1 und 8 wurde den Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen, Plasma gewonnen und der Spiegel der drei Hormone bestimmt. Bei NA (A) und ADR (B) zeigte sich kein Unterschied der Spiegel zwischen Tag 1 und Tag 8 zu den drei Messzeitpunkten. Die ANOVA ergab weder für NA, noch für ADR eine signifikante Interaktion. Der Cortisolspiegel (C) zeigte zwar eine signifikante Interaktion. Post-hoc ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten an Tag 1 und 8. Allerdings gab es an Tag 8 sechs Stunden nach der Einnahme einen Trend zu einer reduzierten Cortisolfreisetzung ( $p=0.06$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zur Auswertung wurden die Daten logarithmiert (A, B, C) und anschließend eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Post-hoc wurde ein t-Test für abhängige Stichproben und eine Bonferroni-Korrektur gerechnet.

Die Anzahl der zirkulierenden CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde ebenfalls an Studientag 1 und an Studientag 8 bestimmt. Bei beide Zellpopulationen zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt für die Zeit nach der Medikamenteneinnahme (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen:  $F(1.47, 35.24)=13.85$ ,  $p<0.001$  CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> T-Zellen:  $F(2, 50)=5.93$ ,  $p<0.005$ ). Auch hier ergab sich zwischen der Konditionierungsphase und zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten keine signifikante Interaktion (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen:  $F(2, 48)=0.09$ , n.s. CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> T-Zellen:  $F(2, 50)=0.05$ , n.s.) (Abbildung 8 A und B).



**Abbildung 8: Anzahl der zirkulierenden CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** An Studientag 1 und 8 wurde den Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen und die Anzahl der zirkulierenden CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Dabei ergab sich weder bei den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> (A) noch bei den CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen (B) ein Unterschied zu den einzelnen Messzeitpunkten zwischen den Konditionierungsphasen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zur Auswertung wurden die Daten logarithmiert (A, B) und anschließend eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt.

Überdies wurden die Medikamentenspiegel im Blut an Studientag 1 und 8 zu drei Messzeitpunkten (zwei, sechs und zehn Stunden nach Einnahme) bestimmt (Abbildung 9). Dabei wiesen weder der CsA-Spiegel noch der Tac-Spiegel eine signifikante Interaktion auf (CsA:  $n=8$ ,  $F(2, 14)=2.03$ , n.s. Tac:  $n=22$ ,  $F(1.37, 28.85)=1.57$ , n.s.). Der Spiegel beider Medikamente nahm über den Tag hin ab, wodurch ein signifikanter Haupteffekt für die Zeit nach der Medikamenteneinnahme entstand (CsA:  $n=8$ ,  $F(1, 7)=70.30$ ,  $p<0.001$  Tac:  $n=22$ ,  $F(2, 42)=93.18$ ,  $p<0.001$ ). Dabei fiel wie erwartet die unterschiedliche Pharmakokinetik der Medikamente auf. Obwohl CsA (Abbildung 9 A) sich in wesentlich höheren Konzentrationen im Blut befand als Tac (Abbildung 9 B), wurde CsA dennoch deutlich schneller abgebaut als Tac.

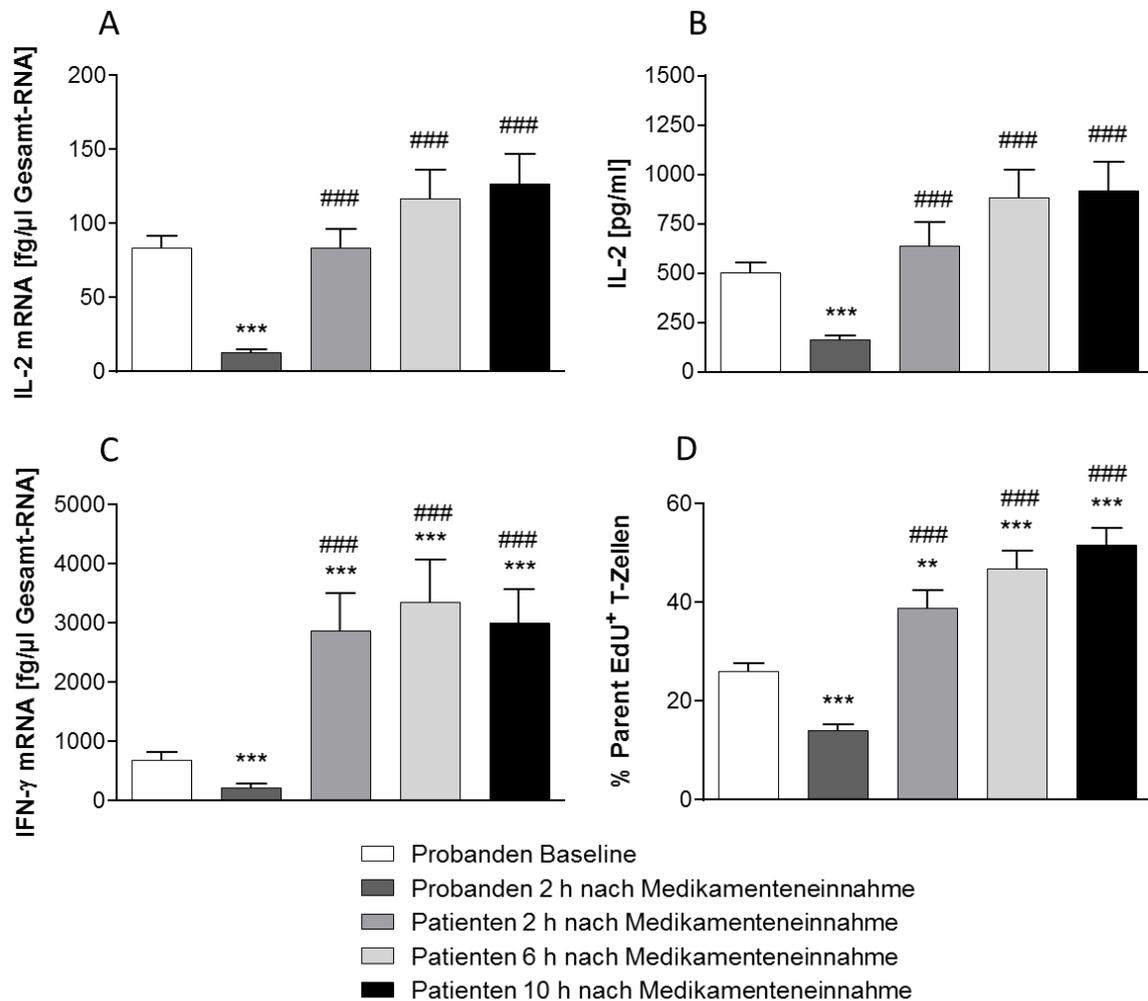


**Abbildung 9: CsA- und Tac-Spiegel.** An Studientag 1 und 8 wurde zu je drei Messzeitpunkten (zwei, sechs, und zehn Stunden nach der Einnahme) der Medikamentenspiegel von CsA (n=8) und Tac (n=22) im Blut gemessen. Weder bei CsA (A) noch bei Tac (B) zeigte sich eine signifikante Interaktion. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zur Auswertung wurden die Daten ln-transformiert und anschließend eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Post-hoc wurde ein t-Test für abhängige Stichproben und eine Bonferroni-Korrektur gerechnet.

Um prüfen zu können, welchen Effekt die chronische Einnahme von CsA auf das Immunsystem hat und wie sich dieser Effekt von dem einer akuten Einnahme unterscheidet, wurden die immunologischen Parameter der Patienten zwei, sechs und zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme mit den Werten gesunder, männlicher Probanden (n=29) vor und zwei Stunden nach der Einnahme von CsA verglichen.

Bei den gesunden Probanden führte die Einnahme von CsA nach zwei Stunden zu einer signifikanten Abnahme der IL-2- (Abbildung 10 A) und IFN- $\gamma$ -mRNA-Produktion (Abbildung 10 C) sowie der IL-2-Ausschüttung (Abbildung 10 B) und der T-Zellproliferation (Abbildung 10 D) (IL-2-mRNA:  $t(28)=18.31$ ,  $***p<0.001$  IFN- $\gamma$ -mRNA:  $t(28)=13.31$ ,  $***p<0.001$  IL-2 Protein:  $t(28)=8.74$ ,  $***p<0.001$  T-Zellproliferation:  $t(21)=11.05$ ,  $***p<0.001$ ). Beim Vergleich der Werte dieser immunologischen Parameter zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahmen mit den Werten von Patienten zum gleichen Zeitpunkt fiel auf, dass sowohl die IL-2-Ausschüttung als auch die IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA-Produktion und T-Zellproliferation bei chronisch Immunsupprimierten wesentlich stärker war (IL-2-mRNA:  $t(28)=-9.75$ ,  $###p<0.001$  IFN- $\gamma$ -mRNA:  $t(27)=-8.84$ ,  $###p<0.001$  IL-2 Protein:  $t(28)=-5.39$ ,  $###p<0.001$  T-Zellproliferation:  $t(21)=-6.53$ ,  $###p<0.001$ ). Da diese vier immunologischen Parameter bei den Patienten über den Tag sogar noch anstiegen (siehe Abbildung 6), waren besonders die IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression und die T-Zellproliferation zehn Stunden nach der Einnahme bei den Patienten ca. dreifach bzw. doppelt so hoch wie bei gesunden

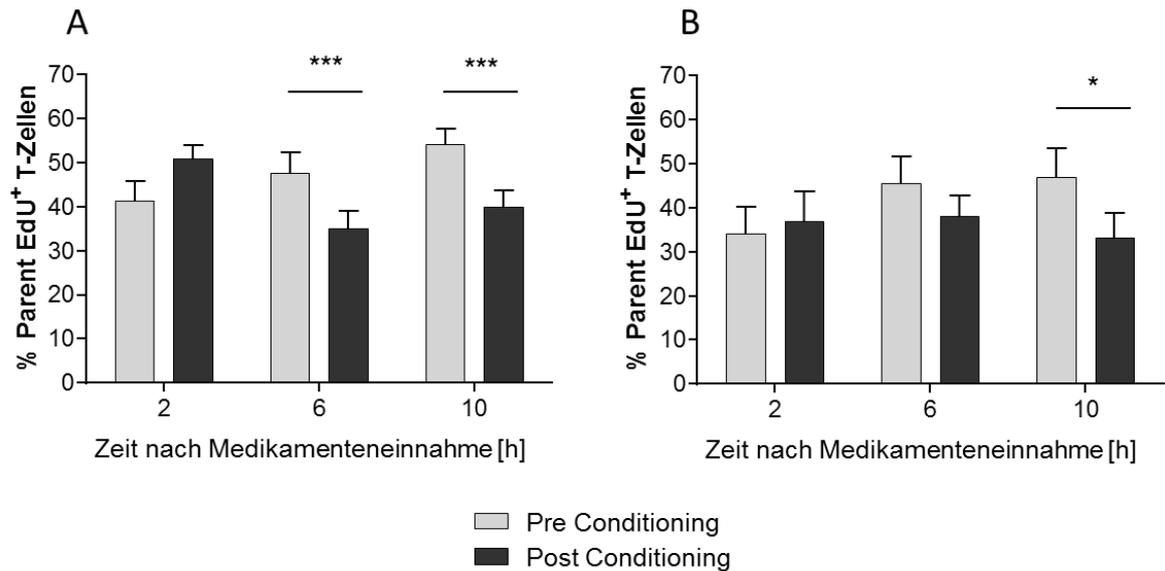
Probanden zur Baselinemessung (IFN- $\gamma$ -mRNA:  $t(27)=-6.46$ ,  $***p<0.001$ , T-Zellproliferation:  $t(21)=-6.28$ ,  $***p<0.001$ ) (Abbildung 10 C und D).



**Abbildung 10: Immunologische Parameter bei chronischer und akuter Behandlung mit CaN-Inhibitoren.** Gesunden, männlichen Probanden wurde vor und zwei Stunden nach der CsA-Einnahme Blut abgenommen. Nierentransplantierten Patienten wurde zwei, sechs und zehn Stunden nach der Einnahme von CsA oder Tac Blut abgenommen. PBMCs wurden isoliert und mit anti-humanen CD3 Antikörpern stimuliert. Anschließend wurden die IL-2- (A) und IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression (C), die IL-2-Ausschüttung (B) und die T-Zellproliferation (D) bestimmt. Die Einnahme von CsA führte bei den Probanden nach zwei Stunden zu einer signifikanten Abnahme der untersuchten immunologischen Parameter ( $***p<0.001$ ). Bei den chronisch immunsupprimierten Patienten hingegen waren sowohl die IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression, als auch die IL-2-Ausschüttung und die T-Zellproliferation zwei Stunden nach der Einnahme wesentlich größer ( $###p<0.001$ ) und lag mindestens auf dem Baseline-Niveau der gesunden Probanden. Bei allen immunologischen Parametern kam es bei den Patienten zu einem zirkadianen Anstieg, was dazu führte, dass zehn Stunden nach der Einnahme von CsA und Tac die IL-2-Ausschüttung und die T-Zellproliferation ca. doppelt so stark waren wie die Baselinewerte der Probanden ( $***p<0.001$ ). Die IFN- $\gamma$ -mRNA-Produktion war sogar ca. dreimal so stark ( $***p<0.001$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zur Auswertung wurden die Daten gegebenenfalls logarithmiert (A, B, C) und anschließend multiple t-Tests für abhängige Stichproben mit einer Bonferroni-Korrektur gerechnet. Dabei bezieht sich \* auf die Unterschiede der Probanden-Baseline zu den anderen Gruppen und # auf den Unterschied von Probanden zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme zu den Patientendaten. Abgebildet wurden die unkorrigierten p-Werte. Die Bonferroni-korrigierten p-Werte sind dem Text zu entnehmen.

