

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie

**Experimentelle Endotoxämie beim Menschen: Geschlechterunterschiede in
der inflammatorischen und neuro-endokrinen Reaktion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Laura Rebernik

aus Castrop-Rauxel

2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. H. Engler

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. E. Cario

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. M. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. September 2017

Teile dieser Arbeit sind publiziert in:

Wegner A, Benson S, **Rebernik L**, Spreitzer I, Jäger M, Schedlowski M, Elsenbruch S, Engler H (2017): Sex differences in the pro-inflammatory cytokine response to endotoxin unfold *in vivo* but not *ex vivo* in healthy humans. *Innate Immunity* (im Druck).

Wegner A, Elsenbruch S, **Rebernik L**, Roderigo T, Engelbrecht E, Jäger M, Engler H, Schedlowski M, Benson S (2015): Inflammation-induced pain sensitization in men and women: Does sex matter in experimental endotoxemia? *Pain* 156(10),1954-64.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Entzündung.....	1
1.1.1. Die akute Entzündung.....	1
1.1.2. Die chronische Entzündung	3
1.2. Bidirektionale Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem.....	5
1.3. Sickness Behavior	8
1.4. Geschlechterunterschiede in der Immunantwort	9
1.5. Experimentelle systemische Entzündung	13
1.6. Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	19
2.1. Probanden	19
2.1.1. Probandensicherheit und Ethik	19
2.1.2. Probandenrekrutierung und Ein- und Ausschlusskriterien	19
2.2. Studiendesign	21
2.3. Endotoxin.....	23
2.3.1. Aufbereitung und Verabreichung des Endotoxins.....	23
2.4. Labormethoden.....	24
2.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	24
2.4.2. Klinische Laborparameter	24
2.4.3. Blutbild	24
2.4.4. LBP und sCD14	25
2.4.5. Zytokinanalysen	25
2.4.6. Neuroendokrine Parameter	25
2.4.7. Vollblutstimulation	26
2.5. Fragebögen	27
2.5.1. Soziodemographischer Fragebogen	27

2.5.2. <i>Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)</i>	27
2.5.3. <i>State-Trait Anxiety Inventory (STAI)</i>	28
2.5.4. Mehrdimensionaler Befindlichkeits-Fragebogen (MDBF)	29
2.5.5. <i>Generic Assessment of Side Effects (GASE)</i>	29
2.6. Statistik	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Studie 1 (<i>in vivo</i>)	31
3.1.1. Soziodemographische und psychologische Daten	31
3.1.2. Klinische Parameter	32
3.1.3. Inflammatorische Parameter	33
3.1.4. Neuroendokrine Parameter	36
3.1.5. Fragebögen	38
3.2. Studie 2 (<i>ex vivo</i>)	40
3.2.1. Soziodemographische und psychologische Daten	40
3.2.2. Sensitivität der Zellen.....	41
4. Diskussion	43
4.1. Die inflammatorische Reaktion (<i>in vivo</i>)	43
4.2. Die neuroendokrine Reaktion (<i>in vivo</i>)	47
4.3. Sensitivität der Zellen (<i>ex vivo</i>)	50
4.4. Ausblick	52
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55
7. Anhang	64
7.1. Abkürzungsverzeichnis	64
7.2. Abbildungsverzeichnis	66
7.3. Tabellenverzeichnis	66
7.4. Danksagung.....	67

7.5. Lebenslauf	68
-----------------------	----

1. Einleitung

1.1. Entzündung

Im Laufe des Lebens ist der menschliche Organismus einer Vielzahl von Krankheitserregern ausgesetzt, die er schnell erkennen und effizient eliminieren muss. Das Immunsystem spielt dabei eine zentrale Rolle. Es besteht aus zwei Hauptkomponenten, die eng miteinander verknüpft sind: der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr und der adaptiven (spezifischen) Immunabwehr (Kanterman et al., 2012; O'Connell et al., 2012). Das angeborene Immunsystem fungiert nach den Schleimhäuten und der Haut als die zweite Barriere in der Abwehr gegenüber Pathogenen. Durch Pathogene, die diese Barriere überwinden und die in Kontakt mit den Zellen des angeborenen Immunsystems kommen, wird innerhalb von kürzester Zeit eine Entzündungsreaktion initiiert (Gabay, 2006). Eine „Inflammation ist die physiologische Antwort des Organismus, wenn die körperliche Integrität durch Infektionen oder Trauma gestört ist“ (Weismuller et al., 2010). Die Inflammation (lat. *inflammatio*) bzw. Entzündungsreaktion dient somit als eine Abwehrreaktion des Immunsystems und repräsentiert einen physiologischen Abwehrmechanismus vor Noxen, Infektionen und (Gewebe-) Schäden (Barton, 2008; Kanterman et al., 2012; O'Connell et al., 2012).

1.1.1. Die akute Entzündung

Die akute Entzündung tritt sehr schnell ein, innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden nach einer Verletzung oder dem Kontakt mit einem Pathogen, und hat in der Regel nur einen kurzen Verlauf. Es handelt sich somit um eine transiente und für den Organismus adaptive Reaktion im Kampf gegen Infektionen (Franceschi und Campisi, 2014). In Abhängigkeit ihrer Ausbreitung wird zwischen einer lokalen oder systemischen Entzündung differenziert.

Bei der lokalen Entzündungsreaktion handelt es sich um eine örtlich begrenzte Reaktion auf eine Gewebeschädigung, wie sie beispielsweise auftritt, wenn Bakterien oder andere Pathogene bei einer Verletzung in die Wunde eindringen. Die darauffolgende inflammatorische Antwort des angeborenen Immunsystems wird durch lokale, humorale Mediatoren (z.B. Zytokine, Antikörper,

Komplementproteine, Akute-Phase-Proteine) reguliert. So kommt es durch die Beschädigung des Gewebes und der Zellen zu einer Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Gerinnungsfaktoren, Histamin und Prostaglandin E₂, die eine Erweiterung (Vasodilatation) der Arteriolen und Kapillaren im Umkreis der Schädigung bewirken. Durch die gesteigerte Blutversorgung der Region folgt eine Rötung und Erwärmung der betroffenen Stelle. Zeitgleich werden die Blutgefäße permeabler, wodurch sie durchlässiger für Lympheflüssigkeit werden. Dies wiederum führt zur Schwellung bzw. Ödembildung der verletzten Region (Poon et al., 2015). Begleitet werden diese Vorgänge durch das Absinken der Schmerzschwelle im Entzündungsgebiet. Lokale Gewebsmakrophagen erkennen die Pathogene und nehmen sie einerseits durch Phagozytose auf und sezernieren andererseits Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, TNF- α und Chemokine. Dadurch werden zuerst vor allem neutrophile Granulozyten und etwas zeitversetzt Monozyten aus benachbarten Regionen in das infizierte Gebiet rekrutiert, um letztendlich die Pathogene sowie Zellrückstände zu beseitigen und das geschädigte Gewebe zu reparieren (Medzhitov, 2010; Ortega-Gomez et al., 2013). Die Entzündungsreaktion besteht somit insgesamt aus vier Phasen: 1. Die Detektion der Pathogene, 2. Die Rekrutierung von Zellen zum Entzündungsort, 3. Die Beseitigung der Pathogene und 4. Das Abklingen der Entzündung und somit die Wiederherstellung der Homöostase (Medzhitov, 2010). Die typischen Kennzeichen einer Entzündung wurden bereits vor 2000 Jahren von Cornelius Celsus erkannt und als die vier Kardinalssymptome definiert: *rubor* (Rötung der betroffenen Region), *calor* (Erwärmung), *tumor* (Schwellung) und *dolor* (Schmerz durch Reizung der Nervenfasern). Das heute gültige fünfte Kardinalssymptom, die *Functio laesa* (Funktionseinschränkungen der betroffenen Region), wurde 1858 von Rudolph Virchow als solches definiert (Chiu et al., 2012; Medzhitov, 2012; Sternberg, 2006). Gegenreguliert wird die proinflammatorische Antwort durch antiinflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise IL-10, IL-4 oder Glukokortikoiden. Diese verhindern durch ihre hemmende Wirkung ein Überschießen der Entzündungsreaktion (Richwine et al., 2009; Weismuller et al., 2010). Bei Störungen dieses empfindlichen Prozesses kann es zu einer sekundären Infektion oder zu einer Hyperinflammation kommen, die zur Sepsis, Schock und dem Tod führen kann (Kitchens und Thompson, 2005).

Ist die Reaktion des Organismus ausgedehnter, also nicht lokal begrenzt, so wird von einer systemischen Entzündung gesprochen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn Pathogene in die Blutbahn gelangen und sich im Organismus ausbreiten. Ein etabliertes experimentelles Modell für die akute systemische Entzündungsreaktion stellt das Lipopolysaccharid (LPS)-Modell dar, das auch im Rahmen der hier behandelten Arbeit zum Einsatz kam, und im Kontext experimenteller immunologischer Forschung, sowohl im Tier- als auch Humanmodell, von zentraler Relevanz ist (siehe Abschnitt 1.5). Ein weiteres Beispiel einer komplexen systemischen Immunreaktion zeigt sich im Rahmen der erwähnten Sepsis, welche die inflammatorische Antwort auf eine Infektion beschreibt, in deren Verlauf es zu schwerwiegenden Gewebe- und Organschäden sowie dem Tode kommen kann (Weismuller et al., 2010). Während bei der akuten Entzündung immunregulatorische Faktoren produziert und freigesetzt werden, die eine schnelle Beendigung der Immunantwort fördern, kommt es bei einer Sepsis zu einem Ungleichgewicht und zu einer überschießenden systemischen pro-inflammatorischen Immunantwort (Kitchens und Thompson, 2005).

1.1.2. Die chronische Entzündung

Kann der schädigende Reiz durch die ausgelöste akute Entzündungsreaktion nicht eliminiert und das Gewebe wieder repariert werden, so kann die akute Entzündung in eine chronische Entzündung übergehen. Dies hat meistens die Zerstörung des Gewebes bzw. eine Narbenbildung oder den Funktionsverlust des betroffenen Organs zur Folge (Gabay, 2006; Kanterman et al., 2012). In Abhängigkeit von ihrem Ursprung wird zwischen einer primären und sekundären chronischen Entzündung unterschieden. Die primäre chronische Entzündung tritt dabei ohne vorangegangene akute Entzündungsprozesse auf, wie es beispielsweise bei viralen Infektionen wie Hepatitis B oder der Autoimmunerkrankung Hashimoto Thyreoiditis (Dayan und Daniels, 1996) der Fall ist. Die sekundäre Entzündung entwickelt sich aus einer gestörten akuten Entzündung, bei der die Noxen nicht eliminiert werden konnten oder aber ein Immundefekt vorliegt. Im Allgemeinen kann eine chronische Entzündung von Wochen bis zu Jahren anhalten. Dabei unterscheidet man eine chronisch-progrediente von einer chronisch-rezidivierenden Verlaufsform. Die

chronisch-progrediente Inflammation zeichnet sich durch eine stetige Verschlimmerung der Entzündung aus. Bei der chronisch-rezidivierenden Entzündung hingegen kommt es nach dem Abklingen der Entzündung immer wieder zum Aufflammen akuter inflammatorischer Prozesse. Interessanterweise dokumentieren klinische Beobachtungen, dass Frauen häufiger unter (chronisch-) entzündlichen Krankheiten, chronischen Schmerzen und unter Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes oder der rheumatoiden Arthritis, leiden als Männer (Angele et al., 2014; Tam et al., 2011; Whitacre, 2001).

1.2. Bidirektionale Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem

Vermittelt werden diese Prozesse durch die feinabgestimmten Regulationsmechanismen der Kommunikationswege zwischen dem Immunsystem und dem zentralen Nervensystem (ZNS), welche bidirektional verlaufen (Abb.1). Das bedeutet, es gibt zum einen den afferenten Weg, welcher die Signale vom Immunsystem zum Gehirn weiterleitet, und zum anderen den efferenten Pfad, welcher die Signale vom Gehirn zum peripheren Immunsystem übermittelt (Tracey, 2009).

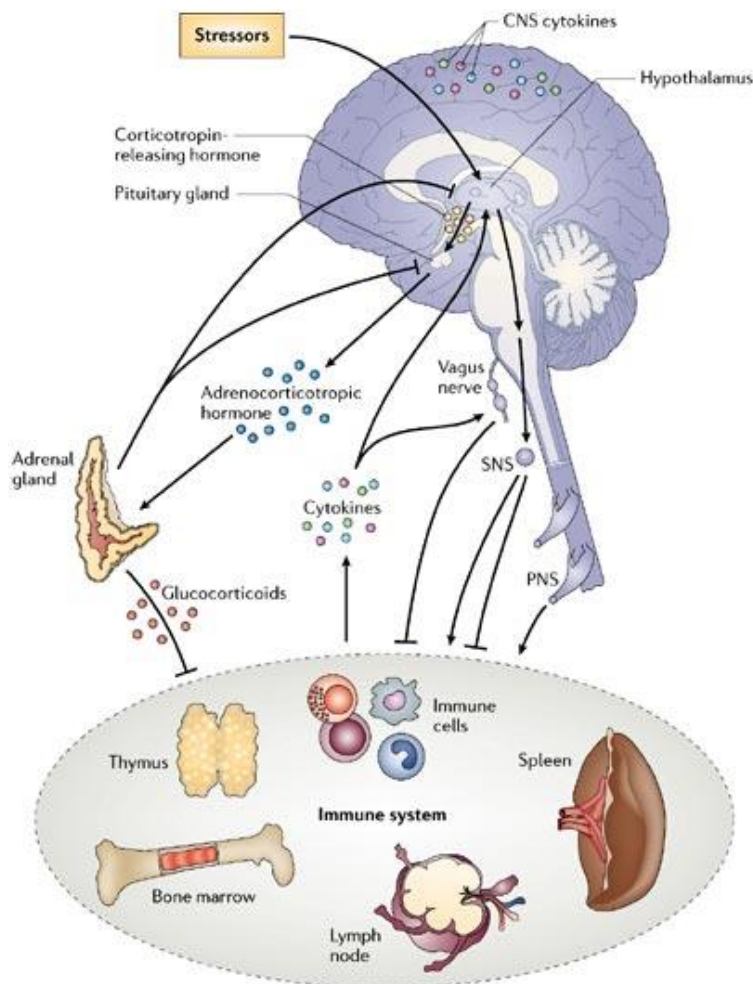


Abb. 1: Bidirektionale Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem (aus: Sternberg, 2006)

Das ZNS und das Immunsystem stehen in enger Verbindung zueinander und sind auf dem efferenten Weg durch die vegetative Innervation der lymphatischen Organe miteinander verbunden. Signale des Immunsystems werden von Strukturen des ZNS aufgenommen und weitergeleitet. Hierbei spielen vor allem der Hypothalamus, die Hypophyse und der Hirnstamm eine entscheidende Rolle. Auf afferentem Weg verläuft die Signalweiterleitung einerseits auf humoraler Ebene über beispielsweise Zytokine und andererseits auf neuronaler Ebene über die sensorischen Fasern des Vagusnervs. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse dient beiden Kommunikationswegen als Bindeglied. CNS= Zentrales Nervensystem; PNS=peripheres Nervensystem; SNS= Sympathisches Nervensystem.

Die afferente Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem ZNS findet sowohl auf einem neuronalen als auch auf einem humoralen Signalweg statt. Die neurale Signalweiterleitung wird dabei hauptsächlich durch Zytokine vermittelt (Zhang und An, 2007). So aktivieren beispielsweise lokal sezernierte Zytokine bei abdominalen und viszeralen Infektionen den Vagusnerv oder bei Infektionen des Mund- und Rachenraums den *Nervus trigeminus* (Bluthe et al., 1994; Romeo et al., 2001; Watkins et al., 1994). Vom Vagusnerv werden die Signale weitergeleitet zum *Nucleus tractus solitarius*, von wo aus die Informationen letztendlich auf verschiedene Kerngebiete des Gehirns weiterverschaltet werden. Auf humoralem Signalweg fungieren lösliche Botenstoffe, besonders die pro-inflammatorischen Zytokine, als Informationsvermittler. Hier werden verschiedene Mechanismen in der Signalweiterleitung unterschieden. Aufgrund ihrer Beschaffenheit und Größe können die im Blut zirkulierenden Zytokine die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht bzw. nur schwer überwinden. Damit die Signale des Immunsystems dennoch in das Gehirn weitergeleitet werden, können Zytokine an einigen Stellen der zirkumventrikulären Organe und des Plexus choroideus mittels Volumendiffusion in das ZNS eindringen und so die Signale übermitteln (Dantzer et al., 2008; Vitkovic et al., 2000). Ein anderer Weg in der Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem erfolgt mittels makrophagenähnlicher Immunzellen und Endothelzellen, die im Bereich der zirkumventrikulären Organe und des Plexus choroideus sitzen. Mittels ihrer speziellen Rezeptoren, den sogenannten Toll-Like Rezeptoren (TLRs), können sie auf zirkulierende Pathogene (PAMPs) reagieren. Dies hat die intrazerebrale Freisetzung von Zytokinen sowie Prostaglandinen E_2 zur Folge, wodurch das periphere Signal die BHS überwinden kann (Besedovsky und del Rey, 1996; Hopkins, 2007; Quan et al., 1998). Des Weiteren können pro-inflammatorische Zytokine mittels spezieller Zytokintransporter oder über IL-1 Rezeptoren, die sich auf den perivaskulären Makrophagen und Endothelzellen der zerebralen Ventrikel befinden, die BHS überwinden und in das Gehirn eintreten. Nicht zuletzt führt auch ein Übermaß von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie es bei einer Sepsis der Fall ist, zu einer erhöhten Permeabilität der BHS gegenüber Botenstoffen oder ganzen Zellen des peripheren Immunsystems. Durch die Aktivierung der dort residierenden Mikrogliazellen kommt es dann zur Produktion von weiteren Zytokinen und zur neuroinflammatorischen Reaktion. Auf efferentem Wege spielen die Nervenbahnen des sympathischen Nervensystems eine tragende

Rolle, da seine Fasern die lymphatischen Organe, insbesondere die Milz und die Lymphknoten, durchziehen und Signale des ZNS weiterleiten (Nance und Sanders, 2007). Ferner dienen Botenstoffe des neuroendokrinen Systems, wie Neurotransmitter und Hormone, auf humoraler Ebene zur Signalweiterleitung. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde (HPA)-Achse fungiert dabei als essentieller Schaltpunkt in der immuno-neuro-endokrinen Kommunikation (Viveros-Paredes et al., 2006). So führen die inflammatorischen Signale entzündlicher bzw. infektiöser Prozesse zu einer Aktivierung der HPA-Achse. Daraufhin bildet der Hypothalamus das Corticotropin-releasing Hormon (CRH), welches wiederum die Hypophyse zur Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) anregt. Durch das ACTH kommt es in der Nebennierenrinde zur Freisetzung von Glukokortikoiden wie dem Cortisol, welches eine immunsuppressive Wirkung besitzt. Ferner wird durch diesen Mechanismus das sympathische Nervensystem aktiviert, was zu einer Erhöhung des Katecholaminspiegels, insbesondere der Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin, führt (Eskandari et al., 2003). Wichtig zu erwähnen ist, dass all diese Prozesse durch negative Feedbackschleifen reguliert werden. So wirkt der erhöhte Cortisolspiegel hemmend auf die übergeordneten Organe, wie beispielsweise auf den Hypothalamus und die Hypophyse, um so letztendlich die eigene Synthese zu hemmen und die Cortisolkonzentration im Plasma zu regulieren. Weiterführend verfügt der Vagusnerv über eine cholinerg vermittelte Reflexantwort, die anti-inflammatorisch wirkt und auf efferentem Wege die Immunregulation ebenfalls beeinflusst (Tracey, 2009, 2010). All diese Wege beschreiben die feinabgestimmten Mechanismen der Signalweiterleitung zwischen dem Immunsystem und dem ZNS. Deren Ziel ist es, die Wirkungsweise der einzelnen Systeme zu verstärken, Infektionen zu bekämpfen und die Homöostase wiederherzustellen (Dantzer et al., 2008; Larson und Dunn, 2001; Meisel et al., 2005). Bereits kleine Ungleichgewichte in der Regulation oder Störungen in der Kommunikation der beteiligten Mechanismen haben gravierende Auswirkungen auf den Organismus und führen zu schweren Erkrankungen bzw. Krankheitsverläufen oder Autoimmunerkrankungen (Eskandari et al., 2003; Sternberg, 2006). Dabei dokumentieren Studien geschlechterspezifische Unterschiede in dem Krankheitsverlauf sowie in der Prävalenz von Krankheiten. Männer und Frauen reagieren beispielsweise auf ein und dieselbe Reizung des Organismus durch Pathogene mit unterschiedlichen Immunantworten.

1.3. Sickness Behavior

Pro-inflammatorische Zytokine, die im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion von aktivierten Immunzellen in der Peripherie freigesetzt werden, spielen nicht nur eine wichtige Rolle für die Regulation der Immunantwort, sondern induzieren über afferente Kommunikationswege ein breites Spektrum charakteristischer Verhaltens- und Stimmungsveränderungen, die unter dem Begriff Sickness Behavior zusammengefasst werden. So leiden Patienten während einer akuten Infektion nicht nur häufig unter physiologischen Veränderungen wie Fieber, Schmerzen, Schüttelfrost sowie hormonellen und metabolischen Modifikationen, sondern es zeigen sich auch eine Reihe von Verhaltensveränderungen. So sind die Abnahme von körperlicher Aktivität und Immobilisation, chronische Müdigkeit, allgemeines Unwohlsein, depressive Stimmung, gesteigertes Ängstlichkeitsempfinden, kognitive Beeinträchtigungen einhergehend mit Konzentrationsschwäche, vermindertes Interesse an sozialer Interaktion bzw. sozialer Rückzug häufige Erscheinungsbilder (Dantzer und Kelley; 2007; Dantzer et al., 2008; Poon et al., 2015; Shattuck und Muehlenbein, 2016; Wright et al., 2005). Oft werden diese Veränderungen als Begleiterscheinung einer Erkrankung bzw. Infektion gedeutet, die auftreten, weil der Organismus alle Kräfte mobilisiert, um gegen die Krankheitserreger anzukämpfen. Die beschriebenen Verhaltensveränderungen können jedoch auch ohne das Vorliegen einer realen Entzündung oder Infektion auftreten (Schedlowski et al., 2014). So belegen klinische Humanstudien, dass bereits die alleinige Verabreichung von Lipopolysacchariden oder pro-inflammatorischen Zytokinen das Sickness Behavior hervorrufen kann (Dantzer, 2001; Dantzer et al., 2008). Anhaltende, persistierende inflammatorische Reaktionen können zu einer Verschlimmerung der Symptome und zu einem ausgeprägten Sickness Behavior führen (Poon et al., 2015).