Des Weiteren wurden die soziodemographischen Daten der Patienten- und der Probandenkohorte miteinander verglichen (Tabelle 1 und Tabelle 3). Dabei zeigte sich bei einem t-Test für ungepaarte Stichproben ein signifikanter Unterschied im BMI (Patienten:  $M=27,11 \pm 4,69$  Probanden:  $M=24,75 \pm 2,91$ ,  $t(57)=2,32$ ,  $p<0.05$ ) und im Alter (Patienten:  $M=55,53 \pm 11,72$  Probanden:  $M=26,10 \pm 4,23$ ,  $t(58)=12,94$ ,  $p<0.001$ ).

Eine der vielen Nebenwirkungen einer Behandlung mit CaN-Inhibitoren ist Bluthochdruck. Folglich wurden 20 der teilnehmenden Patienten mit  $\beta$ -Blockern behandelt. Daher wurde geprüft, ob die Behandlung mit  $\beta$ -Blockern einen Einfluss auf die Konditionierung hat. Trotz der Behandlung mit dieser Form von Blutdruckregulatoren war bei der Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein deutlicher Konditionierungseffekt zu erkennen, der sich in einer signifikanten Interaktion widerspiegelte ( $n=19$ ,  $F(2, 36)=9.49$ ,  $p<0.001$ ). Die Post-hoc-Tests ergaben sechs Stunden ( $t(18)=3.9$ ,  $***p=0.001$ ) und zehn Stunden ( $t(18)=4.29$ ,  $***p<0.001$ ) nach der Medikamenteneinnahme eine signifikant geringere Proliferation an Tag 8 als an Tag 1 (Abbildung 11 A). Bei Patienten, die nicht mit  $\beta$ -Blockern behandelt wurden, fiel der Konditionierungserfolg auf Grund der geringen Gruppengröße geringer aus ( $n=10$ ,  $F(2, 18)=7.26$ ,  $p=0.005$ ). Hier zeigte sich eine signifikant geringere Proliferation in den Post-hoc Tests nur zehn Stunden nach der Einnahme der CaN-Inhibitoren ( $t(9)=2.91$ ,  $*p=0,017$ ) (Abbildung 11 B).

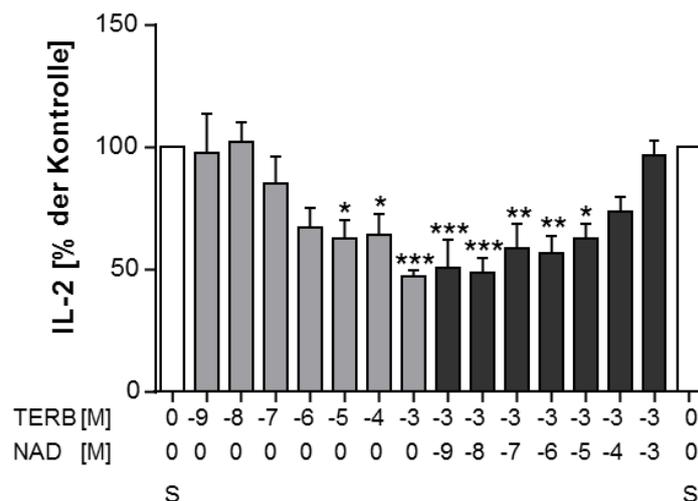


**Abbildung 11: Einfluss der Behandlung mit  $\beta$ -Blockern auf die Konditionierung immunsuppressiver Effekte.** An den Studientagen 1 und 8 wurden den Teilnehmern zu drei Zeitpunkten (zwei, sechs und zehn Stunden nach Medikamenteneinnahme) Blut abgenommen. Aus dem Vollblut wurden die PBMCs isoliert und anschließend mit anti-humanen CD3 Antikörpern stimuliert und die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Abhängig davon, ob die Teilnehmer mit  $\beta$ -Blockern behandelt wurden, wurden sie in zwei Gruppen unterteilt. **(A)** Eine Behandlung mit  $\beta$ -Blockern (n=20) hatte keinen Einfluss auf den Erfolg der Konditionierung. Sowohl sechs als auch zehn Stunden nach der Einnahme an Tag 8 wurde eine signifikant geringere Proliferationsrate als an Tag 1 beobachtet (\*\*p $\leq$ 0.001). **(B)** Bei den unbehandelten Patienten (n=10) zeigte sich ebenfalls eine konditionierte Suppression der T-Zellproliferation. 10 Stunden nach der Medikamenteneinnahme an Tag 8 kam es zu einer signifikant geringeren Proliferation als zum gleichen Messzeitpunkt an Tag 1 (\*p<0.05). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Zur Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Post-hoc wurde ein t-Test für abhängige Stichproben und eine Bonferroni-Korrektur gerechnet. Abgebildet wurden die unkorrigierten p-Werte. Die Bonferroni-korrigierten p-Werte sind dem Text zu entnehmen.

### 3.2. $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Immunsuppression in humanen $CD4^+$ T-Zellen

#### 3.2.1. Stimulation des $\beta_2$ -Adrenozeptors auf $CD4^+$ T-Zellen

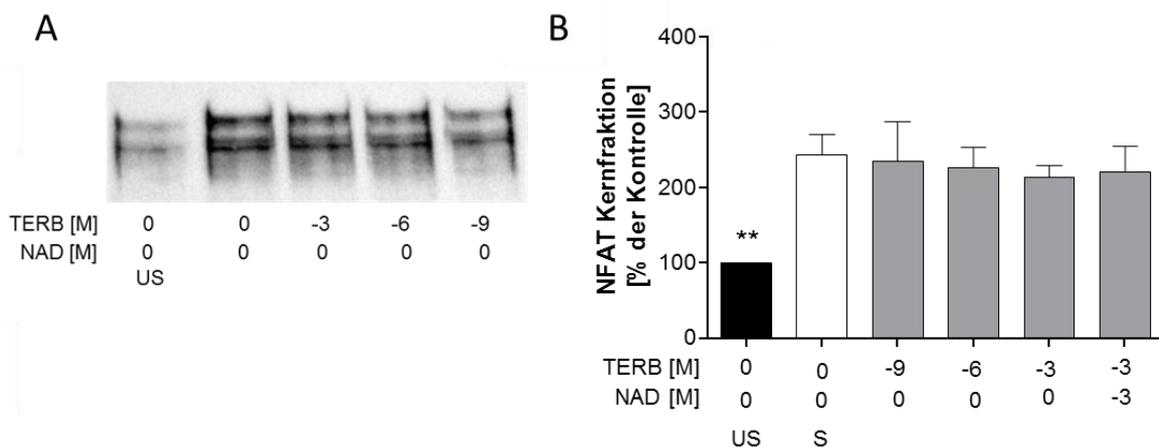
250.000  $CD4^+$  T-Zellen wurden mit anti-humanen CD3 und anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) in der An- und Abwesenheit der in Abbildung 12 indizierten Konzentrationen des  $\beta_2\text{AR}$ -Agonist TERB und des  $\beta\text{AR}$ -Antagonist NAD für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand mit einem ELISA gemessen. Wie in Abbildung 12 gezeigt, führte TERB zu einer dosisabhängigen Abnahme der IL-2-Produktion. In der höchsten Konzentration von  $10^{-3}$  M reduzierte TERB die IL-2-Produktion um etwa 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (S,  $p < 0.001$ ). Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von  $10^{-3}$  M NAD komplett aufgehoben werden. Auch die Wirkung von NAD war dosisabhängig. Bei einer gleichbleibenden TERB-Konzentration von  $10^{-3}$  M, führten die steigenden NAD-Konzentrationen zu einer wieder ansteigenden IL-2-Produktion (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Effekte der Aktivierung des  $\beta_2\text{AR}$  auf die IL-2-Produktion.** 250.000  $CD4^+$  T-Zellen wurden in der An- und Abwesenheit der indizierten Konzentrationen von TERB und/oder NAD mit anti-human CD3 (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) und anti-humanen CD28 Antikörpern (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Die IL-2-Produktion wurde nach 24 Stunden in den Zellkulturüberständen durch einen ELISA bestimmt. Steigende TERB-Konzentrationen führten zu einer dosisabhängigen Abnahme der IL-2-Produktion. Steigende Konzentrationen von NAD waren in der Lage den Effekt von TERB aufzuheben. Aufgrund der hohen interindividuellen Unterschiede in der IL-2-Produktion sind die Werte als Prozente der Kontrolle angegeben. Dabei dienten als Kontrolle die in der Abwesenheit von TERB und NAD stimulierten  $CD4^+$  T-Zellen (S). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=6$ . Eine einfache ANOVA, gefolgt von einem Dunnetts t-Test wurden gerechnet, dabei sind \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  im Vergleich zu den in Abwesenheit von TERB und NAD stimulierten T-Zellen (S).

### 3.2.2. Inhibition der IL-2-Produktion wird nicht durch CaN vermittelt

5.000.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für eine Stunde mit ImmunoCult™ CD3/CD28 T Cell Activator (25 µl pro 10<sup>6</sup> Zellen) in der An- oder Abwesenheit der in Abbildung 13 indizierten TERB- und NAD-Konzentrationen für eine Stunde stimuliert. Nach der nuklearen Extraktion wurde die relative NFAT-Menge im Nukleus als indirekte Messung der CaN-Aktivität via Western Blot bestimmt. Die antikörpervermittelte Stimulation der T-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der NFAT-Menge im Nukleus (S, \*\*p<0.01). Allerdings verursachte selbst die höchste TERB-Konzentration von 10<sup>-3</sup> M keine Abnahme der NFAT-Menge. Gleiches galt für die TERB-Konzentrationen von 10<sup>-6</sup> und 10<sup>-9</sup> M. Entsprechend hatte auch die gleichzeitige Behandlung mit NAD keinen Einfluss auf die NFAT-Konzentration im Kern nach der Stimulation der T-Zellen (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Kerntranslokation von NFAT in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation des  $\beta_2$ AR.** 5.000.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels 25 µl Immunocult™ pro 10<sup>6</sup> Zellen in den An- oder Abwesenheit der angegebenen TERB- und NAD-Konzentrationen für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde eine Nucleusextraktion durchgeführt. Mittels Western Blot wurde dann die Menge an NFAT in den Kernfraktionen gemessen. **(A) Western Blot der Kernfraktionen.** Die NFAT-Konzentration im Nukleus stieg durch die Stimulation der T-Zellen mittels Immunocult™ an. Eine gleichzeitige Behandlung der T-Zellen mit TERB in den drei indizierten Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Menge von NFAT im Kern. **(B) Relative NFAT-Menge im Nukleus.** Die NFAT-Menge im Nukleus wurde über die Pixelintensität errechnet und zeigte, wie schon der Western Blot, einen signifikanten Anstieg der NFAT-Kernkonzentration durch die Stimulation der Zellen mit Immunocult™ (S). Die gleichzeitige Behandlung mit unterschiedlichen TERB- und NAD-Konzentrationen wirkte diesem Anstieg nicht entgegen. Die Daten sind dargestellt als Prozente der Kontrolle und Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=5. Als Kontrolle dienten die unstimulierten und unbehandelten Zellen (US). Eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnetts t-Test wurden gerechnet, dabei ist \*\*p<0.01 im Vergleich zu den stimulierten aber unbehandelten Zellen (S)