1.4. Geschlechterunterschiede in der Immunantwort

Epidemiologische Studien und klinische Beobachtungen zeigen, dass geschlechterspezifische Unterschiede Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von diversen Krankheiten haben. Dass dieser Aspekt in früheren wissenschaftlichen Studien nicht von großer Bedeutung war, wird unter anderem in der Veröffentlichung von Mogil (2012) oder in dem Review von Schedlowski et al. (2014) klar. Sie verdeutlichen, dass frühere Studien in erster Linie mit männlichen Versuchstieren und männlichen Probanden durchgeführt wurden, weibliche Versuchstiere oder Probandinnen jedoch nur in geringem Maße Beachtung fanden. Weiterführend geben Klein und Flanagan (2016) in ihrem Review einen kleinen Exkurs in die amerikanische Geschichte der Sex- und Gender-Forschung, in dem sie sich auf die Richtlinien der US Food and Drug Administration (FDA) von 1977 beziehen. In diesen Richtlinien wird ausdrücklich empfohlen, gebärfähige Frauen nicht für klinische Studien zuzulassen- mit fatalen Folgen. Jahrzehntlang wurden Frauen nicht ausreichend in der klinischen Forschung repräsentiert; so wurden Unterschiede beispielsweise in der Medikamentenverträglichkeit oder der geschlechterspezifischen Ausprägung von Krankheiten nur unzureichend dokumentiert. Das Bewusstsein für die Relevanz dieses Forschungsbereichs änderte sich erst Anfang der 90iger Jahre. Heutzutage untersuchen immer mehr Studien, wie genau sich geschlechterspezifische Besonderheiten äußern und welche Mechanismen dahinterstehen. Seitdem wurden experimentelle Tier- und Humanstudien durchgeführt, welche sich genau mit diesen Unterschieden zwischen den Geschlechtern befassen und bestätigen, dass es bedeutende Unterschiede sowohl in der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Berghöfer et al., 2006; Hannah et al., 2008; Abdullah et al., 2012; Furman et al., 2014) als auch im Erscheinungsbild von Krankheiten und deren Verlauf gibt (Fairweather 2008; Cook et al., 2011; Vom Steeg und Klein, 2016). Das angeborene Immunsystem unterscheidet sich zwischen den Geschlechtern bereits in der Zellzahl und der Zellaktivität. So ist die Anzahl der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) höher in Männern als in Frauen (Abdullah et al., 2012). Die Aktivität der Makrophagen ist hingegen im weiblichen Organismus gesteigert. Unterschiede konnten unter anderem auch in der Produktion von Zytokinen und Chemokinen sowie in der TLR Expression festgestellt werden. Als Reaktion auf eine Impfung reagiert das

angeborene Immunsystem des weiblichen Organismus beispielsweise mit einer stärkeren Expression der pro-inflammatorischen Gene und von Genen, die an der TLR-Signalweiterleitung beteiligt sind, als der männliche Organismus (Klein und Flanagan, 2016). Dokumentierte Geschlechterunterschiede in der adaptiven Immunantwort bestehen unter anderem in einer erhöhten Antikörperreaktion, einer höheren basalen Konzentration der Immunglobuline und einer höheren Anzahl von B-Zellen in Frauen (Abdullah et al., 2012; Furman et al., 2014, Klein und Flanagan, 2016). Weitere Studien liefern Belege dafür, dass es Geschlechterunterschiede in der humoralen sowie in der zellvermittelten Immunantwort gibt (Klein, 2012; Marriott und Huet-Hudson, 2006). Die Daten von experimentellen Studien mit Nagetieren, die das Ischämie-/Reperfusionssyndrom untersuchten, zeigen, dass männliche Versuchstiere mit einer weniger ausgeprägten systemischen inflammatorischen Immunantwort reagierten und weniger widerstandsfähig waren als die weiblichen Tiere. Andere Tierstudien wiederum, die sich gleichermaßen mit der systemischen Inflammation beschäftigten, dokumentieren, dass ein Mangel von androgenen Hormonen oder aber die Gabe von weiblichen Geschlechtshormonen zu einer besseren Überlebenschance der männlichen Versuchstiere geführt hat (Coyle et al., 2006). Humanstudien deuten darauf hin, dass Männer mit hormonellen Störungen bzw. einem Mangel von Androgenen eine erhöhte Sezernierung von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-2 und TNF- α , zeigen als Männer mit einem normalen Testosteronspiegel (Kalinchenko et al., 2010; Bobjer et al., 2013). Dies weist auf einen Zusammenhang zwischen dem Hormonsystem und dem inflammatorischen Abwehrsystem hin. Generell scheint es geschlechterspezifische Unterschiede in der Pathogenese und in der Prävalenz von Krankheiten zu geben. Unterstützt wird diese Vermutung durch klinische Beobachtungen, die offenlegen, dass sich zwischen Männern und Frauen gravierende Unterschiede in der Morbidität und Mortalität zeigen, welche ausgelöst wurden durch Trauma, Schock und Sepsis (Angele et al., 2014). Für Männer besteht ein erhöhtes Risiko eine Sepsis zu entwickeln und daran zu versterben (Choudhry et al., 2007; Schroder et al., 1998; Wohltmann et al., 2001). Zudem scheinen Männer im Gegensatz zu Frauen anfälliger für Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilze oder andere Parasiten zu sein und erkranken beispielsweise häufiger an Hepatitis B oder an Tuberkulose (Klein und Flanagan, 2016). Weitere Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigen sich unter anderem auch in der Pathogenese von malignen Tumoren, wobei

es Belege dafür gibt, dass Männer mit einer zweifach höheren Wahrscheinlichkeit an malignen Tumor versterben als Frauen (Cook et al., 2011). Autoimmune Erkrankungen, wie Multiple Sklerose oder das Sjögren Syndrom, oder aber (chronisch-) entzündliche Krankheiten sowie chronische Schmerzen werden im Gegensatz dazu häufiger bei Frauen diagnostiziert (Klein und Flanagan, 2016). Weiterführend besteht für Frauen ein zweifach erhöhtes Risiko an affektiven Störungen, wie Depressionen oder Angststörungen, und neuropsychiatrischen Störungen zu erkranken (Altemus et al., 2014; Bekker und van Mens-Verhulst, 2007; Kessler et al., 2005; Moieni et al., 2015). Studien dokumentieren zudem, dass affektive bzw. neuropsychiatrische Störungen bei Frauen oftmals mit einer zeitgleich stärkeren inflammatorischen Immunreaktion einhergehen (Dantzer et al., 2008; Haroon et al., 2012; Maes et al., 2012). Im Allgemeinen reagiert der weibliche Organismus mit einer stärker ausgeprägten inflammatorischen Immunantwort, in dessen Verlauf deutlich mehr pro-inflammatorische Zytokine sezerniert werden als im männlichen Organismus (Furman et al., 2014; Klein et al., 2010; Marriott und Huet-Hudson, 2006; Villacres et al., 2004). Gleichzeitig sind während einer akuten Entzündung die Konzentrationen von Entzündungsmarkern, wie beispielsweise dem C-reaktiven Protein, in Frauen höher als in Männern (Casimir et al., 2010). Klinische Befunde legen die Vermutung nahe, dass diese Mechanismen für den weiblichen Organismus einerseits einen Vorteil darstellen, da Pathogene schneller eliminiert werden, was wiederum den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst (Klein, 2012). Andererseits weisen die Daten auf einen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Vorkommen von beispielsweise affektiven Störungen bei Frauen und einer zeitgleich stärkeren inflammatorischen Immunreaktion hin (Dantzer et al., 2008; Haroon et al., 2012; Maes et al., 2012). Bisher konnte nicht geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der stärkeren Immunreaktion in Frauen und dem Auftreten von geschlechterspezifischen Unterschieden, wie die unterschiedliche Prävalenz von Erkrankungen, gibt. Ferner ist bisher unbekannt, welchen geschlechterspezifischen Einfluss neuroendokrine Mediatoren auf die inflammatorische Immunantwort haben und inwieweit sie für die beobachteten Unterschiede zwischen den Geschlechtern verantwortlich sind. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, müssen diese Faktoren experimentell in einem kontrollierten Rahmen untersucht werden. Dies ermöglichen experimentelle Modelle

systemischer Entzündung, wie es mit Endotoxinen realisiert werden kann, wie im Folgenden näher ausgeführt wird.

1.5. Experimentelle systemische Entzündung

Eine akute systemische Entzündungsreaktion lässt sich experimentell sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen durch Verabreichung von bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) induzieren (Benson et al., 2012; Schedlowski et al., 2014). Die intravenöse Gabe von gereinigtem LPS beim Menschen bietet die Möglichkeit, eine bakterielle Infektion zu simulieren und diese in definierter Stärke und in einem kontrollierbaren Rahmen zu untersuchen (Kullmann et al., 2011). Lipopolysaccharide sind komplexe Glykolipide und Bestandteile der Zellwand von gramnegativen Bakterien, wie zum Beispiel *Escherichia coli* (*E. coli*; Abb. 2). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Sepsis und anderen Infektionskrankheiten (Bahador und Cross, 2007). In Abhängigkeit von der Dosis induziert LPS eine mehr oder weniger starke, transiente Aktivierung des angeborenen Immunsystems über Toll-Like Rezeptor (TLR) 4-abhängige Signalwege (Bahador und Cross, 2007; DellaGioia und Hannestad, 2010; Schedlowski et al., 2014).

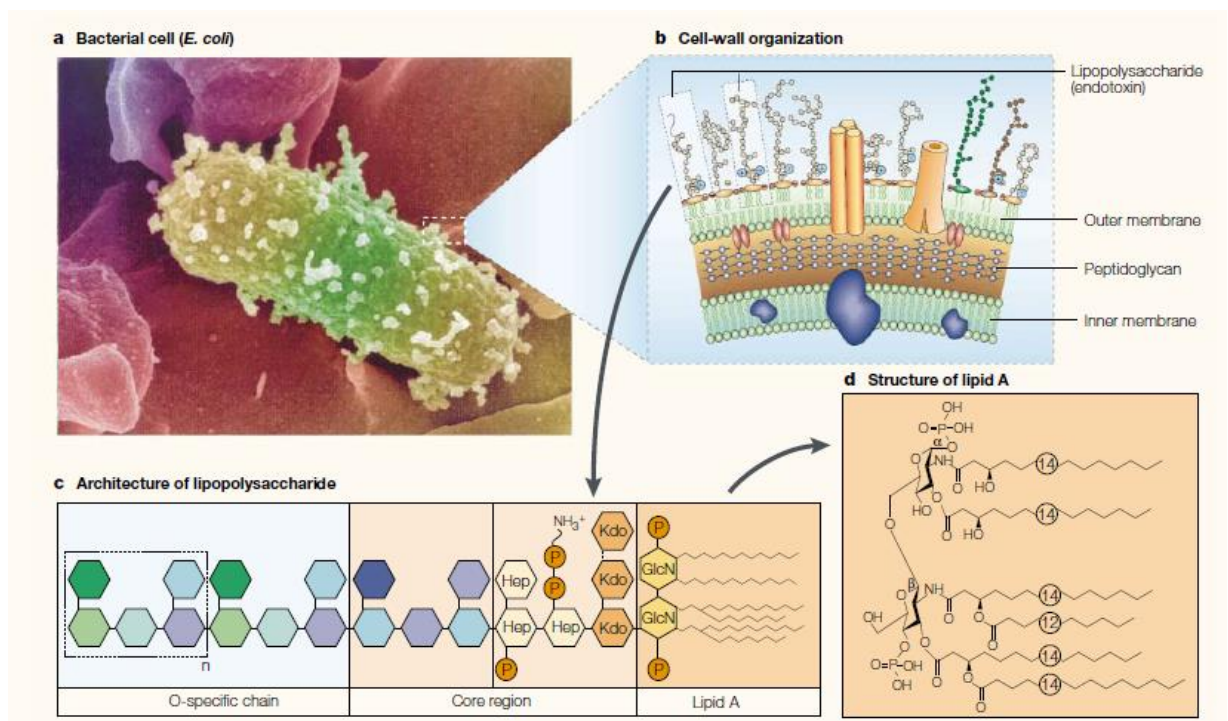


Abb. 2: Aufbau eines gramnegativen Bakteriums (aus Beutler und Rietschel, 2003)

Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* (a) sowie der schematische Aufbau der Zellwand (b). Das Lipopolysaccharid (LPS; Endotoxin) befindet sich an der äußeren Schicht der Zellwand. Der strukturelle Aufbau von LPS (c) sowie der detaillierte Aufbau von Lipid A (d), welches als Endotoxin wirkt. Hep=L-Glycerol-D-Manno-heptose; P= Phosphat; Kdo= 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure; GlcN= D-Glukosamin.

Das LPS-Modell beruht darauf, dass die Zellen des angeborenen Immunsystems hochkonservierte pathogen-assoziierte Muster (Pathogen Associates Molecular Patterns, PAMPs) von Bakterien oder Viren erkennen und als körperfremd einstufen. Da molekulare Strukturen wie Flagellin, Peptidoglykane oder bakterielle DNA normalerweise nicht im menschlichen Organismus vorkommen, werden diese schnell von speziellen Rezeptoren, den Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), erkannt und eine entsprechende Immunantwort wird ausgelöst (Lucas und Maes, 2013). Die Toll-Like Rezeptoren (TLR) stellen eine der wichtigsten Gruppen dieser PRRs dar. TLRs sind Glykoproteine, welche hauptsächlich auf der Oberfläche von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und dendritischen Zellen vorkommen. Die „Toll-Rezeptoren“ wurden zum ersten Mal in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und etwas später, Mitte der 90iger, im Menschen entdeckt und als Toll-Like-Rezeptoren bezeichnet (Lu et al., 2008). Anhand ihrer Aminosäuresequenz werden im menschlichen Organismus eine Reihe von 10 Varianten der TLRs unterschieden, die jeweils spezifisch PAMPs auf Bakterien, Parasiten, Pilzen und Nukleinsäuren erkennen (Kawai und Akira, 2010). So ist TLR 4 für das erwähnte LPS-Modell von entscheidender Bedeutung, da dieser im Zusammenspiel mit dem Serumprotein Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP), CD14 Rezeptoren und MD-2 Proteinen als spezifischer Rezeptor für LPS fungiert (Beutler und Poltorak, 2001; Kitchens und Thompson, 2005; Lu et al., 2008; Poltorak et al., 1998). Gelangt LPS in das Blut, so bildet es mit LBP einen Komplex, der zum LPS-Rezeptorprotein CD14 transferiert wird und mittels der TLR-Domäne eine regulatorische Kaskade auslöst (Abb. 3). Die Signaltransduktion kann dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen durch eine langsame TRIF (TIR domain containing adapter protein inducing IFN- β) -abhängige Induktion von Typ 1 Interferon, welche unabhängig von dem Myeloiden Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) abläuft und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Interferon-Regulierenden-Faktor 5 (IRF3), dem Nuklearfaktor-Kappa-B (NF-kB) und dem Aktivator Protein 1 (AP-1) beinhaltet. Oder zum anderen über die MyD88-abhängige Signalkaskade, welche durch die Bindung des Signaltransduktionsmoleküls MyD88 an intrazelluläre Kinasen, wie der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK), und im Zusammenspiel mit dem Adapterprotein TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor (TRAF) zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF-kB, AP-1 und IRF5, führt (Lucas und Maes, 2013). Die Aktivierung genannter

Transkriptionsfaktoren induziert letztendlich die Expression von Genen für pro-inflammatorische Zytokine wie, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6, was die akute Entzündungsreaktion auslöst (Lu et al., 2008).

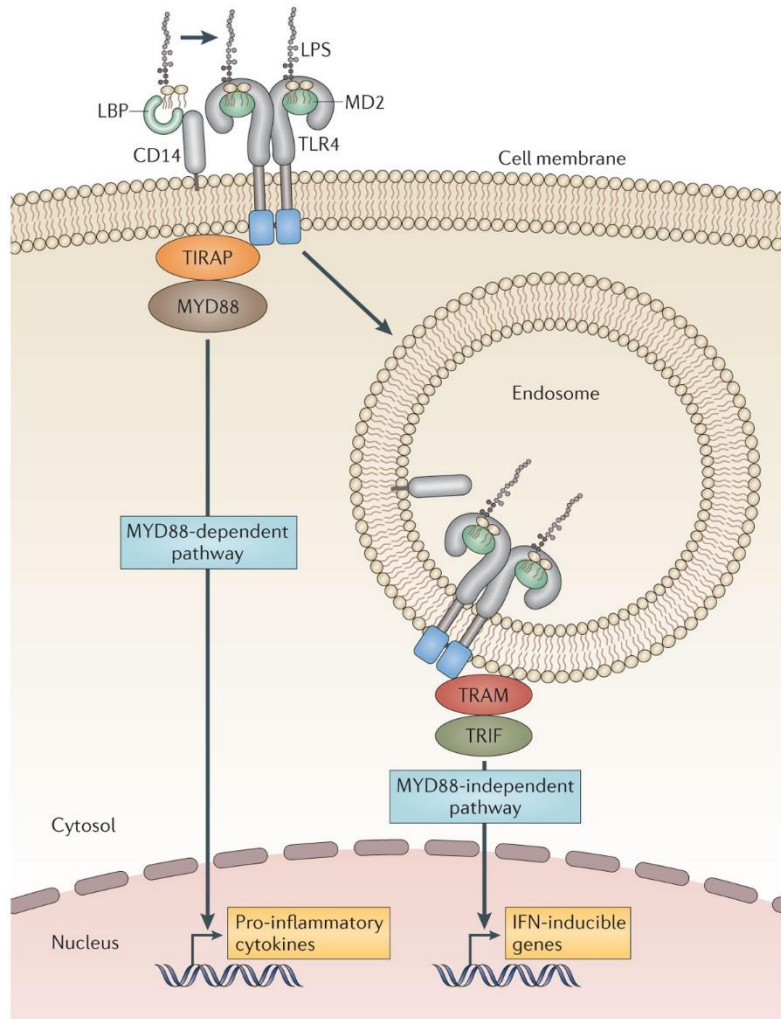


Abb. 3: LPS Signalwege (aus Needham und Trent, 2013)

Das Serumprotein LBP bindet das zirkulierende LPS und transportiert es zu CD14 Rezeptoren, von wo es zu den TLR 4-MD2-Rezeptoren transferiert wird. Die LPS-Signalverarbeitung erfolgt nun auf zwei unterschiedlichen Wegen durch die Bindung des Lipid A an den TLR 4-MD2-Komplex: Ein Weg erfolgt über einen MyD88-abhängigen Signalweg, der zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Ein anderer Weg erfolgt über eine TRIF-abhängige Signalweiterleitung, welche zu einer erhöhten Expression von Interferon induzierten Genen führt. LBP= Lipopolysaccharid-bindendes-Protein; LPS= Lipopolysaccharid; MyD88= Myeloider Differenzierungsfaktor 88; TLR 4= Toll-Like Rezeptor 4.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Experimentelle Studien und klinische Beobachtungen belegen, dass es nicht nur in der Prävalenz von Erkrankungen geschlechterspezifische Unterschiede gibt, sondern auch in der humoralen sowie in der zellvermittelten Immunantwort. So reagiert der weibliche Organismus infolge einer bakteriellen oder viralen Infektion beispielsweise mit einer stärkeren angeborenen Immunantwort sowie einer stärkeren Entzündungsreaktion als der männliche Organismus. Experimentell lässt sich eine transiente systemische Entzündungsreaktion durch die *in vivo* Injektion von bakteriellem Endotoxin induzieren. Dabei spielen pro-inflammatorische Zytokine eine wesentliche Rolle. Sie steuern einerseits die lokale und die systemische Immunantwort, andererseits üben sie Einfluss auf das ZNS aus und modulieren Verhaltensprozesse sowie neuroendokrine und metabolische Veränderungen. Der Begriff Sickness Behavior fasst die Gesamtheit der Verhaltens- und Stimmungsveränderungen zusammen, welche durch Zytokine hervorgerufen werden. Persistierende Entzündungsreaktionen können zu einem stark ausgeprägten Sickness Behavior führen und gehen oftmals mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen, neuropsychiatrischen oder affektiven Störungen einher. Da die Prävalenz dieser Erkrankungen in Frauen höher ist als in Männern, wird vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von geschlechterspezifischen Unterschieden in den Krankheitsbildern und der stärker ausgeprägten pro-inflammatorischen Reaktion des weiblichen Immunsystems gibt. Es ist unklar, ob die Geschlechterunterschiede in der inflammatorischen Reaktion des Immunsystems gleichzeitig Einfluss auf das Sickness Behavior haben und ob sich dabei ebenfalls Unterschiede zwischen Männern und Frauen beobachten lassen. Es gibt nur wenige experimentelle Studien, die sich mit der inflammatorischen Reaktion auf bakterielles Endotoxin sowie mit Unterschieden im Sickness Behavior in Bezug auf das Geschlecht befassen haben. Der Großteil der Studien wurden nur mit Männern durchgeführt und liefert somit keine Belege für Unterschiede zwischen der weiblichen und der männlichen Reaktion. Weiterführend wurden wichtige Parameter der anti-inflammatorischen Immunantwort, wie Zytokine und neuroendokrine Mediatoren und deren Einfluss auf Geschlechterunterschiede, nicht näher betrachtet. Zudem gibt es kaum Studien, die die Immunreaktion auf das Endotoxin auf systemischer und auf zellulärer Ebene einerseits intraindividuell und