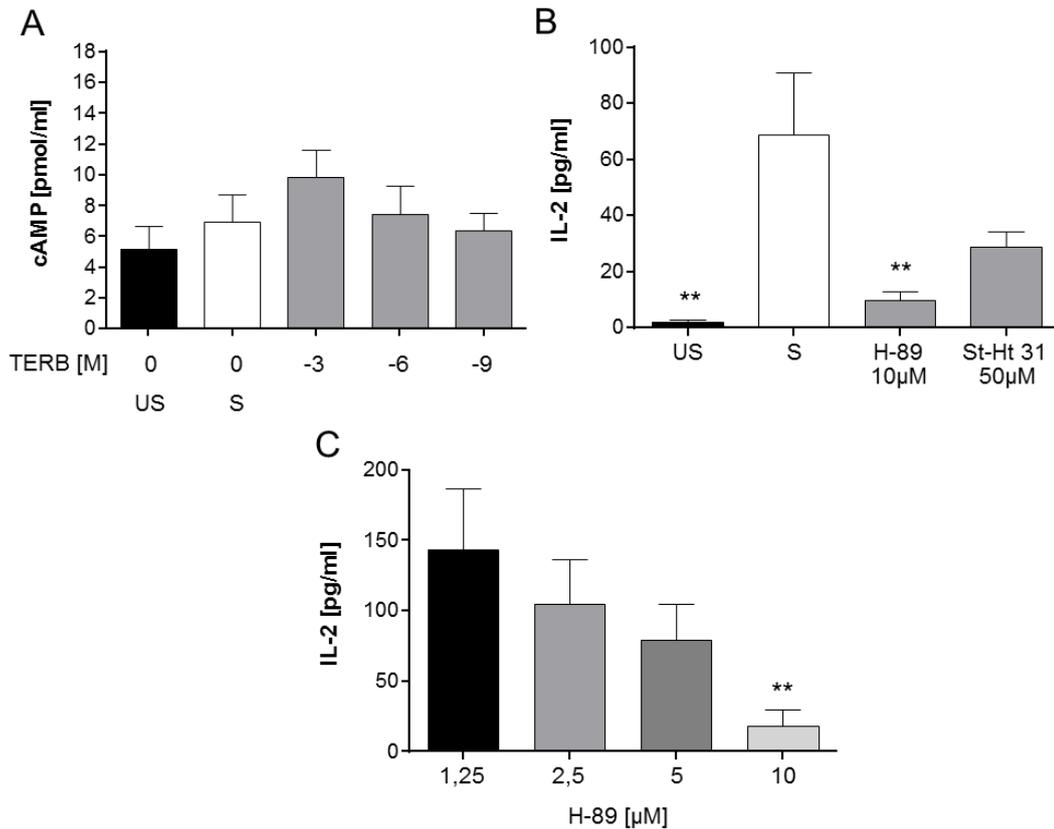
### 3.2.3. TERB-abhängiger Anstieg der cAMP-Konzentration

Da eine Stimulation des  $\beta_2$ AR mittels TERB zwar zu einer Inhibition der IL-2-Produktion führte, diese aber anscheinend nicht durch CaN vermittelt wird (siehe Abbildung 13), wurde die cAMP-Konzentration in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach einer Behandlung mit den in Abbildung 14 A indizierten TERB-Konzentrationen gemessen. 5.000.000 T-Zellen wurden mit TERB und anti-humanen CD3-/anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5 µg/ml) für 30 min stimuliert,

anschließend lysiert und die cAMP-Konzentration mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die antikörpervermittelte Stimulation der T-Zellen in Abwesenheit von TERB (S) führte zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dieser war aber nicht signifikant. Eine zusätzliche Behandlung mit TERB in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M verstärkte diesen Anstieg. Allerdings war auch diese Differenz nicht signifikant. Die geringeren TERB-Konzentrationen von  $10^{-6}$  und  $10^{-9}$  M hatten keinen Einfluss auf die cAMP-Konzentration der stimulierten T-Zellen. Allgemein fiel der beobachtete cAMP-Anstieg nach der Stimulation des  $\beta_2$ AR sehr gering aus (Abbildung 14 A).

### **3.2.4. Inhibition der IL-2-Produktion ist nicht PKA-abhängig**

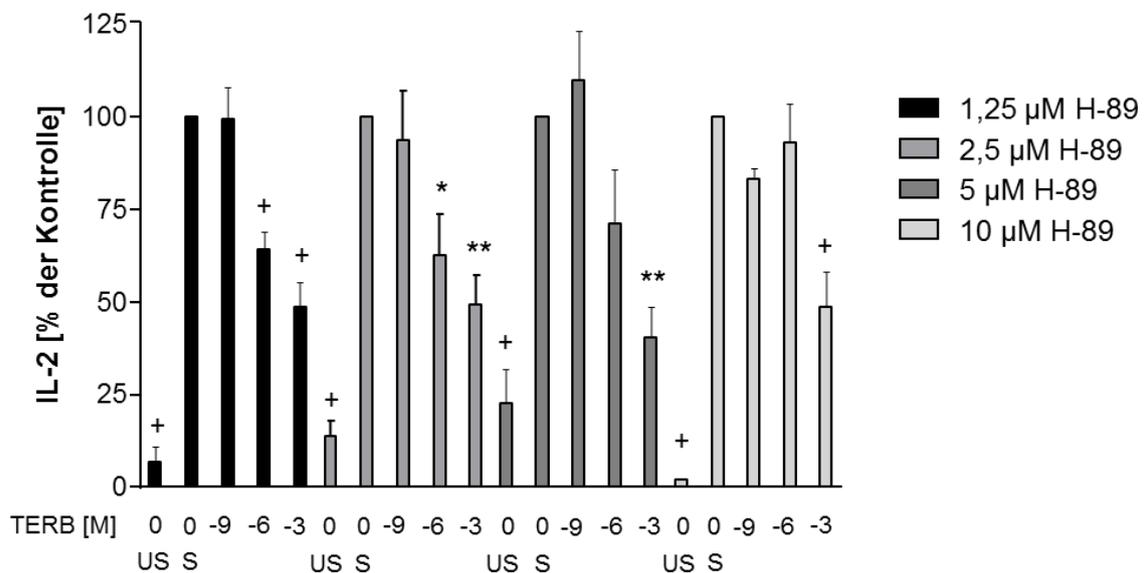
Um zu prüfen, ob die  $\beta_2$ AR-vermittelte Inhibition der IL-2-Produktion PKA-abhängig ist, wurden in einem ersten Schritt 250.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit anti-humanen CD3 und anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5  $\mu$ g/ml) in der Anwesenheit des PKA-Inhibitors H-89 oder in der Anwesenheit von St-Ht 31 als Inhibitor der AKAP-PKA-Wechselwirkung in den in Abbildung 14 B angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Die antikörpervermittelte Stimulation der T-Zellen (S) führte zu einem klaren Anstieg der IL-2-Konzentration (\*\* $p < 0.01$ ). Eine gleichzeitige Behandlung mit H-89 senkte die IL-2-Produktion der T-Zellen signifikant (\*\* $p < 0.01$ ). Die Behandlung mit St-Ht-31 führt zu einer deskriptiven aber nicht signifikanten Abnahme des IL-2-Spiegels (siehe Abbildung 14 B). Durch die in Abbildung 14 B gezeigten Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die geringe IL-2-Produktion durch eine zu hohe und damit eventuell toxische H-89-Konzentration bedingt wurde. Daher wurden in einem folgenden Experiment 250.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit den in der Abbildung 14 C angegebenen unterschiedlichen Konzentrationen H-89 behandelt und mit anti-humanen CD3 und anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Ein dosisabhängiger Effekt war zu beobachten. Je höher die H-89-Konzentration desto stärker wurde die IL-2-Produktion inhibiert. Dabei nahm die IL-2-Konzentration bei einer H-89-Behandlung von 10  $\mu$ M im Vergleich zu 1,25  $\mu$ M H-89 signifikant ab (\*\* $p < 0.01$ ) (Abbildung 14 C).



**Abbildung 14: Rolle von cAMP und PKA in der  $\beta_2$ AR-vermittelten IL-2-Inhibition. (A) Intrazelluläre cAMP-Konzentration  $CD4^+$  T-Zellen nach Stimulation des  $\beta_2$ AR.** 5.000.000 T-Zellen wurden in der An- oder Abwesenheit von den indizierten TERB-Konzentrationen mittels anti-humanen CD3/anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5  $\mu$ g/ml) für 30 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde die cAMP-Konzentration mit einem ELISA gemessen. Alleine durch die antikörpervermittelte Stimulation der Zellen in der Abwesenheit von TERB (S) kam es im Vergleich zu unstimulierten und unbehandelten Zellen (US) zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration. Ein weiterer Anstieg war durch die zusätzliche Behandlung mit TERB ( $10^{-3}$  M) zu vermerken. Allerdings waren beide Anstiege nicht signifikant. Die geringeren TERB-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die cAMP-Konzentration der stimulierten T-Zellen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von sechs Experimenten. Eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnetts t-Test wurde gerechnet im Vergleich zu US. **(B) IL-2-Produktion  $CD4^+$  T-Zellen bei Behandlung mit H-89 und St-Ht 31.** 250.000  $CD4^+$  T-Zellen wurden mit anti-humanen CD3/anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5  $\mu$ g/ml) in Anwesenheit der indizierten Konzentrationen H-89 und St-Ht 31 für 24 Stunden stimuliert und anschließend die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Durch die antikörpervermittelte Stimulation der Zellen (S) kam es zu einem deutlichen Anstieg der IL-2-Produktion. Eine gleichzeitige Behandlung mit H-89 senkte die IL-2-Konzentration ebenfalls deutlich (\*\* $p < 0.01$ ). Einen ähnlichen, wenn auch weniger starken Effekt, hatte St-Ht 31 auf die IL-2-Produktion. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Zur Auswertung wurde eine einfache ANOVA mit einem anschließenden Dunnetts t-Test mit \*\* $p < 0.01$  im Vergleich zu S gerechnet **(C) Dosisabhängige Abnahme der IL-2-Konzentration bei Inhibition der PKA durch H-89 in  $CD4^+$  T-Zellen.** 250.000  $CD4^+$  T-Zellen wurden für 24 Stunden in der Anwesenheit den angegebenen H-89-Konzentrationen mittels anti-humanen CD3/anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5  $\mu$ g/ml) stimuliert und anschließend die IL-2-Produktion im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Die Inhibition der PKA durch H-89 führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der IL-2-Produktion. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Zur Auswertung wurde eine einfache ANOVA mit einem anschließenden Dunnetts t-Test mit \*\* $p < 0.01$  im Vergleich zu den stimulierten und mit 1,25  $\mu$ M H-89 behandelten Zellen gerechnet.

Durch die bisherigen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der PKA alleine bereits zu einer Reduktion der IL-2-Produktion führt (Abbildung 14 B und C), und dass dieser Effekt dosisabhängig ist (Abbildung 14 C). Um klären zu können, ob die durch TERB herbeigeführte Inhibition der IL-2-Produktion PKA-abhängig ist, wurden 250.000  $CD4^+$  T-

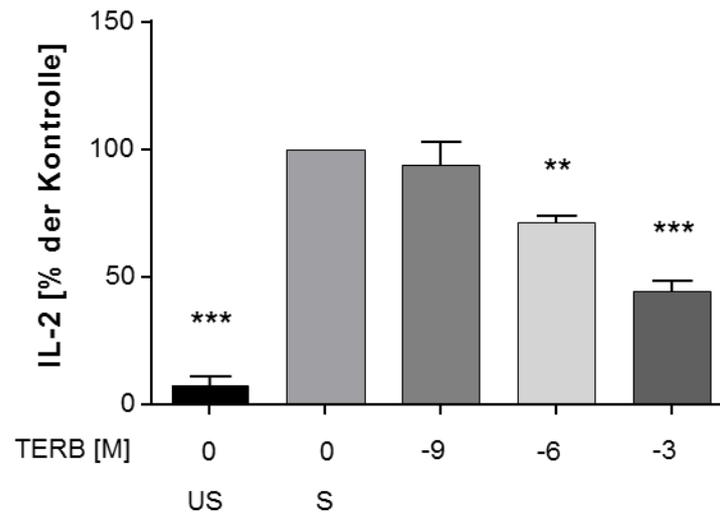
Zellen in der Anwesenheit von unterschiedlichen in Abbildung 15 indizierten H-89- und TERB-Konzentrationen mit anti-humanen CD3 und anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5µg/ml) stimuliert. Auch hier wurde die IL-2-Konzentration nach 24 Stunden Inkubation im Zellkulturüberstand gemessen. Unabhängig von der H-89-Konzentration und damit auch unabhängig von der durch die PKA-Inhibition herbeigeführten, bereits verminderten IL-2-Produktion, kam es dennoch zu einer durch TERB-bedingten dosisabhängigen Abnahme der IL-2-Ausschüttung. Bei den H-89-Konzentrationen von 1,25 µM und 2,5 µM führen die TERB-Konzentrationen von  $10^{-6}$  M und  $10^{-3}$  M zu einem signifikanten Abfall der IL-2-Produktion (\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  und \* $p < 0.05$ ). Auch bei den höheren H-89-Konzentrationen von 5 µM und 10 µM führt die TERB-Konzentration von  $10^{-3}$  M zu einer signifikant geringeren IL-2-Produktion (\* $p < 0.001$  und \*\* $p < 0.01$ ) (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: TERB-induzierte Inhibition der IL-2-Produktion bei gleichzeitiger PKA-Inhibition in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** 250.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 24 Stunden in der Anwesenheit der angegebenen TERB- und H-89-Konzentrationen mittels anti-humanen CD3/anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5µg/ml) stimuliert. Unabhängig von der H-89-Konzentration führte TERB zu einer dosisabhängigen Abnahme der IL-2-Produktion. Bei den H-89-Konzentrationen von 1,25 µM und 2,5 µM zeigten die TERB-Konzentrationen von  $10^{-6}$  und  $10^{-3}$  M eine deutliche Reduktion der IL-2-Konzentration (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.001$ ). Bei den höheren H-89-Konzentrationen war noch ein deutlicher Effekt bei einer TERB-Konzentration von  $10^{-3}$  M zu erkennen (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.001$ ). Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede sind die Daten als Prozente der Kontrolle dargestellt. Dabei dienen als Kontrollen jeweils die IL-2-Konzentrationen der lediglich mit den Antikörpern und H-89 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (S). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Zur Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnetts t-Test gerechnet. Dabei sind \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  und \* $p < 0.001$  verglichen S.