andererseits interindividuell zwischen den Geschlechtern untersuchten. Basierend auf der Literaturlage lautet die erste Hypothese, dass die erhöhte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen des weiblichen Organismus während einer akuten systemischen Entzündungsreaktion zeitgleich mit einem stärker ausgeprägten Sickness Behavior einhergeht und Frauen dementsprechend schwerere Symptome des Sickness Behavior zeigen. Dazu soll eine akute systemische Immunreaktion mithilfe von niedrig dosiertem Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS, 0,4 ng/ kg Körpergewicht) in gesunden Männern und Frauen induziert und geschlechterspezifische Unterschiede in den durch Zytokine vermittelten physiologischen und psychologischen Immunantworten *in vivo* untersucht werden. Die zweite Hypothese dieser Arbeit lautet, dass Frauen infolge der stärker ausgeprägten inflammatorischen Reaktion gleichzeitig eine stärkere Aktivierung des neuroendokrinen Systems, welches an der inflammatorischen Regulation beteiligt ist, zeigen als Männer und es so zu Unterschieden zwischen den Geschlechtern kommt. Dazu sollen die Mediatoren Noradrenalin (NA), Cortisol (CORT), Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Prolaktin (PRL) während der akuten systemischen Entzündungsreaktion *in vivo* analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung der beobachteten Geschlechterunterschiede in der Immunantwort könnte bereits auf Zellebene existieren. Daher lautet die dritte Hypothese dieser Arbeit, dass bereits auf Zellebene messbare Geschlechterunterschiede existieren und die Immunzellen von Männern und Frauen *ex vivo* Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber glukokortikoiden und adrenergen Rezeptor-Agonisten zeigen. Dazu sollen heparinisierte Vollblut-Proben von Männern und Frauen mit LPS stimuliert und *ex vivo* getestet werden, wie sich verschiedene Konzentrationen des glukokortikoiden Rezeptor-Agonisten Dexamethason sowie des β -adrenergen Rezeptor-Agonisten Terbutalin auf die Zytokinproduktion von TNF- α , IL-6 und IL-10 auswirken.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Effekte einer akuten systemischen Entzündungsreaktion auf Geschlechterunterschiede in der inflammatorischen und neuroendokrinen Reaktion sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* zu untersuchen, um so den Einfluss der systemischen und zellulären Parameter auf Geschlechterunterschiede in der inflammatorischen Immunantwort zu analysieren. Mit Hilfe der durch diese Arbeit gewonnenen Befunde soll ein besseres Verständnis

für die geschlechterspezifischen Unterschiede in der akuten systemischen Entzündungsreaktion im Hinblick auf inflammatorische und neuroendokrine Reaktionen gewonnen werden, um diese beispielsweise für therapeutische Zwecke sinnvoll zu nutzen.

2. Material und Methoden

2.1. Probanden

2.1.1. Probandensicherheit und Ethik

Der Studienplan wurde vorab der Ethik-Kommission der Universität Duisburg-Essen vorgelegt und auf ethische sowie rechtliche Vertretbarkeit geprüft und genehmigt (Zulassungsnummer: 09-4271). Alle Probanden wurden im Vorfeld mündlich und schriftlich über das Studienprotokoll aufgeklärt. Dabei wurden mögliche Risiken einer Teilnahme dargestellt. Zudem bestand ein umfassender Versicherungsschutz für alle Probanden während der Studienteilnahme sowohl durch eine Probanden- als auch eine Wegeunfallversicherung. Vor Beginn des ersten Studientages unterzeichneten alle Probanden eine Einverständniserklärung, mit der sie bestätigten, freiwillig an der Studie teilzunehmen und genauestens über den Ablauf der Studie, über mögliche Risiken einer Teilnahme und über den Versicherungsschutz aufgeklärt worden zu sein. Die Durchführung der Studie fand in notfallmedizinisch ausgestatteten Räumen und in Anwesenheit eines auf dem Gebiet der Notfallmedizin geschulten Arztes statt.

2.1.2. Probandenrekrutierung und Ein- und Ausschlusskriterien

Für die vorliegende Arbeit wurden gesunde Männer und Frauen im Alter von 18 bis 53 Jahren rekrutiert. Die Rekrutierung der Versuchspersonen erfolgte mittels Aushängen an der Universitätsklinik in Essen und an den umliegenden Universitäten. Ferner wurde eine Anzeige auf der institutseigenen Homepage geschaltet. Jeder Proband bzw. jede Probandin wurde zuerst telefonisch kontaktiert, um einen kurzen Einblick in die jeweilige Studie zu erhalten und um vorab die bestehenden Ein- und Ausschlusskriterien abzuklären. Im zweiten Schritt erfolgte circa eine Woche vor der Studienteilnahme vor Ort ein ausführliches Aufklärungsgespräch sowie ein ärztliches Gespräch mit anschließender internistischer Voruntersuchung und Blutanalyse durch den Studienarzt. Hierbei wurde eine ausführliche Anamnese mittels standardisiertem Fragebogen erhoben sowie die Vitalwerte (Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur) gemessen. Um die wichtigsten Laborparameter zu ermitteln, erfolgte eine Bestimmung

entnommener Blutproben auf folgende Parameter: Serum-Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid), Nierenretentionsparameter (Kreatinin und Harnstoff im Serum), Leberenzyme (GOT, GPT, GGT, Bilirubin), C-reaktives Protein (CRP), ein kleines Blutbild und Gerinnungsparameter (TPZ, INR, aPTT). Um akute entzündliche Prozesse auszuschließen, wurde 48 Stunden vor jedem Studientag erneut der CRP-Wert bestimmt. Potentielle Nachwirkungen der intravenösen LPS-Injektion wurden nach 24 Stunden sowie eine Woche nach der Endotoxin-Gabe, im Rahmen einer weiteren umfassenden körperlichen Nachuntersuchung und Ermittlung der wichtigsten Laborparameter, erfasst. Für die Probandinnen war es für eine Studienteilnahme verpflichtend, hormonell zu verhüten. Die Ausschlusskriterien bestanden in einem *body mass index* (BMI) unter 18 oder über bzw. gleich 29 kg/m², einer Schwangerschaft, dem regelmäßigen Konsum von Nikotin (Raucher), der regelmäßigen Einnahme von Medikamenten, psychiatrischen oder neurologischen Vorerkrankungen, Geschichte oder Anzeichen von gastrointestinalen, kardiovaskulären, hämatologischen Erkrankungen, Leber- und Nierenerkrankungen, immunologischen Störungen, obstruktiven Atemwegserkrankungen oder Suchterkrankungen (Rauchen und Alkoholkonsum über viermal pro Woche), Diabetes mellitus oder anderen Stoffwechselstörungen sowie schweren oder zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomatischen Allergien. Akute organische oder funktionelle gastrointestinale Erkrankungen wurden mittels eines standardisierten Fragebogens (Symptomcheckliste für Magen- und Darmbeschwerden) ausgeschlossen, welcher während des Aufklärungsgesprächs von den Probanden ausgefüllt wurde. Mithilfe der *Hospital Anxiety and Depression Scale* (HADS) konnten Depressionen und Angststörungen ausgeschlossen werden. Bei dem HADS handelt es sich um einen validierten Screening-Fragebogen zur Selbstbeurteilung von depressiven und ängstlichen Symptomen anhand von 14 Items. Werte über einer Gesamtpunktzahl von 11 Punkten pro Skala führten zum Ausschluss von der Studie. Zusätzlich führten Abweichungen der Gerinnungsparameter, Serum-Elektrolyte, Nierenretentionsparameter, Leberenzyme oder des C-reaktiven Proteins als Hinweis einer Pathologie zum Ausschluss. Weitergehend sollten die Probanden in den letzten drei Monaten weder Blut gespendet noch an einer klinisch-pharmakologischen Studie teilgenommen haben. Eine vorherige intravenöse Verabreichung von Endotoxin führte ebenfalls zum Ausschluss.

2.2. Studiendesign

Es handelt sich um eine randomisierte, doppelblinde Studie, in der eine systemische Immunaktivierung mithilfe von Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS, 0,4 ng/kg Körpergewicht) in gesunden Männern und Frauen induziert wurde. Zum einen wurde der Einfluss von LPS auf immunologische und neuroendokrine Parameter im Geschlechtervergleich *in vivo* untersucht, zum anderen wurden *ex vivo* zelluläre Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Glukokortikoid- und Adrenozeptor-Agonisten analysiert. Die Daten der in dieser Arbeit beschriebenen Probanden und Probandinnen sind eine Teilstichprobe mit erweiterten Messparametern aus einer größer angelegten Studie, welche aus einem Placebo- und einem LPS-Arm bestand (Wegner et al., 2015). Da in der genannten Studie für keinen der untersuchten Parameter Veränderungen unter Placebo beobachtet wurden und der Fokus der vorliegenden Arbeit auf Geschlechterunterschieden in der inflammatorischen und neuroendokrinen Antwort unter LPS lag, wurde die Placebo-Bedingung hier nicht weiter untersucht.

Die rekrutierten Männer und Frauen wurden zu zwei identisch verlaufenden Studientagen einbestellt, welche mit einem Zeitabstand von fünf bis sieben Tagen stattfanden. Jeder Proband erhielt in randomisierter Reihenfolge an einem Studientag das LPS und an dem anderen Studientag das Placebo (physiologische Saline) intravenös verabreicht. Zu Beginn jedes Studientages wurde den Probanden ein peripherer Venenverweilkatheter (VASOFIX® Braunüle® 18G 45 mm grün) zur Injektion des LPS sowie zur Blutentnahme in die Unterarmvene gelegt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Vitalparameter (Körpertemperatur, Blutdruck und Puls) und das Ausfüllen der Fragebögen. Nach einer kurzen Ruhephase von 30 Minuten wurde Blut für die Bestimmung der Laborparameter und für ein großes Blutbild in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Blutproben wurden 15 Minuten vor der LPS-Injektion abgenommen und der Zeitpunkt als Baseline definiert. Die Injektion des LPS erfolgte an den Studientagen zwischen 9 und 11 Uhr vormittags, bei jedem Probanden jedoch immer zur exakt gleichen Uhrzeit. Weitere Blutentnahmen und die Bestimmung der Vitalwerte erfolgten 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden nach der Injektion. Die abgenommenen Blutproben wurden direkt zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die so gewonnenen Plasmaproben wurden für spätere Analysen bei -80 °C eingefroren.

Studie 1 (in vivo):

Als immunologische Parameter wurden die Plasmakonzentrationen von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-1 Rezeptor-Agonist (IL-1ra) und dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.5.). Die Plasmakonzentrationen des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) sowie die Konzentration des löslichen sCD14 wurden mit gleicher Technik ermittelt. Die Analysen der neuroendokrinen Parameter umfassten die Quantifizierung der Konzentrationen von Noradrenalin (NA), Cortisol (CORT), Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Prolaktin (PRL) mit Hilfe der ELISA-Technik (siehe Abschnitt 2.4.6.). Um auftretende Symptome des Sickness Behaviors zu dokumentieren, wurden die Zustandsangst mit Hilfe des State-Fragebogens des *State-Trait Anxiety Inventory* (STAI State), die Stimmung mittels des Mehrdimensionalen Befindlichkeits-Fragebogen (MDBF) sowie das allgemeine Krankheitsempfinden mittels des *Generic Assessment of Side Effects* (GASE) zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt (2.5).

Studie 2 (ex vivo):

Heparinisierte Vollblut-Proben wurden mit LPS stimuliert und *ex vivo* auf geschlechtsspezifische zelluläre Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber synthetischen Glukokortikoid- und Adrenozeptor-Agonisten untersucht. Hierzu wurde getestet, welchen Effekt verschiedene Dexamethason bzw. Terbutalin auf die Zytokinproduktion von TNF- α , IL-6 und IL-10 durch mit LPS-stimulierte Monozyten im Vollblut haben (siehe Abschnitt 2.4.7.).

2.3. Endotoxin

2.3.1. Aufbereitung und Verabreichung des Endotoxins

10.000 EU Endotoxin (lyophilisiertes Reference Standard Endotoxin aus *Escherichia coli*, Serotyp O113:H10:K-negative, Lot H0K345, United States Pharmacopeia Convention Inc., Rockville, MD, USA) wurde in 5 ml steriler NaCl-Lösung (Braun, Melsungen) gelöst, 30 Minuten gemischt und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm –Sterilfilter). Aliquots des so aufbereiteten Endotoxins wurden in sterilen endotoxin-freien Borosilikatglasröhrchen bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Eine Probe wurde vor Studienbeginn durch die Abteilung Mikrobielle Sicherheit des Paul-Ehrlich-Instituts (Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneistoffe) in Langen auf mikrobielle Kontaminationen geprüft sowie der exakte Endotoxingehalt analysiert.

Die eingefrorenen Aliquots (Konzentration von circa 200 ng/ml) wurden erst kurz vor Gebrauch in entsprechender Menge aufgetaut und mit sterilem Wasser auf eine Endkonzentration von 16 ng/ml verdünnt. Die Menge an LPS wurde in Abhängigkeit vom jeweiligen Körpergewicht der Probanden berechnet, was eine genaue Dosis von 0,4 ng/kg Körpergewicht ermöglichte. Somit wurden pro kg Körpergewicht 0,025 ml verdünnte Endotoxin-Lösung verabreicht. Die Verabreichung der Injektion erfolgte intravenös mittels des zuvor gelegten Venenkatheters und wurde immer vom Studienarzt durchgeführt.

2.4. Labormethoden

2.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Bei dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) handelt es sich um ein Immunassay Verfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion und der Interaktion von Antigen und Antikörper beruht. Es wird zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen, Viren, niedermolekularen Verbindungen, wie zum Beispiel von Hormonen und Toxinen, in einer Probe genutzt. In der zu untersuchenden Probe kommt es dabei zu einer spezifischen Bindung des Antigens (dem nachzuweisenden Molekül) mit einem spezifischen Reaktionspartner (primärer Antikörper). Dieser ist wiederum an einem festen Träger (dem Boden der Mikrotiterplatte) fixiert. Die Zugabe eines markierten, mit Enzym gekoppelten, spezifischen sekundären Antikörpers führt zur Bindung an den primären Antikörper. Dies hat eine Farbreaktion und einen Farbumschlag zur Folge. Die Stärke der Farbreaktion ist abhängig von der Protein- bzw. Hormonkonzentration in der Probe. Im Anschluss wird die optische Dichte (OD) photometrisch bestimmt. Je höher die Antigenkonzentration ist, desto stärker fällt die Farbreaktion aus.

2.4.2. Klinische Laborparameter

Natrium, Kalium, Chlorid, Kreatinin und Harnstoff im Serum, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Bilirubin, Thromboplastinzeit (TPZ), *international normalized ratio* (INR), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und ein kleines Blutbild sowie der CRP-Wert wurden vom Zentrallabor der Universitätsklinik Essen gemessen.

2.4.3. Blutbild

Um ein Blutbild einschließlich der weißen Blutkörperchen und die Anteile der Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu erhalten, wurde zu jedem Zeitpunkt jeweils eine EDTA-Blutprobe mittels eines automatischen Hämatologiesystems (Sysmex KX-21N, Norderstedt, Deutschland) im institutseigenen Labor analysiert.

2.4.4. LBP und sCD14

Die Plasmakonzentration von Lipopolysaccharid-bindenden Proteinen (LBP; Human LBP ELISA, Abnova, Taipei City, Taiwan) und des löslichen CD14 (Human sCD14 Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wurde mittels eines handelsüblichen ELISA nach bekannter Methode analysiert. Die Sensitivität des LBP-ELISA betrug dabei 1,5 ng/ml und 125 pg/ml für den sCD14-ELISA. Alle Kits wurden entsprechend des Hersteller Protokolls verwendet.

2.4.5. Zytokinanalysen

Die Plasmakonzentrationen von TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-1ra wurden ebenfalls mit Hilfe des ELISAs (Quantikine® ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ermittelt. Die Sensitivität der Assays lag bei 0,11 pg/ml für TNF- α ; 0,70 pg/ml für IL-6; 0,09 pg/ml für IL-10, und 6,3 pg/ml für IL-1ra. Sämtliche Proben eines Probanden wurden auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen und gemessen.

2.4.6. Neuroendokrine Parameter

Die Plasmakonzentrationen von Noradrenalin (NA), Cortisol (CORT), Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Prolaktin (PRL) wurden mittels ELISA gemessen (Fast Track Noradrenaline ELISA, LDN Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Deutschland bzw. Cortisol ELISA, DHEA ELISA und Prolaktin ELISA, IBL International, Hamburg, Deutschland). Die Sensitivität betrug 50 pg/ml für NA, 0,08 ng/ml für CORT, 0,11 ng/ml für DHEA und 0,35 ng/ml für PRL, wobei die Kreuzreaktivität mit anderen Katecholaminen und deren Metaboliten bei <0,5 % lag. Die Plasmakonzentrationen von Cortisol (CORT), Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Prolaktin (PRL) wurden mit Hilfe des ELISA Verfahrens bestimmt. Die Kreuzreaktivität des anti-CORT Antikörpers mit anderen Stereoiden lag bei 7,0 % (11-deoxycortisol), 4,2 % (Cortison), 1,4 % (Corticosteron), 0,35 % (Progesterone) und bei <0,01 % (Estron, Estradiol, Estriol, Testosteron). Kreuzaktivitäten des anti-DHEA Antikörpers mit anderen relevanten Stereoiden, wie zum Beispiel DHEA-S, Androstenedion, Cortisol, Corticosteron, Progesteron, Estron, Estradiol, Estriol,

Testosteron, lagen bei <0,1 %. Alle Proben eines Probanden wurden auf derselben Mikrotiterplatte aufgetragen und gemessen.

2.4.7. Vollblutstimulation

Das venöse Blut der Probanden wurde in heparinisierten Röhrchen gesammelt (Sarstedt Monovette, Li- Heparin, 9ml) und im Labor 1:10 mit Kulturmedium (450 ml RPMI 1640 + 50 ml fetales Kälberserum + 500 µl Gentamicin (50 mg/ml)) verdünnt. Jeweils 3 ml heparinisiertes Blut wurden mit 12 ml vorgewärmtem RPMI-10 verdünnt. Im Anschluss wurde das verdünnte Blut auf Mikrotiterplatten im 96-well Standardformat mit flachem Boden mit 50 µl LPS (25 ng/ml; Lipopolysaccharid, *E.coli* O55:B5; Sigma L-6529; in Dulbecco`s PBS w/o Ca, Mg; gelagert bei -20°C) stimuliert. Um die β -adrenerge Modulation der Zytokinfreisetzung zu analysieren, wurde das Blut zudem mit verschiedenen Konzentrationen des β_2 -adrenergen Rezeptor-Agonisten Terbutalin (TERB; Sigma T-2528, MW 274.32; 1 M= 274.3 g/l, Aldrich, Steinheim, Deutschland) kultiviert. Hierzu wurde zuvor eine serielle Verdünnungsreihe (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) angelegt und jeweils 50 µl des jeweiligen Agonisten in der entsprechenden Verdünnung hinzugefügt. Zur Bestimmung der Glukokortikoid-Sensitivität wurde nach gleichem Protokoll eine Verdünnungsreihe mit Dexamethason angelegt und das Blut entsprechend mit verschiedenen Dexamethason Konzentrationen (DEX; Sigma D-8893, MW 392.46; 1 M = 392.5 g/l, Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Die Proben wurden für 24 Stunden bei 37 °C und bei 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die abgenommenen Überstände wurden bis zur Konzentrationsbestimmung von TNF- α , IL-6 und IL-10 bei -80 °C eingefroren. Die Analysen der Zytokinkonzentrationen erfolgten nach bekanntem Protokoll mittels ELISA-Methodik.

2.5. Fragebögen

2.5.1. Soziodemographischer Fragebogen

Der soziodemographische Fragebogen dient zur Erfassung von sozialen und demographischen Faktoren wie Alter, Familienstand und Bildungsniveau der Probanden. Zudem wird nach ihrer Größe, dem Gewicht und nach einer subjektiven Beurteilung ihres Gesundheitszustandes gefragt. Der Fragebogen wurde den Probanden während des Aufklärungsgesprächs ausgehändigt und zuhause ausgefüllt.

2.5.2. *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)*

Der HADS ist eine validierte Screeningmethode, die sowohl in der Klinik als auch in der Forschung Anwendung findet und zur Erfassung von Angst und Depressivität von Patienten bzw. Probanden dient (Zigmond und Snaith, 1983). Mittels Selbstbeurteilung wird einerseits die Ausprägung der ängstlichen und andererseits der depressiven Symptomatik der vergangenen Woche anhand von zwei Subskalen, einer Angst- und einer Depressionsskala mit je sieben Fragen zu je vier Antwortmöglichkeiten, erfasst. Jede Frage kann mit einer Skala von „voll zutreffend“ bis hin zu „gar nicht zutreffend“ bewertet werden. Versteckte Symptome, die den Probanden oft selbst nicht bekannt sind bzw. unterdrückt werden, lassen sich so zuverlässig aufdecken. Zur Auswertung des HADS dient eine Kodierung, welche jeder Antwortmöglichkeit einen Punktwert von 0 bis 3 zuordnet. Durch die Addition der Itemwerte jeder Subskala wird je ein Gesamtpunktwert für die Angst- und einer für die Depressionsskala erhalten. Ergebnisse bis 7 Punkte repräsentieren kein auffälliges Ergebnis, Punkte zwischen 8 und 10 weisen auf eine leichte Auffälligkeit hin und Punktwerte ab 11 sind ein Indiz für das Vorliegen einer Angststörung bzw. Depression. Probanden mit einem Gesamtpunktwert von 11 oder höher wurden von der Studie im Vorfeld ausgeschlossen.