Um die PKA-Unabhängigkeit des Signalweges zusätzlich bestätigen zu können, wurden 250.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem spezifischeren PKA-Inhibitor, dem Inhibitor Fragment 14-22, behandelt. Dafür wurden die T-Zellen für 24 Stunden mit 50 µM des Inhibitorfragments in der An- und Abwesenheit der in Abbildung 16 angegebenen Konzentrationen TERB mit jeweils 5 µg/ml anti-humanen CD3 und anti-humanen CD28 Antikörpern stimuliert.

Anschließend wurde die IL-2-Konzentration im Zellkulturüberstand mit einem ELISA gemessen. Durch die Stimulation der Zellen mittels anti-humanen CD3 und anti-humanen CD28 Antikörpern kam es zunächst trotz der PKA-Inhibition zu einem klaren Anstieg der IL-2-Produktion ( $***p < 0.001$ ). Auch mit dem spezifischeren Inhibitor zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der IL-2-Konzentration durch TERB. Die TERB-Konzentrationen von  $10^{-6}$  M ( $**p < 0.01$ ) und  $10^{-3}$  M ( $***p < 0.001$ ) führten zur einer signifikanten Reduktion des Zytokins im Überstand (Abbildung 16).



**Abbildung 16: TERB-induzierte Reduktion der IL-2-Produktion bei spezifischer PKA-Inhibition durch das Inhibitorfragment 14-22 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** 250.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 24 Stunden in der Anwesenheit der angegebenen TERB-Konzentrationen und 50  $\mu$ M des Inhibitorfragments 14-22 mittels anti-humanen CD3/anti-humanen CD28 Antikörpern (jeweils 5 $\mu$ g/ml) stimuliert. Auch die spezifische Inhibition der PKA konnte die TERB-vermittelte Reduktion der IL-2-Produktion nicht verhindern. Die TERB-Konzentrationen von  $10^{-6}$  M ( $**p < 0.01$ ) und  $10^{-3}$  M ( $***p < 0.001$ ) führten jeweils zu einer signifikanten IL-2-Abnahme. Wegen der großen interindividuellen Unterschiede sind die Daten als Prozente der Kontrolle dargestellt. Dabei dienten als Kontrollen jeweils die IL-2-Konzentrationen der lediglich mit den Antikörpern und dem Inhibitorfragment stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (S). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Zur Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnetts t-Test gerechnet. Dabei sind  $**p < 0.01$  und  $***p < 0.001$  verglichen S.

## 4. Diskussion

### 4.1. Klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte bei nierentransplantierten Patienten

Die klassische Konditionierung von Immunfunktionen ist ein beeindruckendes Beispiel für die Kommunikation zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem. Aufbauend auf unterschiedlichen Tierexperimenten (Schedlowski and Pacheco-López 2010) wurden Studien durchgeführt, die zeigen konnten, dass eine Konditionierung des Immunsystems auch im Menschen möglich ist (Pavlov and Tracey 2017). Am bekanntesten ist hierbei die klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte durch die Paarung eines grünen Getränks (CS) mit dem immunsuppressiv wirkenden Medikament CsA (Goebel et al. 2002, Wirth et al. 2011, Albring et al. 2012). Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass die gelernte Immunsuppression wiederholt abrufbar ist (Wirth et al. 2011), eine mehrmalige Paarung von CS und US notwendig ist (Albring et al. 2012) und eine reine Erwartungshaltung nicht genügt, um die Konditionierung immunsuppressiver Effekte zu induzieren (Albring et al. 2012). Prädiktoren für eine erfolgreiche Konditionierung sind dabei die Zustandsangst und der NA-Spiegel im Plasma der Teilnehmer (Ober et al. 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die konditionierte Immunsuppression mit Hilfe von subtherapeutischen CsA-Dosen über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann (Albring et al. 2014). Nachdem die potentielle therapeutische Relevanz der Konditionierung immunsuppressiver Effekte im Tiermodell bereits eindrucksvoll nachgewiesen wurde, galt es nun zu analysieren, ob die Einbettung eines Konditionierungsparadigmas in eine bereits bestehende immunsuppressive Therapie bei Menschen möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies nun erstmalig mit nierentransplantierten Patienten, die mit CaN-Inhibitoren behandelt wurden, durchgeführt. Dafür wurden die Teilnehmer gebeten ihre Medikamente zusammen mit einem neuartig schmeckenden Getränk zu kombinieren. Zusätzliche Placeboeinnahmen, die ebenfalls mit dem grünen Getränk gepaart wurden und vier Stunden bzw. acht Stunden nach der Medikamenteneinnahme in das pharmakologische Regime eingebracht wurden, sollten den zirkadianen Anstieg verschiedener Immunparameter verhindern. Sowohl vor als auch nach der Konditionierung wurde den Patienten zu drei Zeitpunkten Blut abgenommen und die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Expression auf Protein- und mRNA-Ebene sowie die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Weder vor, während noch nach der Studie wurde die Medikation der Teilnehmer verändert.

Durch die Konditionierung war es möglich dem tagesrhythmischen Anstieg der Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich entgegen zu wirken. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da eine Form der akuten Abstoßungsreaktion durch die Proliferation und Ansammlung von T-Zellen im Interstitium der Niere verursacht wird (Cornell et al. 2008). Eine konditionierte Inhibition der T-Zellproliferation könnte das Risiko einer solchen Abstoßungsreaktion senken. Um ausschließen zu können, dass die reduzierte Proliferationsrate auf andere Faktoren beruht, wurden weitere Parameter kontrolliert, die ebenfalls die Teilungsrate von T-Zellen modifizieren können. Dazu gehören die Katecholamin- und Cortisol-Ausschüttung, sowie die Anzahl an T-Zellen (Wrona 2006). Auch der Medikamentenspiegel wurde kontrolliert. Da sich weder der Katecholamin- und Cortisolspiegel noch die Anzahl der zirkulierenden T-Zellen oder die Medikamentenspiegel bei den Teilnehmern vor und nach der Konditionierung voneinander unterschieden, konnte der Erfolg der Konditionierung bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich bei IFN- $\gamma$  zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme in der Evokation eine deutlich geringere mRNA-Expression als vor der Konditionierung. Dieser Unterschied war Post-hoc statistisch zwar leider nicht signifikant, deutet aber auf Grund einer signifikanten Interaktion zwischen der Konditionierungsphase und der Zeit nach der Medikamenteneinnahme auf einen Trend hin.

Neben der Proliferation und der IFN- $\gamma$ -Expression wurden weitere immunologische Parameter untersucht. Da CaN-Inhibitoren in erster Line die IL-2-Ausschüttung inhibieren (Liu et al. 1991), wurde die Produktion dieses Zytokins sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gemessen. Weder die mRNA-Expression von IL-2, noch die Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand wurden durch die Konditionierung beeinflusst. Leider stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den bisherigen Studien zur Konditionierung immunsuppressiver Effekte im Menschen und im Tiermodell, die immer einen deutlichen Konditionierungseffekt auf die IL-2-Produktion beobachten konnten (Goebel et al. 2002, Wirth et al. 2011, Ober et al. 2012, Albring et al. 2014, Hadamitzky et al. 2016, Lueckemann et al. 2016). Ein wichtiger Unterschied zu den bisherigen Studien ist allerdings, dass die Patienten den US bereits vor der Konditionierung einnahmen. Untersuchungen, die analysieren, welchen Einfluss die Präsentation des US vor der Konditionierung auf diese hat, wurden mit Menschen bisweilen noch nicht durchgeführt. In Tierstudien hingegen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die Darbietung des US als auch des CS vor der Konditionierung keinen Einfluss auf den Erfolg dieser haben (Lueckemann et al. 2016). Zu beachten ist allerdings, dass in der genannten Studie nur eine dreimalige US-Präexposition vorgenommen wurde. Dies ist nicht vergleichbar mit einer chronischen Behandlung mit Immunsuppressiva. Eine weitere mögliche Erklärung des fehlenden Effekts auf die Zytokinproduktion liegt in der redundanten Absicherung

essentieller Signalwege. Das heißt, fällt ein Signalweg auf Dauer aus, springen andere Signalwege ein und kompensieren den Ausfall. Neben dem CaN-NFAT-Weg sind noch weitere Signalwege bekannt, die ebenso nach der Aktivierung des TCRs zur Produktion von IL-2 führen. Zum Beispiel werden über die PKC die Transkriptionsfaktoren NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und CREB aktiviert, die ebenfalls den IL-2-Promotor binden. Gleiches gilt für AP-1, dass über die PKA oder den Ras/Raf/MAPK-Weg angeschaltet werden kann (Moulton and Tsokos 2011). Eine Kompensation der chronischen CaN-Inhibition könnte dazu führen, dass CsA und Tac nicht mehr so effizient die IL-2-Produktion inhibieren können, wie es bei gesunden Probanden (Goebel et al. 2002, Wirth et al. 2011, Albring et al. 2014) oder Ratten nach dreimaliger US-Präexposition (Lueckemann et al. 2016) der Fall ist, und dass dieser geringere Effekt von CsA bzw. Tac dann nicht mehr konditionierbar ist. Eine mögliche Desensibilisierung des Signalweges hätte einen ähnlichen Effekt. Eine Studie konnte zeigen, dass es nach einer Nierentransplantation über die Zeit zu einer Verschiebung des Zytokinexpressionsmusters von den TH2- zu den TH1-Zytokinen kommt, und dass die Expression dieser Zytokine über die Zeit signifikant ansteigt (Daniel et al. 2005). Ferner ist noch nicht bekannt, welche Rolle der Kontext für eine erfolgreiche Konditionierung spielt. Während die Akquisition und der erste Tag der Evokation zu Hause stattfanden, mussten die Patienten für den zweiten Evokationstag das Institut aufsuchen. Sollte der Kontext ebenfalls ein wichtiger CS sein, fehlt bei der Evokation an Tag 8 dieser zusätzliche CS. Daraus könnte eine Abschwächung des Reizes resultieren, die zur Folge haben könnte, dass die gelernte Immunsuppression nur unvollständig abgerufen werden kann (Bouton 2002).

Des Weiteren stellt sich die Frage, warum eine Konditionierung der T-Zellproliferation unabhängig von einer Konditionierung der IL-2-Produktion stattfinden kann. Nach der Ausschüttung von IL-2 bindet das Zytokin wieder an den eigenen Rezeptor und stellt ein essentielles Signal für die T-Zellaktivierung und -proliferation dar (Rodriguez et al. 2013). Folglich sollte einer reduzierten Teilungsrates der T-Zellen eine reduzierte IL-2-Ausschüttung voraus gehen. Wird die Proliferation also trotz eines unveränderten IL-2-Spiegels durch die Konditionierung reduziert, besteht die Möglichkeit, dass der IL-2 R durch den assoziativen Lernprozess oder die chronische Einnahme von CsA beziehungsweise Tac beeinflusst wird. Daniel et al. haben bei nierentransplantierten Patienten im Durchschnitt sieben Jahre nach der Transplantation bei einer stabilen Transplantatfunktion signifikant weniger löslichen IL-2 R im Plasma gefunden als bei Patienten ca. zwei Wochen nach der Transplantation (Daniel et al. 2005). Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, läge in der Untersuchung der Expression oder der STAT 5-Phosphorylierung des IL-2 R (Rodriguez et al. 2013).