2.5.3. State-Trait Anxiety Inventory (STAI)

Der *State-Trait Anxiety Inventory* (STAI) ist eine validierte Messmethode nach Spielberger (Spielberger et al., 1970), die in der Forschung und klinischen Praxis eingesetzt wird und auf einer Differenzierung von Angst als Zustand (State-Angst) und Angst als Eigenschaft (Trait-Angst) beruht. Die hier zur Anwendung gekommene deutsche Version des *State-Trait Anxiety Inventory* umfasst 2 mal 20 Items, bei denen es sich um zwei voneinander unabhängige Selbstbeschreibungsskalen handelt. Die State-Angst bezieht sich hierbei auf die momentane Stimmung des Probanden und wird anhand von 20 Feststellungen ermittelt, die sich auf „diesen Moment“ beziehen. Dabei sind 10 der Feststellungen mit einer ängstlichen, negativen Tendenz formuliert ("Ich bin beunruhigt"), die anderen 10 Items positiv bzw. angstfrei ("Ich bin entspannt"). Zur Bewertung jeder Frage dient eine vierstufige Likert-Skala mit den Antwortmöglichkeiten „Überhaupt nicht“, „Ein wenig“, „Ziemlich“, „Sehr“. Die Trait-Angst wird als eine den Moment überdauernde Angst bzw. als relativ überdauerndes Persönlichkeitsmerkmal angesehen. Die Skala umfasst 20 Feststellungen, die den allgemeinen Gefühlszustand repräsentieren sollen. 13 Feststellungen sind in Richtung Angst negativ formuliert ("Ich glaube, dass mir meine Schwierigkeiten über den Kopf wachsen"), die anderen positiv, angstfrei („Ich bin ausgeglichen“). Zur Bewertung jeder Frage dient auch hier eine vierstufige Likert-Skala mit den Antwortmöglichkeiten „fast nie“, „manchmal“, „oft“, „fast immer“. Die Auswertung erfolgt mittels Kodierung durch die Addition der einzelnen Itemwerte, wobei höhere Summenwerte ein ausgeprägtes Angstepfinden widerspiegeln. Die Zustandsangst wurde zur Baseline sowie zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden nach der Injektion erfasst. Um die Trait-Angst zu ermitteln, wurde der Fragebogen von den Probanden vorab zuhause ausgefüllt.

2.5.4. Mehrdimensionaler Befindlichkeits-Fragebogen (MDBF)

Die aktuelle Befindlichkeit wurde mittels des validierten Mehrdimensionalen Befindlichkeits-Fragebogen (MDBF) erfasst. Der Selbstbeurteilungsbogen liegt in verschiedenen Versionen vor (Steyer et al., 1997), wobei in dieser Arbeit die Kurzform A verwendet wurde. Er besteht aus 12 Items, die mittels einer fünfstufigen Skala von 1 („überhaupt nicht“) bis 5 („sehr“) bewertet werden können. Die Probanden sollen dabei bewerten, inwieweit die Feststellung auf sie selbst und ihre momentane Stimmung zutrifft. Die 12 Items unterteilen sich in drei Subskalen: gute vs. schlechte Stimmung (Stimmung), Wachheit vs. Müdigkeit (Wachheit) und Ruhe vs. Unruhe (Gelassenheit). Die Auswertung erfolgt mittels Kodierung durch die Addition der einzelnen Itemwerte. Höhere Summenwerte repräsentieren positive Befindlichkeitszustände bzw. eine positive Stimmungslage, niedrige Werte implizieren einen negativen Befindlichkeitszustand. Die aktuellen Stimmungsparameter wurden zur Baseline sowie zum Zeitpunkt 3 und 6 Stunden nach der Injektion erfasst.

2.5.5. *Generic Assessment of Side Effects* (GASE)

Der Fragebogen *Generic Assessment of Side Effects* (GASE) wird in der klinischen Forschung als eine validierte Methode zur Erfassung von Nebenwirkungen, zum Beispiel eines Medikaments genutzt. In dieser Arbeit wurde das Spektrum der nichtspezifisch auf die Endotoxin-Injektion zurückzuführenden Krankheitssymptome bzw. Nebenwirkungen mithilfe einer adaptierten Version des Fragebogens GASE (Rief et al., 2011) ermittelt. Die Probanden bewerteten retrospektiv 6 und 24 Stunden nach Injektion von LPS oder Placebo die Intensität von 26 unterschiedlichen Krankheitssymptomen, die im Zusammenhang mit LPS stehen (z.B.: Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwitzen) von 0 („nicht aufgetreten“) bis 3 („schwer“). Weitergehend sollten sie bewerten, ob sie diese Beschwerden auf die Verabreichung des LPS zurückführen oder ob die Beschwerden unabhängig von der Injektion auftreten. Die Auswertung erfolgte durch Addition der einzelnen Werte.

2.6. Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS 22.0 (Software IBM® SPSS® Statistics for MS-Windows Version 22.0.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Erstellung aller Abbildungen erfolgte unter Verwendung des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Falls nötig, wurden nicht normalverteilte Daten, wie zum Beispiel Zytokindaten, logarithmiert. Die Analysen der soziodemographischen, physiologischen und klinischen Daten der Männer und Frauen erfolgten mittels T-Test für unabhängige Stichproben oder dem Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test). Das Signifikanzniveau wurde in allen Tests auf einen p-Wert von $<0,05$ festgelegt. Behaviorale und physiologische Parameter im zeitlichen Verlauf wurden mittels messwiederholter Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) mit „Geschlecht“ als Zwischensubjekt-Faktor und „Zeit“ als Innersubjekt-Faktor analysiert. Bei Verletzung der Sphärizität wurde eine Korrektur nach Greenhouse-Geisser vorgenommen. Im Falle einer signifikanten Geschlecht x Zeit Interaktion wurden unabhängige T-Tests gerechnet, um Männer und Frauen zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander zu vergleichen. Um Zusammenhänge zwischen Parametern zu untersuchen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die Daten sind jeweils als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die *area under the curve with respect to ground* (AUC_G) im Zeitraum von 0 bis 6 Stunden nach der Injektion wurde mittels der Trapez-Flächen-Formel nach Pruessner et al. (2003) berechnet. Die Bewertung der einzelnen Items der Fragebögen wurde mittels Bonferroni-Korrektur und Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Studie 1 (*in vivo*)

3.1.1. Soziodemographische und psychologische Daten

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden aus der Gesamtstichprobe insgesamt 28 gesunde Männer und Frauen (14 Männer, 14 Frauen) mit einem Altersdurchschnitt von $27,3 \pm 0,9$ Jahren (Altersbereich 22-41) eingeschlossen. Die Männer und Frauen zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem Alter und BMI oder in den psychologischen Variablen (HADS und STAI-Trait). Gemäß der Ein-/Ausschlusskriterien verwendeten alle Probandinnen eine hormonelle Verhütungsmethode (Tab. 1).

Tabelle 1: Soziodemographische Daten der ersten Probandengruppe

Variable	Männer (n=14)	Frauen (n=14)	p
Alter (Jahre)	26,4 ± 0,9	28,1 ± 1,6	0,37
BMI (kg/m ²)	23,9 ± 0,7	22,8 ± 0,7	0,27
HADS Depression (score)	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,48
HADS Angst (score)	1,8 ± 0,6	2,4 ± 0,6	0,09
STAI-Trait Angst (score)	26,8 ± 1,1	31,6 ± 1,7	0,33
Hormonelle Verhütung:			
Kombinationspille (N)		11	
Minipille (N)		1	
Vaginalring (N)		2	

Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert ± SEM dargestellt. Gruppenunterschiede wurden mittels T-Test für unabhängige Stichproben oder dichotome Merkmale mittels des χ^2 -Test untersucht. P= p-Wert; BMI= *Body mass index*; HADS= *Hospital Anxiety and Depression Scale*; STAI= *State-Trait-Anxiety Inventory*.

3.1.2. Klinische Parameter

Die Analysen der kardiovaskulären Parameter sowie der Leukozytenanzahl im Blut und der Plasmakonzentration des sCD14 ergaben, dass es keine signifikanten Baseline-Unterschiede zwischen den Männern und Frauen gab (Tab. 2). Der Hämatokrit unterschied sich signifikant und war bei den Frauen signifikant niedriger als bei den Männern. Ferner war die Plasmakonzentration des LBP bei den Frauen signifikant höher.

Tabelle 2: Klinische Daten

Variable	Männer (n=14)	Frauen (n=14)	p
Herzfrequenz (bpm)	71 ± 2	76 ± 3	0,25
Blutdruck, systolisch (mmHg)	119 ± 2	115 ± 2	0,26
Blutdruck, diastolisch (mmHg)	75 ± 2	73 ± 2	0,25
Leukozyten (x 10 ³ /μl)	5,3 ± 0,4	5,9 ± 0,5	0,32
Hämatokrit (%)	42,4 ± 0,6	36,0 ± 0,8	<0,001
LBP (μg/ml)	5,9 ± 0,6	10,3 ± 0,9	<0,001
sCD14 (ng/ml)	1566 ± 68	1651 ± 84	0,41

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Gruppenunterschiede wurden mittels T-Test für unabhängige Stichproben untersucht. LBP= Lipopolysaccharid-bindendes Protein; sCD14= lösliches CD14; P= p-Wert.

3.1.3. Inflammatorische Parameter

Die Daten der inflammatorischen Parameter belegen eine erfolgreiche, experimentell durch die intravenöse Injektion von Endotoxin (0,4 ng/kg Körpergewicht) induzierte, transiente systemische Immunantwort in beiden Geschlechtern. So kam es zu einem vergleichbaren moderaten und signifikanten Anstieg der Körpertemperatur mit einem Maximum bei 3 Stunden nach der Injektion (Männer: $37,4 \pm 0,1$ °C; Frauen: $37,5 \pm 0,1$ °C; Abb. 4A). Neben dem Anstieg der Körpertemperatur kam es im Verlauf der Zeit zu einer charakteristischen Veränderung des Differenzialblutbilds. So stieg die Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten der männlichen Probanden nach der Injektion stärker an als die Anzahl der zirkulierenden Neutrophilen der Probandinnen (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F = 5,59$; $p = 0,001$; Abb. 4B). Die Anzahl der Monozyten stellte eine biphasische Verlaufskurve dar, welche zunächst durch die rasche Abnahme der Monozytenanzahl geprägt war, die einem anschließenden steilen Anstieg der Monozyten im peripheren Blut folgte (Abb. 4C). Nachweislich benötigten die Monozyten der weiblichen Probanden dabei signifikant länger für den erneuten Anstieg ihrer Zellzahl als die Monozyten der männlichen Probanden (Zeit x Geschlecht: $F = 6,58$; $p = 0,001$). Die Anzahl der Lymphozyten betreffend gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Abb. 4D).