Während die Nebenwirkungen einer dauerhaften Einnahme immunsuppressiver Medikamente wohl bekannt sind (de Mattos et al. 2000), weiß man wesentlich weniger darüber welchen Einfluss die chronische Einnahme von CaN-Inhibitoren auf Immunparameter wie die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion hat. Im klinischen Alltag werden während der Therapie mit Tac oder CsA lediglich die Talspiegel der Präparate als Ausleseparameter für eine funktionierende Behandlung bestimmt (Albring et al. 2015). Um zu analysieren, welchen Einfluss eine chronische Einnahme von Tac und CsA auf die T-Zellfunktionen hat, wurden die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion sowie die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nierentransplantierten Patienten zwei, sechs und zehn Stunden nach der Medikamenteneinnahme mit der Zytokinproduktion und T-Zellproliferation gesunder Männern vor und zwei Stunden nach der CsA-Einnahme verglichen. Dabei fiel zunächst auf, dass chronisch Immunsupprimierte eine wesentlich stärkere Zytokinproduktion und T-Zellproliferation aufwiesen. Selbst zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahme, also zu dem Zeitpunkt der stärksten Immunsuppression, waren die IL-2- und der IFN- $\gamma$ -Spiegel der Patienten so hoch, wie die der gesunden Männer vor der Einnahme von CsA. Gleiches galt für die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Über den Tagesverlauf und mit abnehmendem Medikamentenspiegel nahmen die Zytokinproduktion und die T-Zellproliferation der Patienten weiter zu und waren zehn Stunden nach der Einnahme des CaN-Inhibitors zwei- bis dreimal so hoch wie der Baselinewert der gesunden Teilnehmer. Dieser Effekt einer langzeitigen Einnahme von CaN-Inhibitoren wurde bereits für IFN- $\gamma$  beschrieben. Dabei zeigten Nierentransplantierte mehr als 10 Jahre nach der Transplantation ebenfalls dreimal so hohe IFN- $\gamma$ -Spiegel wie die gesunde Kontrollgruppe (Daniel et al. 2005). Für den Anstieg dieser Immunparameter bei den untersuchten immunsupprimierten Patienten gibt es unterschiedliche Erklärungen. Trotz der chronischen Immunsuppression liegt nach einer Transplantation dem Immunsystem eine konstante *Antigen-Challenge* vor. Dies sorgt für eine erhöhte Zytokinproduktion und T-Zellproliferation, da das Abwehrsystem des Körpers dauerhaft aktiviert ist (Cascalho et al. 2013). Leider gibt es zurzeit kaum Studien dazu wie stark die Immunaktivierung bei transplantierten Patienten ohne eine akute oder chronische Abstoßungsreaktion ist und welchen Einfluss die chronische Einnahme von CaN-Inhibitoren auf unterschiedliche T-Zellfunktionen hat. Bekannt ist, dass bei Patienten, die eine chronische Abstoßungsreaktion zeigen, die IFN- $\gamma$ -Produktion im Gegensatz zu Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion nicht hochreguliert ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass IFN- $\gamma$  für eine langfristige Akzeptanz des Spenderorgans benötigt wird. (Sadeghi et al. 2007). Die beschriebenen Beobachtungen können aber auch dafür sprechen, dass es durch die chronische CaN-Inhibition zu einem starken kompensatorischen Effekt der Zytokinproduktion und T-Zellproliferation kommt. Dieser Effekt könnte durch eine Desensibilisierung des Signalwegs oder das Einspringen redundanter Signalwege erklärt

werden. In beiden Fällen würde die Zielzelle eine geringere Reaktivität auf das Medikament zeigen und folglich würde die Inhibition der TH1-Zytokinproduktion abnehmen. Dieser Zustand wäre vergleichbar mit dem Absetzen beziehungsweise einer starken Reduktion der Medikation. Es ist bekannt, dass nach einer kurzzeitigen Einnahme von CsA häufig kompensatorisch zunächst mehr IL-2 produziert wird als vor der Einnahme. In diesem Fall spricht man von einem Reboundeffekt. Dieser wurde bereits bei Patienten nach einer Nierentransplantation beobachtet (Creemers et al. 1998). Eine chronische Einnahme von CaN-Inhibitoren könnte also zu einem ebenfalls chronischen Reboundeffekt führen. Neben den anderen Signalwegen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zelle, gibt es auch weitere Immunzelltypen, die in der Lage sind IL-2 zu produzieren und so kompensatorisch wirken können (Boyman and Sprent 2012). Ebenso müssen auch die soziodemographischen Unterschiede der beiden Kohorten in Betracht gezogen werden. Die teilnehmenden nierentransplantierten Patienten waren im Schnitt 30 Jahre älter als die gesunden Probanden. Während IL-2 im Alter abnimmt, kommt es gleichzeitig zu einer Zunahme der IFN- $\gamma$ -Produktion (Bandres et al. 2000). Folglich würde sich die höhere IFN- $\gamma$ -Ausschüttung nicht aber die höhere IL-2-Sezenerierung durch das Alter der Patienten begründen lassen. Allerdings wurde die erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion auch in Studien gezeigt, die eine im Alter angepasste Kontrollgruppe aufwiesen (Daniel et al. 2005, Sadeghi et al. 2007). Ein weiterer Unterschied zwischen den Kohorten zeigte sich im BMI. Während die gesunden Männer im Durchschnitt einen BMI von 24,75 kg/m<sup>2</sup> aufwiesen, lag der BMI bei den Patienten bei 27,12 kg/m<sup>2</sup>. Ein höherer BMI lässt meist auf einen höheren Körperfettanteil schließen und dieser wird assoziiert mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (Fantuzzi 2005). Zusätzlich erhielten die Probanden mit einer CsA-Dosis von 2,5 mg pro/kg Körpergewicht eine größere Menge CsA als die Patienten. Dadurch kam es nach der einmaligen Einnahme des Medikaments zu einem stärkeren immunsuppressiven Effekt, als er bei den Patienten auftrat. Ferner ist nicht außer Acht zu lassen, dass nur acht der 30 Patienten mit CsA behandelt wurden. Die restlichen 22 Teilnehmer nahmen Tac ein. Obwohl der Wirkmechanismus beider Medikamente sehr ähnlich ist, unterscheiden sie sich eindeutig in ihrer Pharmakokinetik (Liu et al. 1991). Um analysieren zu können, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den Kohorten auf den soziodemografischen Differenzen basieren, müsste eine weitere Gruppe gesunder Probanden betrachtet werden, die in Alter, BMI und Medikamentendosis beziehungsweise -art an die Patientenkohorte angepasst wird. Unabhängig von der Ursache der verstärkten Zytokinproduktion und T-Zellproliferation bei einer chronischen Behandlung mit CaN-Inhibitoren, könnte der Anstieg dieser Immunparameter eine Erklärung dafür bieten, warum eine Konditionierung der IL-2-Produktion nicht möglich war.

Das Alter der teilnehmenden Patienten mit durchschnittlich ca. 56 Jahren und die Tatsache, dass die Behandlung mit CaN-Inhibitoren als Nebenwirkung Bluthochdruck bedingt, führten dazu, dass 20 von 30 Teilnehmern mit  $\beta$ -Blockern behandelt wurden. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Konditionierung immunsuppressiver Effekte durch die von Immunzellen exprimierte  $\beta$ AR vermittelt wird. Bei dem in den Tierexperimenten eingesetzten  $\beta$ -Blocker handelte es sich um Propranolol (Exton et al. 2002). Propranolol wirkt als Antagonist sowohl auf den  $\beta_1$ - als auch auf den  $\beta_2$ AR. Da trotz der Behandlung mit  $\beta_1$ -Blockern eine Konditionierung immunsuppressiver Effekte bei den Patienten möglich war, bieten diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass die Konditionierung immunsuppressiver Effekte im Menschen ebenfalls über  $\beta_2$ AR vermittelt wird.

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass die Einbettung eines Konditionierungsparadigmas in eine bestehende immunsuppressive Behandlung möglich ist, und dass auf diese Weise der zirkadiane Anstieg der Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verhindert werden kann. Damit konnte nicht nur im Tier, sondern auch im Menschen gezeigt werden, dass die Konditionierung immunsuppressiver Effekte als ergänzende Therapie zur Behandlung nach einer Organtransplantation großes Potential haben könnte. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend gilt es nun dieses Potential weiter zu entwickeln, indem man versucht die benötigte Konzentration der CaN-Inhibitoren zu reduzieren und das Paradigma auf weitere Krankheiten und immunsuppressive Medikamente zu übertragen. Ein erfolgreicher Einsatz dieser ergänzenden Therapieform würde eine Reduktion der benötigten Medikation und damit eine Minimierung der Nebenwirkungen bei einem gleichbleibend maximalen therapeutischen Effekt erlauben. So könnte die Lebensqualität vieler Patienten gesteigert werden.

#### 4.2. $\beta_2$ -Adrenozeptor-vermittelte Immunsuppression in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

In der letzten Dekade hat sich mehr und mehr herausgestellt, dass das  $\beta_2$ AR-Signaling in Immunzellen inkonsistent gegenüber der typischen GPCR-Kaskade ist. Entgegen der Annahme scheint der  $\beta_2$ AR eine duale Funktion zu haben und sowohl inhibierend als auch aktivierend auf die Immunzellfunktionen zu wirken. Dies beruht darauf, dass das SNS eine große Rolle bei der Bewahrung der Homöostase des Immunsystems spielt und in der Lage sein muss, die Zellen des Immunsystems in der jeweiligen Situation sowohl herauf als auch herunter regulieren zu können. Die Stimulation des AR hat also nicht nur die klassische cAMP-PKA-Kaskade zur Folge, sondern steuert noch weitere Signalwege. Der GPCR muss folglich eher als ein komplexer, multidimensionaler Aktivator einer ganzen Reihe von Signalwegen betrachtet werden. Besonders unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zu einem Switch vom kanonischen zum nicht-kanonischen Signaling (Lorton and Bellinger 2015).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die  $\beta_2$ AR vermittelte Inhibition der IL-2-Produktion in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht wie bei Riether et al. (2011) beschrieben über die Inhibition von CaN abläuft. Stattdessen deuten die Befunde viel eher auf einen CaN- und PKA-unabhängigen Signalweg hin. Ende der 90er Jahre konnte gezeigt werden, dass ein pharmakologisch induzierter Anstieg des cAMP-Spiegels in humanen PBMCs auch PKA-unabhängig die T-Zellfunktionen hemmen kann. Dabei wurden unterschiedliche PKA-Inhibitoren eingesetzt und die Aktivität der Kinase nachweislich inhibiert, dennoch persistierten die durch den *Second Messenger* vermittelten antiproliferativen Effekte (Bryce et al. 1999). cAMP aktiviert nicht nur die PKA, sondern bindet auch an Guanin Exchange Faktoren (GEF), wie Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) (Torgersen et al. 2002). Eine Überexpression von Epac in Jurkat-Zellen inhibiert die IL-2-Transkription und Zellproliferation (Boussiotis et al. 2000). Ebenfalls spielt Epac in Maussplenozyten eine wichtige Rolle bei der durch regulatorische T-Zellen vermittelten Suppression von T-Effektorzellen, indem es die suppressiven Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen verstärkt und die T-Effektorzellen empfänglicher für eine Suppression macht (Almahariq et al. 2015). Des Weiteren senkt Epac in Jurkat-Zellen das DNA-Bindungsvermögen von c-jun. C-jun ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, der wichtig bei der Expression von IL-2 ist (Fuld et al. 2005) (Abbildung 17).

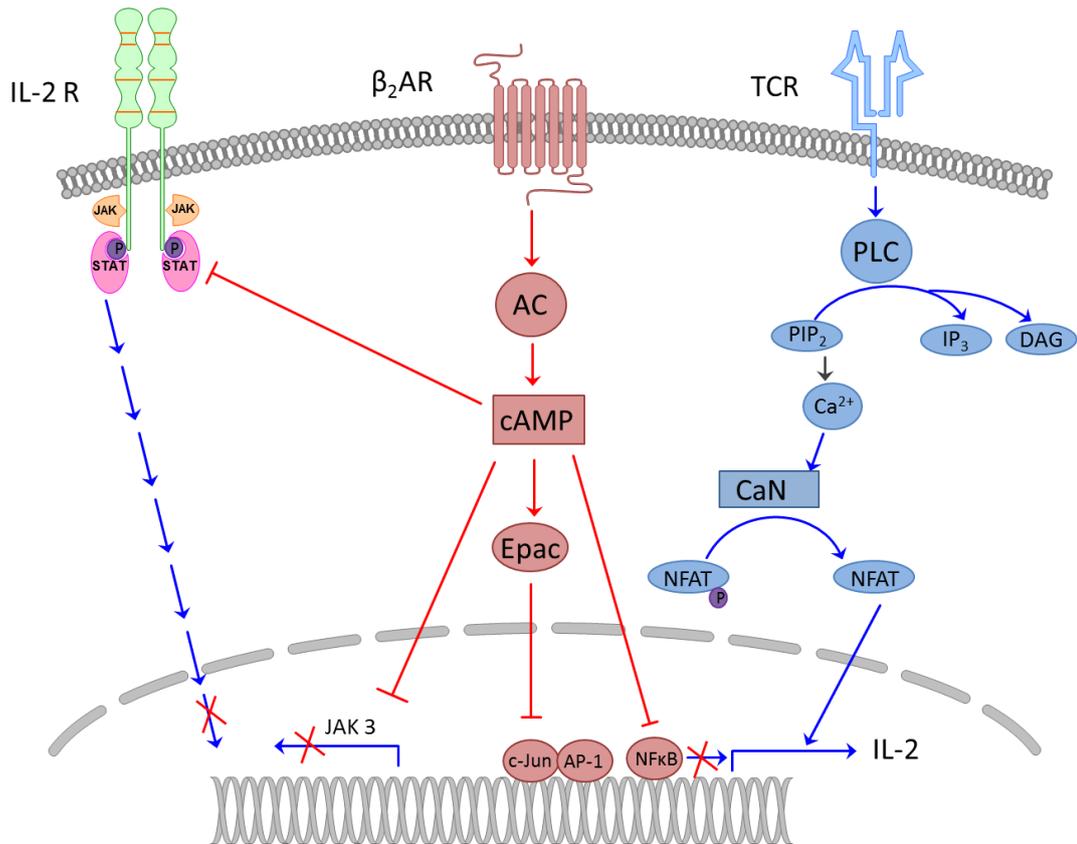
Eine weitere Möglichkeit der cAMP-vermittelten PKA-unabhängigen Inhibition von T-Zellfunktionen läuft über den IL-2 R. Ein durch Forskolin induzierter Anstieg von cAMP in humanen T-Zellen führt zu einer Veränderung des IL-2 R-Signaling. Das IL-2 R-Signaling ist notwendig für die T-Zellaktivierung und -proliferation während einer Immunantwort. Der IL-2 R ist ein heterotrimerer Komplex aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette. Nach einer Aktivierung

des Rezeptors durch IL-2 werden die Janus-Tyrosinkinasen (JAK) 1 und 3 zur  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette des Rezeptors rekrutiert und aktiviert. JAK 1 und 3 phosphorylieren dann den IL-2 R. So entsteht eine Bindestelle für *Downstreamfaktoren* des Rezeptors wie STAT 5a/b (*Signal transducer and activator of transcription*), das durch die Bindung aktiviert wird und in den Nukleus transloziert. Dort spielt STAT 5a/b eine Rolle bei der Transkription wichtiger Gene für die Zytokinproduktion und Zellproliferation. cAMP stört die Bildung der IL-2 R-Komplexes und setzt so die katalytische Aktivität von JAK 3 herab, was wiederum das STAT 5-Signaling verhindert (Rodriguez et al. 2013) (Abbildung 17). Ein weiterer Eingriff in das IL-2 R-Signaling stellt die durch einen cAMP-Anstieg induzierte Inhibition der JAK 3-Expression dar, die in humanen PBMCs nachgewiesen werden konnte (Kolenko et al. 1999) (Abbildung 17).

Ein durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) herbeigeführter Anstieg des cAMP-Spiegels in EL-4 TB6-Zellen, einer murinen Lymphomzelllinie, führt ebenfalls dazu, dass NF $\kappa$ B nicht mehr an die entsprechende Stelle im Promotor des IL-2-Gens binden kann (Tsuruta et al. 1995) (Abbildung 17).

Überdies wurden bereits Signalwege für  $\beta_2$ AR beschrieben, die sogar unabhängig von dem rezeptorgebundenen  $G_s$ -Protein vermittelt werden. Eine chronische Stimulation des Rezeptors oder hohe Norepinephrinkonzentrationen können zu einer agonisteninduzierten Desensibilisierung des Rezeptors führen. Dies hat die Internalisierung des Rezeptors zur Folge, der dann zu den Lysosomen transportiert wird, um dort degradiert zu werden. Ursächlich dafür ist eine Phosphorylierung des Rezeptors zunächst durch die PKA und dann durch GRK 2 (G-Protein gekoppelter Rezeptor-Kinase). Die Phosphorylierung führt zu einem  $G_s/G_i$ -Shift und zur Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin an den Rezeptor, was wiederum die Internalisierung bewirkt (Lorton and Bellinger 2015). Das  $G_i$ -Coupling kann transient ein Signaling über den MAPK-Weg bedingen (Baillie et al. 2003). Bei hohen Konzentrationen eines  $\beta_2$ AR-Agonisten wird der Rezeptor eher durch GRK 5/6 als durch GRK 2 phosphoryliert. Dies hat zur Folge, dass statt  $\beta$ -Arrestin 1, das zu Internalisierung des Rezeptors führt,  $\beta$ -Arrestin 2 bindet, das wiederum ein Gerüst bietet für den MAPK-Signalweg. Bei diesem Signalweg phosphorylieren die MAPK-Subtypen ERK, c-Jun und p38 eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und Kinasen zur Regulation der Genexpression (Lorton and Bellinger 2015). Der in dieser Arbeit dokumentierte geringe cAMP-Anstieg in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Stimulation dieser mit TERB, lässt die Vermutung zu, dass hier nicht die durch G-Proteine der Klasse  $G_s$  vermittelte cAMP-PKA-Kaskade stattfindet. Ursächlich dafür könnte ein  $G_s/G_i$ -Shift sein.

Warum in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein anderer Signalweg gewählt wird als bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Ratte, bleibt dabei eine offene Frage. In dieser Studie wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Peripherie gewonnen, während bei Riether et al. (2011) die T-Zellen aus der Milz isoliert wurden. Fraglich ist aber, ob dieser Unterschied ausschlaggebend für die aufgezeigten Differenzen ist. Ein weiteres Problem bedingte sich zunächst aus dem verwendeten Inhibitor. H-89 inhibiert nicht nur die PKA, sondern auch weitere Enzyme und wechselwirkt mit dem  $\beta_2$ AR. Studien haben gezeigt, dass die inhibitorische Wirkung von H-89 auf die PKA hauptsächlich durch die antagonistische Bindung des Inhibitors an  $\beta_2$ AR vermittelt wird (Penn et al. 1999). Um die PKA-Unabhängigkeit des analysierten Signalwegs absichern zu können, wurde daher zusätzlich das wesentlich spezifischere PKA-Inhibitorfragment 14-22 eingesetzt (Murray 2008). Da auch die spezifische Inhibition der PKA keinen Einfluss auf die TERB-vermittelte dosisabhängige Reduktion der IL-2-Produktion hatte, kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich ein PKA-unabhängiger Signalweg vorliegt. Um feststellen zu können, welche der beschriebenen PKA-unabhängigen Signalkaskaden ursächlich für die  $\beta_2$ AR-vermittelte Immunsuppression ist, sind weitere Experimente von Nöten. Unter anderem könnte man analysieren welchen Effekt eine Inhibition von Epac hat, die STAT 5 Phosphorylierung des IL-2 R bei einer Behandlung mit TERB untersuchen oder prüfen, ob es durch die verwendeten TERB-Konzentrationen zu einem  $G_s/G_i$ -Switch des GPCRs kommt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die  $\beta_2$ AR vermittelte Inhibition der IL-2-Produktion in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht über die Inhibition von CaN vermittelt wird, sondern hier ein unabhängig von der PKA oder vielleicht sogar unabhängig vom G-Protein vermittelter Signalweg vorliegt.



**Abbildung 17: PKA-unabhängiges  $\beta_2$ AR-Signaling in  $CD4^+$  T-Zellen.** Nicht nur die PKA wird durch cAMP aktiviert. Ein weiterer *Downstreamfaktor* von cAMP ist Epac, das inhibierend auf die IL-2-Expression wirkt, indem es die DNA-Affinität von c-Jun reduziert. C-Jun ist ein wichtiger Bestandteil der Transkriptionsfaktors AP-1, der ausschlaggebend für die IL-2-Produktion ist. Des Weiteren stört cAMP die Assoziation des IL-2 R-Komplexes, sodass dieser nicht mehr den positiven Feedbackloop, der zu einer verstärkten IL-2-Expression führt, starten kann. cAMP sorgt zusätzlich für eine Inhibition der JAK 3-Expression und schwächt dadurch zusätzlich den IL-2 R-Komplex. Auch NFκB, ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die IL-2-Produktion, wird durch cAMP inhibiert. Abbildung wurde angefertigt mit Motifolio®.  $\beta_2$ AR:  $\beta_2$ -Adrenozeptor; AC: Adenylatcyclase, CaN: Calcineurin, DAG: Diacylglycerol; IL-2 R: IL-2-Rezeptor; IP<sub>3</sub>: Insoitoltriphosphat; JAK: Janus Tyrosinkinase, PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C; STAT: Signal transducer and activator of transcription; TCR: T-Zellrezeptor.

## 5. Zusammenfassung

Die klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte ist ein eindrucksvolles Beispiel für die bidirektionale Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem. In tierexperimentellen Studien konnten bereits die Mechanismen und die potentielle klinische Relevanz der Konditionierung von T-Zellfunktionen dokumentiert werden. Auch beim Menschen lassen sich immunsuppressive Effekte konditionieren. Dafür wurde ein Paradigma etabliert, in dem das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) als unkonditionierter Stimulus (US) mehrmals mit einem gustatorischen Reiz (konditionierter Stimulus/CS) gepaart wird. Das Ziel dieser Studien war es die potentielle klinische Relevanz dieses assoziativen Lernprozesses bei immunsupprimierten Patienten zu analysieren. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig ein Konditionierungsparadigma erfolgreich in eine bereits bestehende pharmakologische Behandlung mit Calcineurin (CaN)-Inhibitoren bei nierentransplantierten Patienten eingebettet. Dafür wurden die Teilnehmer (24 Männer und 6 Frauen) gebeten ihre Medikamenteneinnahmen mit einem neuartigen grünen Getränk (CS) zu kombinieren. Nach sechs Paarungen in der Akquisition, wurden in der Evokation zwischen die Einnahmen der Immunsuppressiva zwei Placeboeinnahmen integriert, die ebenfalls mit dem CS kombiniert wurden. Vor und nach der Konditionierung wurde den Patienten zu drei Zeitpunkten Blut abgenommen und die anti-CD3-induzierte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion, sowie die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen. Die gelernte Immunsuppression führte zu einer signifikanten Inhibition des zirkadianen Anstiegs der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die intrazellulären Mechanismen der Konditionierung immunsuppressiver Effekte in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. In tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Konditionierung des Immunsystems durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und die Ausschüttung von Katecholaminen vermittelt wird. Über  $\beta$ -Adrenozeptoren (AR) wird der Effekt der Katecholamine an immunkompetente Zellen weitergeleitet. Aus Experimenten mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Ratte ist bekannt, dass die Aktivierung des  $\beta_2$ AR auf T-Zellen über die Inhibition von CaN zur Reduktion der IL-2-Produktion führt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des  $\beta_2$ AR bei humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwar ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition der IL-2-Produktion bedingt, der zugrunde liegende Mechanismus allerdings sowohl CaN- als auch Proteinkinase A-unabhängig ist.

Zusammen bilden diese Befunde einen weiteren wichtigen Schritt für den Einsatz von Konditionierungsprozessen als ergänzende Therapie im Rahmen einer immunopharmakologischen Behandlung.

## 6. Literatur

- (1) Ader, R. (1974): Behaviorally Conditioned Immunosuppression. *Psychosomatic Medicine* 36, 183-184.
- (2) Ader, R. and Cohen, N. (1982): Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science* 215, 1534-1536.
- (3) Ader, R., Cohen, N. and Bovbjerg, D. (1982): Conditioned suppression of humoral immunity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 96, 517.
- (4) Ader, R. (2000): On the development of psychoneuroimmunology. *European Journal of Pharmacology* 405, 167-176.
- (5) Albring, A., Wendt, L., Benson, S., Witzke, O., Kribben, A., Engler, H. and Schedlowski, M. (2012): Placebo effects on the immune response in humans: the role of learning and expectation. *PloS One* 7, e49477.
- (6) Albring, A., Wendt, L., Benson, S., Nissen, S., Yavuz, Z., Engler, H., Witzke, O. and Schedlowski, M. (2014): Preserving learned immunosuppressive placebo response: perspectives for clinical application. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 96.
- (7) Albring, A., Wendt, L., Harz, N., Engler, H., Wilde, B., Kribben, A., Lindemann, M., Schedlowski, M. and Witzke, O. (2015): Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors in renal transplant patients. *Clinical Transplantation* 29, 294-300.
- (8) Almahariq, M., Mei, F. C., Wang, H., Cao, A. T., Yao, S., Soong, L., Sun, J., Cong, Y., Chen, J. and Cheng, X. (2015): Exchange protein directly activated by cAMP modulates regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Biochemical Journal* 465, 295-303.
- (9) Alvarezborda, B., Ramirezamaya, V., Perezmontfort, R. and Bermudezrattoni, F. (1995): Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory* 64, 103-105.
- (10) Baillie, G. S., Sood, A., McPhee, I., Gall, I., Perry, S. J., Lefkowitz, R. J. and Houslay, M. D. (2003):  $\beta$ -Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates  $\beta$ -adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 940-945.
- (11) Bandres, E., Merino, J., Vazquez, B., Inoges, S., Moreno, C., Subira, M. and Sanchez-Ibarrola, A. (2000): The increase of IFN- $\gamma$  production through aging correlates with the expanded CD8<sup>+</sup> highCD28<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> subpopulation. *Clinical Immunology* 96, 230-235.
- (12) Barrett, J. E., King, M. G. and Pang, G. (2000): Conditioning rhinitis in allergic humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917, 853-859.

- (13) Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P. and Crabtree, G. R. (1997): Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1933.
- (14) Bermudez-Rattoni, F. and McGaugh, J. L. (1991): Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research* 549, 165-170.
- (15) Besedovsky, H., Sorkin, E., Felix, D. and Haas, H. (1977): Hypothalamic changes during the immune response. *European Journal of Immunology* 7, 323-325.
- (16) Borel, J. a., Feurer, C., Gubler, H. and Stähelin, H. (1994): Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Inflammation Research* 43, 179-186.
- (17) Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Taylor, P. A., Berezovskaya, A., Grass, I., Blazar, B. R. and Nadler, L. M. (2000): p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nature Medicine* 6, 290-297.
- (18) Bouton, M. E. (2002): Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry* 52, 976-986.
- (19) Boyman, O. and Sprent, J. (2012): The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 12, 180.
- (20) Breder, C. D., Hazuka, C., Ghayur, T., Klug, C., Huginin, M., Yasuda, K., Teng, M. and Saper, C. B. (1994): Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 11393-11397.
- (21) Bryce, P. J., Dascombe, M. J. and Hutchinson, I. V. (1999): Immunomodulatory effects of pharmacological elevation of cyclic AMP in T lymphocytes proceed via a protein kinase A independent mechanism. *Immunopharmacology* 41, 139-146.
- (22) Buske-Kirschbaum, A., Kirschbaum, C., Stierle, H., Jabaij, L. and Hellhammer, D. (1994): Conditioned manipulation of natural killer (NK) cells in humans using a discriminative learning protocol. *Biological Psychology* 38, 143-155.
- (23) Capuron, L. and Miller, A. H. (2011): Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics* 130, 226-238.
- (24) Cascalho, M. I., Chen, B. J., Kain, M. and Platt, J. L. (2013): The paradoxical functions of B cells and antibodies in transplantation. *The Journal of Immunology* 190, 875-879.

- (25) Chow, C.-W. and Davis, R. J. (2000): Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Molecular and Cellular Biology* 20, 702-712.
- (26) Cornell, L. D., Smith, R. N. and Colvin, R. B. (2008): Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *The Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Diseases* 3, 189-220.
- (27) Creemers, P., Pascoe, M., Pontin, A. and Kahn, D. (1998): Rebound effect of the allogenic T-cell response to donor and third-party lymphocytes after cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients. *Transplant Immunology* 6, 261-264.
- (28) Daniel, V., Naujokat, C., Sadeghi, M., Wiesel, M., Hergesell, O. and Opelz, G. (2005): Association of Circulating Interleukin (IL)-12—and IL-10—Producing Dendritic Cells with Time Posttransplant, Dose of Immunosuppression, and Plasma Cytokines in Renal-Transplant Recipients. *Transplantation* 79, 1498-1506.
- (29) de Mattos, A. M., Olyaei, A. J. and Bennett, W. M. (2000): Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *American Journal of Kidney Diseases* 35, 333-346.
- (30) Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. and Vizi, E. S. (2000): The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews* 52, 595-638.
- (31) Engler, H., Brendt, P., Wischermann, J., Wegner, A., Röhling, R., Schoemberg, T., Meyer, U., Gold, R., Peters, J. and Benson, S. (2017): Selective increase of cerebrospinal fluid IL-6 during experimental systemic inflammation in humans: association with depressive symptoms. *Molecular Psychiatry*.
- (32) Exton, M., Schult, M., Donath, S., Strubel, T., Nagel, E., Westermann, J. and Schedlowski, M. (1998a). Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Transplantation Proceedings*, Elsevier.
- (33) Exton, M. S., von Hörsten, S., Schult, M., Vöge, J., Strubel, T., Donath, S., Steinmüller, C., Seeliger, H., Nagel, E. and Westermann, J. (1998b): Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *Journal of Neuroimmunology* 88, 182-191.
- (34) Exton, M. S., Schult, M., Donath, S., Strubel, T., Bode, U., del Rey, A., Westermann, J. and Schedlowski, M. (1999): Conditioned immunosuppression makes subtherapeutic cyclosporin effective via splenic innervation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 276, R1710-R1717.
- (35) Exton, M. S., Elfers, A., Jeong, W.-Y., Bull, D. F., Westermann, J. and Schedlowski, M. (2000): Conditioned suppression of contact sensitivity is independent of sympathetic splenic innervation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279, R1310-R1315.

- (36) Exton, M. S., Herklotz, J., Westermann, J. and Schedlowski, M. (2001): Conditioning in the rat: an in vivo model to investigate the molecular mechanisms and clinical implications of brain-immune communication. *Immunological Reviews* 184, 226-235.
- (37) Exton, M. S., Gierse, C., Meier, B., Mosen, M., Xie, Y., Frede, S., Goebel, M. U., Limmroth, V. and Schedlowski, M. (2002): Behaviorally conditioned immunosuppression in the rat is regulated via noradrenaline and  $\beta$ -adrenoceptors. *Journal of Neuroimmunology* 131, 21-30.
- (38) Fantuzzi, G. (2005): Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, 911-919.
- (39) Felten, D., Ackerman, K., Wiegand, S. and Felten, S. (1987): Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *Journal of Neuroscience Research* 18, 28-36.
- (40) Filiano, A. J., Xu, Y., Tustison, N. J., Marsh, R. L., Baker, W., Smirnov, I., Overall, C. C., Gadani, S. P., Turner, S. D. and Weng, Z. (2016): Unexpected role of interferon- $\gamma$  in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* 535, 425-429.
- (41) Fuld, S., Borland, G. and Yarwood, S. J. (2005): Elevation of cyclic AMP in Jurkat T-cells provokes distinct transcriptional responses through the protein kinase A (PKA) and exchange protein activated by cyclic AMP (EPAC) pathways. *Experimental Cell Research* 309, 161-173.
- (42) Gauci, M., Husband, A., Saxarra, H. and King, M. (1994): Pavlovian conditioning of nasal tryptase release in human subjects with allergic rhinitis. *Physiology & Behavior* 55, 823-825.
- (43) Ghanta, V., Hiramoto, R. N., Solvason, B. and Spector, N. H. (1987): Influence of conditioned natural immunity on tumor growth. *Annals of the New York Academy of Sciences* 496, 637-646.
- (44) Giang, D. W., Goodman, A. D., Schiffer, R. B., Mattson, D. H., Petrie, M., Cohen, N. and Ader, R. (1996): Conditioning of cyclophosphamide-induced leukopenia in humans. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 8, 194-201.
- (45) Goebel, M. U., Trebst, A. E., Steiner, J., Xie, Y. F., Exton, M. S., Frede, S., Canbay, A. E., Michel, M. C., Heemann, U. and Schedlowski, M. (2002): Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in humans. *The FASEB Journal* 16, 1869-1873.

- (46) Goebel, M. U., Meykadeh, N., Kou, W., Schedlowski, M. and Hengge, U. R. (2008): Behavioral conditioning of antihistamine effects in patients with allergic rhinitis. *Psychotherapy and Psychosomatics* 77, 227-234.
- (47) Grochowicz, P. M., Schedlowski, M., Husband, A. J., King, M. G., Hibberd, A. D. and Bowen, K. M. (1991): Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 5, 349-356.
- (48) Hadamitzky, M., Bösche, K., Wirth, T., Buck, B., Beetz, O., Christians, U., Schniedewind, B., Lückemann, L., Güntürkün, O., Engler, H. and Schedlowski, M. (2016): Memory-updating abrogates extinction of learned immunosuppression. *Brain, Behavior, and Immunity* 52, 40-48.
- (49) Halloran, P. F. (2004): Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *New England Journal of Medicine* 351, 2715-2729.
- (50) Irwin, M. R. (2008): Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery. *Brain, Behavior, and Immunity* 22, 129-139.
- (51) Kelley, K., Dantzer, R., Mormede, P., Salmon, H. and Aynaud, J.-M. (1985): Conditioned taste aversion suppresses induction of delayed-type hypersensitivity immune reactions. *Physiology & Behavior* 34, 189-193.
- (52) Kim, S. S., Lee, E. H., Lee, K., Jo, S.-H. and Seo, S. R. (2015): PKA regulates calcineurin function through the phosphorylation of RCAN1: Identification of a novel phosphorylation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 459, 604-609.
- (53) Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, M., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M. and Aoki, H. (1987): FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. *The Journal of Antibiotics* 40, 1256-1265.
- (54) Klosterhalfen, S. and Klosterhalfen, W. (1990): Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behavioral Neuroscience* 104, 716.
- (55) Kohm, A. P. and Sanders, V. M. (2000): Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunology Today* 21, 539-542.
- (56) Kohm, A. P. and Sanders, V. M. (2001): Norepinephrine and  $\beta$ 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacological Reviews* 53, 487-525.
- (57) Kolenko, V., Rayman, P., Roy, B., Cathcart, M. K., O'Shea, J., Tubbs, R., Rybicki, L., Bukowski, R. and Finke, J. (1999): Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. *Blood* 93, 2308-2318.

- (58) Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S. L. (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- (59) Liu, J. (1993): FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunology Today* 14, 290-295.
- (60) Lorton, D. and Bellinger, D. L. (2015): Molecular mechanisms underlying  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 5635-5665.
- (61) Lückemann, L., Unteroberdörster, M., Kirchhof, J., Schedlowski, M. and Hadamitzky, M. (2017): Applications and limitations of behaviorally conditioned immunopharmacological responses. *Neurobiology of Learning and Memory*.
- (62) Lueckemann, L., Börsche, K., Engler, H., Schwitalla, J.-C., Hadamitzky, M. and Schedlowski, M. (2016): Pre-exposure to the unconditioned or conditioned stimulus does not affect learned immunosuppression in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 51, 252-257.
- (63) MacKenzie, J. N. (1886): The production of the so-called "rose cold" by means of an artificial rose. *The American Journal of the Medical Science* 91, 45-57.
- (64) Madden, K. S., Sanders, V. M. and Felten, D. L. (1995): Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35, 417-448.
- (65) Madden, K. S. (2003): Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity* 17, 5-10.
- (66) Mary, D., Aussel, C., Ferrua, B. and Fehlmann, M. (1987): Regulation of interleukin 2 synthesis by cAMP in human T cells. *The Journal of Immunology* 139, 1179-1184.
- (67) Metalnikov, S. and Chorine, V. (1926): The role of conditioned reflexes in immunity. *Annales de l'Institut Pasteur* 40, 118.
- (68) Moulton, V. R. and Tsokos, G. C. (2011): Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 13, 207.
- (69) Murray, A. J. (2008): Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science Signaling* 1, re4.
- (70) Ober, K., Benson, S., Vogelsang, M., Bylica, A., Günther, D., Witzke, O., Kribben, A., Engler, H. and Schedlowski, M. (2012): Plasma noradrenaline and state anxiety levels

predict placebo response in learned immunosuppression. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 91.

(71) Pacheco-Lopez, G., Niemi, M.-B., Kou, W., Härting, M., Del Rey, A., Besedovsky, H. and Schedlowski, M. (2004): Behavioural endocrine immune-conditioned response is induced by taste and superantigen pairing. *Neuroscience* 129, 555-562.

(72) Pacheco-López, G., Niemi, M.-B., Kou, W., Härting, M., Fandrey, J. and Schedlowski, M. (2005): Neural substrates for behaviorally conditioned immunosuppression in the rat. *Journal of Neuroscience* 25, 2330-2337.

(73) Pacheco-López, G., Riether, C., Doenlen, R., Engler, H., Niemi, M.-B., Engler, A., Kavelaars, A., Heijnen, C. J. and Schedlowski, M. (2009): Calcineurin inhibition in splenocytes induced by pavlovian conditioning. *The FASEB Journal* 23, 1161-1167.

(74) Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P., D'ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C. and Sinigaglia, F. (1997): Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *Journal of Clinical Investigation* 100, 1513.

(75) Pavlov, I. P. and Anrep, G. V. e. (2003). Conditioned reflexes, Courier Corporation.

(76) Pavlov, V. A. and Tracey, K. J. (2017): Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nature Neuroscience* 20, 156-166.

(77) Penn, R. B., Parent, J.-L., Pronin, A. N., Panettieri, R. A. and Benovic, J. L. (1999): Pharmacological inhibition of protein kinases in intact cells: antagonism of beta adrenergic receptor ligand binding by H-89 reveals limitations of usefulness. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288, 428-437.

(78) Ramírez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B. and Bermudez-Rattoni, F. (1998): Differential effects of NMDA-induced lesions into the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain, Behavior, and Immunity* 12, 149-160.

(79) Ramstad, C., Sundvold, V., Johansen, H. K. and Lea, T. (2000): cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cellular Signalling* 12, 557-563.

(80) Riether, C., Kavelaars, A., Wirth, T., Pacheco-López, G., Doenlen, R., Willemsen, H., Heijnen, C. J., Schedlowski, M. and Engler, H. (2011): Stimulation of  $\beta$  2-adrenergic receptors inhibits calcineurin activity in CD4+ T cells via PKA–AKAP interaction. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 59-66.

- (81) Rodriguez, G., Ross, J. A., Nagy, Z. S. and Kirken, R. A. (2013): Forskolin-inducible cAMP pathway negatively regulates T-cell proliferation by uncoupling the interleukin-2 receptor complex. *Journal of Biological Chemistry* 288, 7137-7146.
- (82) Rothwell, N. J., Luheshi, G. and Toulmond, S. (1996): Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacology & Therapeutics* 69, 85-95.
- (83) Rügger, A., Kuhn, M., Lichti, H., Loosli, H. R., Huguenin, R., Quiquerez, C. and von Wartburg, A. (1976): Cyclosporin A, ein immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Helvetica Chimica Acta* 59, 1075-1092.
- (84) Sadeghi, M., Daniel, V., Naujokat, C., Schmidt, J., Mehrabi, A., Zeier, M. and Opelz, G. (2007): Evidence for IFN- $\gamma$  up- and IL-4 downregulation late post-transplant in patients with good kidney graft outcome. *Clinical Transplantation* 21, 449-459.
- (85) Sanders, V. M. (1995): The role of adrenoceptor-mediated signals in the modulation of lymphocyte function. *Advances in Neuroimmunology* 5, 283-298.
- (86) Schedlowski, M., Hosch, W., Oberbeck, R., Benschop, R. J., Jacobs, R., Raab, H.-R. and Schmidt, R. E. (1996): Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *The Journal of Immunology* 156, 93-99.
- (87) Schedlowski, M. and Pacheco-López, G. (2010): The learned immune response: Pavlov and beyond. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 176-185.
- (88) Schedlowski, M., Engler, H. and Grigoleit, J.-S. (2014): Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity* 35, 1-8.
- (89) Smith Jr, R. G. and Mcdaniel, S. M. (1983): Psychologically mediated effect on the delayed hypersensitivity reaction to tuberculin in humans. *Psychosomatic Medicine* 45, 65-70.
- (90) Steinbach, W. J., Reedy, J. L., Cramer, R. A., Perfect, J. R. and Heitman, J. (2007): Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nature Reviews Microbiology* 5, 418-430.
- (91) Torgersen, K. M., Vang, T., Abrahamsen, H., Yaqub, S. and Taskén, K. (2002): Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cellular Signalling* 14, 1-9.
- (92) Tracey, K. J. (2009): Reflex control of immunity. *Nature Reviews Immunology* 9, 418-428.

- (93) Tsigos, C. and Chrousos, G. P. (2002): Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53, 865-871.
- (94) Tsuruta, L., Lee, H.-J., Masuda, E. S., Koyano-Nakagawa, N., Arai, N., Arai, K.-i. and Yokota, T. (1995): Cyclic AMP inhibits expression of the IL-2 gene through the nuclear factor of activated T cells (NF-AT) site, and transfection of NF-AT cDNAs abrogates the sensitivity of EL-4 cells to cyclic AMP. *The Journal of Immunology* 154, 5255-5264.
- (95) Vang, T., Torgersen, K. M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F. O., Skålhegg, B. S., Hansson, V., Mustelin, T. and Taskén, K. (2001): Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 497-508.
- (96) Webster, J. I., Tonelli, L. and Sternberg, E. M. (2002): Neuroendocrine regulation of immunity\*. *Annual Review of Immunology* 20, 125-163.
- (97) Wirth, T., Ober, K., Prager, G., Vogelsang, M., Benson, S., Witzke, O., Kribben, A., Engler, H. and Schedlowski, M. (2011): Repeated recall of learned immunosuppression: evidence from rats and men. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 1444-1451.
- (98) Wrona, D. (2006): Neural–immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of Neuroimmunology* 172, 38-58.
- (99) Xie, Z., Geiger, T. R., Johnson, E. N., Nyborg, J. K. and Druey, K. M. (2008): RGS13 acts as a nuclear repressor of CREB. *Molecular Cell* 31, 660-670.
- (100) Ziemssen, T. and Kern, S. (2007): Psychoneuroimmunology–cross-talk between the immune and nervous systems. *Journal of Neurology* 254, 118-1111.

## 7. Anhang

### 7.1. Zusätzliche Tabellen

Tabelle 4: Weitere pharmakologische Behandlung der Patienten

<b>Weitere immunsuppressive Medikamente</b>	
Azathioprin	1
Mycophenolatmofetil	12
Mycophenolat	8
Everolimus	3
<b>Präparate zur Blutdruckregulation</b>	
Vasodilatoren	
Dihydralazin	1
Diuretika	
Hydrochlorothiazid	4
Furosemid	4
Torasemid	4
ACE-Blocker	
Enalapril	3
Ramipril	8
AT1-Antagonisten	
Candesartan	3
Losartan	1
$\alpha_1$ -Agonisten	
Brimonidin	1
Clonidin	3
$\alpha_1$ -Blocker	
Doxazosin	2
Tamsulosin	3
Calcium-Kanal-Blocker	
Amlodipin	14
Lercanidipin	2
$\beta_1$ -Blocker	
Atenolol	2
Nebivolol	2
Bisoprolol	7
Metoprolol	9
<b>Cholesterin-Senker</b>	
Simvastatin	7
Fluvastatin	8
Pravastatin	3
Atorvastatin	1
<b>Vitamin D</b>	
Alfacalcidol	2
Cholecalciferol	20
Calcitriol	3
<b>Antibiotika</b>	
Cotrimoxazol	1
<b>Virostatika</b>	
Entecavir	1
<b>Antikonvulsiva</b>	
Gabapentin	1

<b>Antidepressiva</b>	
Amitriptylin	1
Citalopram	1
<b>Eisenpräparate</b>	5
<b>Insulin</b>	2
<b>Urikostatika</b>	
Allopurinol	5
<b>Urikusurika</b>	
Benzbromaron	5
<b>Kaliumpräparate</b>	2
<b>Antidiabetika</b>	
Repaglinid	4
<b>Blutverdünner, Schmerzmittel, Entzündungshemmer</b>	
ASS	10
Rivaroxaban	1
Metamizol	6
Mesalazin	1
<b>Protonenpumpeninhibitor</b>	17
<b>Glukokortikoide</b>	
Prednison	24
<b>Prostaglandine</b>	
Travoprost	1
Latanoprost	2
<b>Sonstiges</b>	
Ursodeoxycholsäure	1
Natriumhydrogencarbonat	6
Molsidomin	1
Cinacalcethydrochlorid	3
Isosorbiddinitrat	1

Tabelle 5: Kardiovaskuläre Parameter der Patienten. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM

	Pre Conditioning		Post Conditioning
<b>Blutdruck</b>	+2 h	systolisch	128,77 $\pm$ 5,61 n=26
		diastolisch	82,42 $\pm$ 1,58
	+6 h	systolisch	135,00 $\pm$ 2,57 n=29
		diastolisch	81,48 $\pm$ 1,52
+10 h	systolisch	140,67 $\pm$ 3,14 n=30	
	diastolisch	84,73 $\pm$	
<b>Puls</b>	+2 h		72,30 $\pm$ 1,80 n=30
	+6 h		74,50 $\pm$ 2,24 n=30
	+10 h		72,07 $\pm$ 2,09 n=30

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neuro-Immun-Interaktion..	8
Abbildung 2: $\beta_2$ AR-Signaling in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	19
Abbildung 3: $\beta_2$ AR-abhängige Inhibition der IL-2-Produktion über CaN.....	20
Abbildung 4: Wirkmechanismus von CsA/Tac.....	27
Abbildung 5: Studiendesign. ....	29
Abbildung 6: Gelernte Immunsuppression der T-Zellfunktionen. ....	38
Abbildung 7: ADR-, NA- und Cortisolspiegel im Plasma.....	39
Abbildung 8: Anzahl der zirkulierenden CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup> und CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	40
Abbildung 9: CsA- und Tac-Spiegel .....	41
Abbildung 10: Immunologische Parameter bei chronischer und aktueller Behandlung mit CaN-Inhibitoren.....	42
Abbildung 11: Einfluss der Behandlung mit $\beta$ -Blockern auf die Konditionierung immunsuppressiver Effekte.....	44
Abbildung 12: Effekte der Aktivierung des $\beta_2$ AR auf die IL-2-Produktion.....	45
Abbildung 13: Kerntranslokation von NFAT in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation des $\beta_2$ AR. ....	46
Abbildung 14: Rolle von cAMP und PKA in der $\beta_2$ AR-vermittelten IL-2-Inhibition. ....	48
Abbildung 15: TERB-induzierte Inhibition der IL-2-Produktion bei gleichzeitiger PKA-Inhibition in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	49
Abbildung 16: TERB-induzierte Reduktion der IL-2-Produktion bei spezifischer PKA-Inhibition durch das Inhibitorfragment 14-22 in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	50
Abbildung 17: PKA-unabhängiges $\beta_2$ AR-Signaling in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	60

## 7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Patientenkohorte.....	23
Tabelle 2: Transplantationsursächliche Diagnosen der Patientenkohorte .....	24
Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Probandenkohorte. ....	25
Tabelle 4: Weitere pharmakologische Behandlung der Patienten .....	71
Tabelle 5: Kardiovaskuläre Parameter der Patienten .....	72

**7.4. Abkürzungsverzeichnis**

AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotropin
ADR	Adrenalin
AKAP	A Kinase-Ankerprotein
ANOVA	Analysis of Variance
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Allophycocyanin
AR	Adrenozeptor/adrenerger Rezeptor
BMI	Body Mass Index
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB Binding Protein
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CR	Konditionierte Antwort
CRE	cAMP Response Elemente
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
CS	konditionierter Stimulus
CsA	Cyclosporin A
Csk	C-terminale Src-Kinase
CTA	konditionierte Geschmacksaversion
DAG	Diacylglycerol
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzol
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
ELISA	Enzym linked immunosorbent Assay
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierende Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FKBP12	FK506 Binding Protein 12
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Exchange Factor

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	Glukokortikoid Responsive Element
GRK	G-Protein gekoppelter Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSP-90	Heat Shock Protein-90
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-2 R	Interleukin-2-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
JAK	Janus-Kinase
Lck	Lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnet Associated Cell Sorting
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NA	Noradrenalin
NAD	Nadolol
NFAT	Nuclear Factor of activated T cells
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n.s.	Nicht signifikant
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-CREB	Phospho- cAMP Response Element-Binding Protein
PDE	Phosphodiesterase
PGE2	Prostaglandin E2
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PNI	Psychoneuroimmunologie
Raf-1	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1
RCAN1	endogener Regulator von CaN
RGS	Regulator of G-Protein Signaling
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAM-Achse	Sympathetic Adrenal Medullary-Achse
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler
SNP	Single Nucleotide-Polymorphismus
SNS	Sympathisches Nervensystem
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tac	Tacrolimus
TCR	T-Zellrezeptor
TERB	Terbutalin
TH1/TH2	T-Helferzellen Typ1/Typ2
TNF	Tumornekrosefaktor
UR	Unkonditionierte Antwort
US	Unkonditionierter Stimulus
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. Danksagung

Mit größtem Respekt möchte ich zuerst und besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Schedlowski danken. Er ermöglichte mir nicht nur meine Masterarbeit an seinem Institut anzufertigen, sondern brachte mir auch das Vertrauen entgegen ebenfalls meine Dissertation unter seiner hervorragenden Betreuung anzufertigen. Dabei haben zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen und seine Unterstützung entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Witzke, Prof. Dr. Benjamin Wilde, Dr. Alexandra Brinkhoff und Christa Freundlieb bedanken, die über eine Kooperation, enge Zusammenarbeit und durch ihre große Hilfsbereitschaft diese Studie überhaupt ermöglicht haben.

Besonders herzlich bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Harald Engler, der mich von meinen ersten *in vitro* Experimenten als Masterstudentin bis hin zu meinen letzten Experimenten begleitet und unterstützt hat und mir immer wieder mit Rat und Tat zu Seite stand.

Ein unendlich großer Dank gilt auch meinen Kolleginnen Liubov Petrakova und Justine Schmidt, sowie meinen medizinischen Doktoranden Julian Laubrock und Juliana Müller. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Danke für die gemeinsamen Nachtschichten, die Unmengen Zucker, die uns über den Tag gebracht haben und die vielen schönen Gespräche.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern im Institut für medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie für das angenehme Arbeitsumfeld und die Hilfsbereitschaft. Dabei möchte ich besonders Prof. Dr. Benson für seine Hilfe bei der Statistik und Laura Lückemann für die gemeinsamen Mittagspausen und das geteilte Leid hervorheben.

Der allergrößte Dank gebührt meinen Eltern für die Unterstützung in jeder Lebenslage, den Rückhalt, das Auffangen und den bedingungslosen Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten. Ihnen möchte ich diese Arbeit in Liebe widmen.