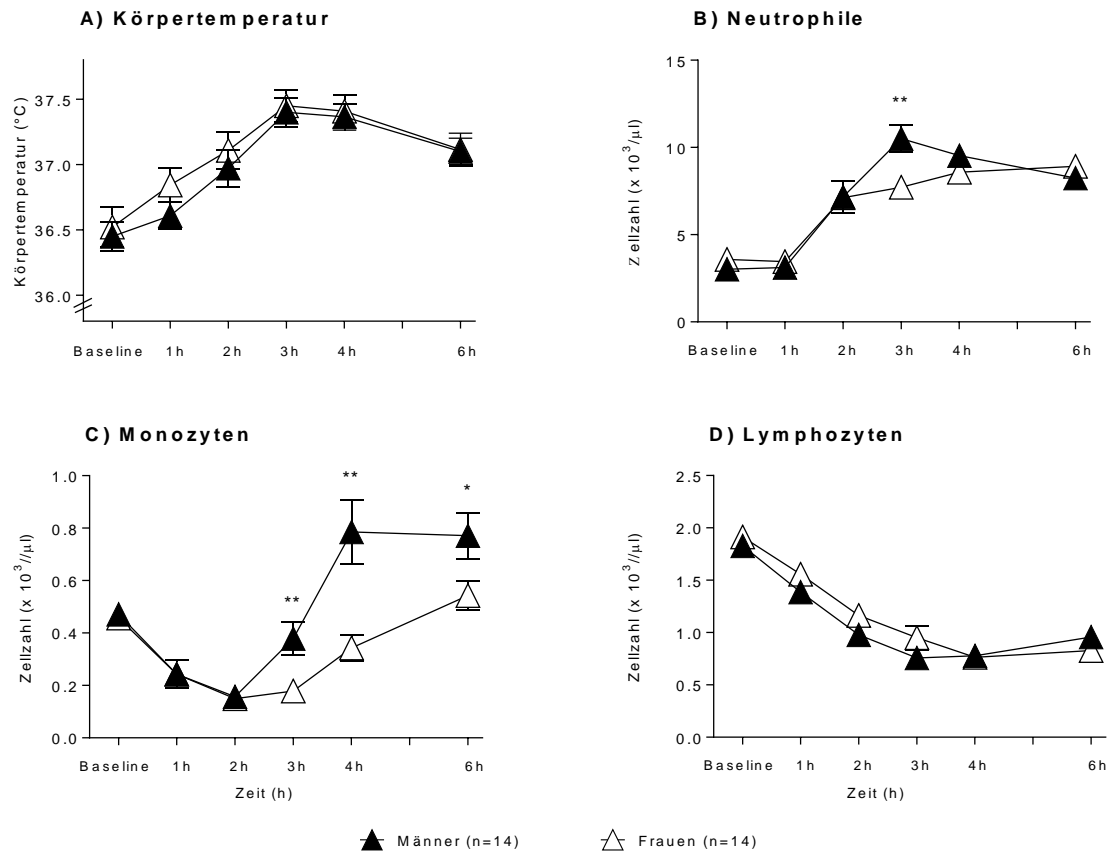


Abb. 4: Körpertemperatur und Differenzialblutbild

Einfluss der experimentellen Endotoxämie auf die Körpertemperatur (A) sowie die Verteilung der neutrophilen Granulozyten (B), der Monozyten (B) und der zirkulierenden Lymphozyten (D) im peripheren Blut von gesunden Männern (n= 14) und Frauen (n= 14) vor und nach der Injektion von 0,4 ng/kg LPS. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001.

Ferner kam es durch die LPS-vermittelte systemische Entzündungsreaktion zu einer charakteristischen Veränderung der Plasmakonzentrationen der zirkulierenden pro- und anti-inflammatorischen Zytokine. Die Analysen der Zytokindaten zeigen signifikante Geschlechterunterschiede, bei denen die Frauen mit einer stärker ausgeprägten inflammatorischen Immunantwort reagierten als die Männer. Die Plasmakonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL- 6 (Zeit x Geschlecht-Interaktion: F = 3,32; p = 0,038; Geschlecht: F = 7,24; p = 0,012; Abb. 5A) und TNF- α (Zeit x Geschlecht-Interaktion: F = 11,90; p = 0,001; Geschlecht: F = 19,89; p < 0,001; Abb. 5B) waren bei den Frauen, im Vergleich zu den Männern, signifikant erhöht. Weiterführend zeigte die Analyse der Plasmakonzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-1ra, dass es einen signifikanten Unterschied

zwischen den Männern und Frauen gab, wobei die Werte der Frauen signifikant erhöht waren (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F = 4,29$; $p = 0,015$; Geschlecht: $F = 4,20$; $p = 0,051$; Abb. 5C). Die Plasmakonzentration von IL-10 war hingegen in den Männern signifikant höher als in den Frauen (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F = 8,77$; $p = 0,002$; Geschlecht: $F = 12,73$; $p = 0,001$; Abb. 5D).

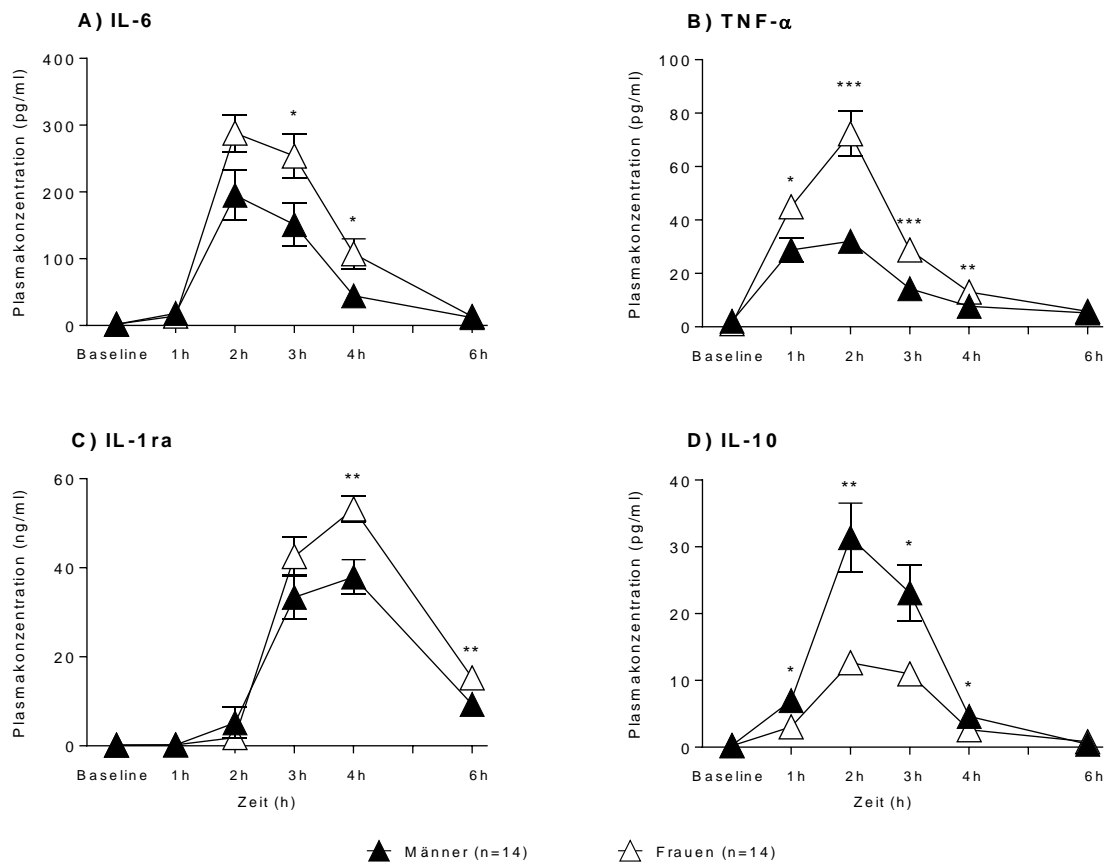


Abb. 5: Inflammatorische Reaktion

Plasmakonzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 (A) und TNF- α (B) sowie die Plasmakonzentration der anti-inflammatorischen Zytokine IL-1ra (C) und IL-10 (D) in gesunden Männern ($n = 14$) und Frauen ($n = 14$) vor und nach der Injektion von 0,4 ng/kg LPS. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die Berechnungen der AUC_G dokumentieren ebenfalls signifikante Geschlechterunterschiede in der Endotoxin induzierten Zytokinantwort zwischen Männern und Frauen (Tab. 3).

Tabelle 3: Berechnung der AUC_G der inflammatorischen Parameter

Variable	Männer (n=14)	Frauen (n=14)	p
TNF-α (pg/ml)	101 \pm 10	184 \pm 16	<0,001
IL-6 (pg/ml)	449 \pm 78	736 \pm 68	0,01
IL-10 (pg/ml)	71 \pm 10	32 \pm 3	0,002
IL-1ra (ng/ml)	105 \pm 13	140 \pm 9	0,03

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Gruppenunterschiede wurden mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Die AUC_G wurde numerisch mit Hilfe der Trapezregel von der Baseline bis 6 Stunden post LPS-Injektion berechnet. $AUC_G = \text{Area under the curve with respect to ground}$.

3.1.4. Neuroendokrine Parameter

Die intravenöse Injektion von Endotoxin führte zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von NA in beiden Geschlechtern, allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Zeiteffekt: $F = 9,04$; $p < 0,001$; Abb. 6A). Signifikante Unterschiede ließen sich hingegen in der Plasmakonzentration von CORT dokumentieren, da bei den Frauen im Vergleich zu den Männern ein signifikant höherer Anstieg des Cortisolspiegels nachgewiesen werden konnte (Zeit x Geschlecht Interaktion: $F = 6,22$; $p = 0,002$; Geschlecht: $F = 13,21$; $p = 0,001$; Abb. 6B). Weiterführend zeigten sich Unterschiede in der Plasmakonzentration von DHEA, die in Männern generell höher war, sich aber geschlechterübergreifend im Laufe der Zeit bei beiden Geschlechtern signifikant veränderte (Geschlecht: $F = 20,59$; $p < 0,001$; Zeit x Geschlecht Interaktion: $F = 4,64$; $p = 0,002$; Abb. 6C) und vergleichbar war. Die Verlaufskurve des DHEA beschrieb anfänglich einen raschen Abfall der Plasmakonzentration sowohl in den Daten der Männer als auch in den Daten der Frauen, gefolgt von einem erneuten Anstieg und einem Peak nach 2

Stunden post Injektion, welcher aber bei den Frauen tendenziell größer war ($p = 0,069$). Der Einfluss von LPS auf das immunstimulierende Hormon PRL wurde ebenfalls geschlechterübergreifend betrachtet und dokumentierte, dass es durch das Endotoxin zu einem Anstieg der Sekretion von PRL in den Frauen kam (Zeit x Geschlecht Interaktion: $F = 5,59$; $p = 0,002$; Geschlecht: $F = 6,83$; $p = 0,015$), nicht aber in den Männern (Abb. 6D).

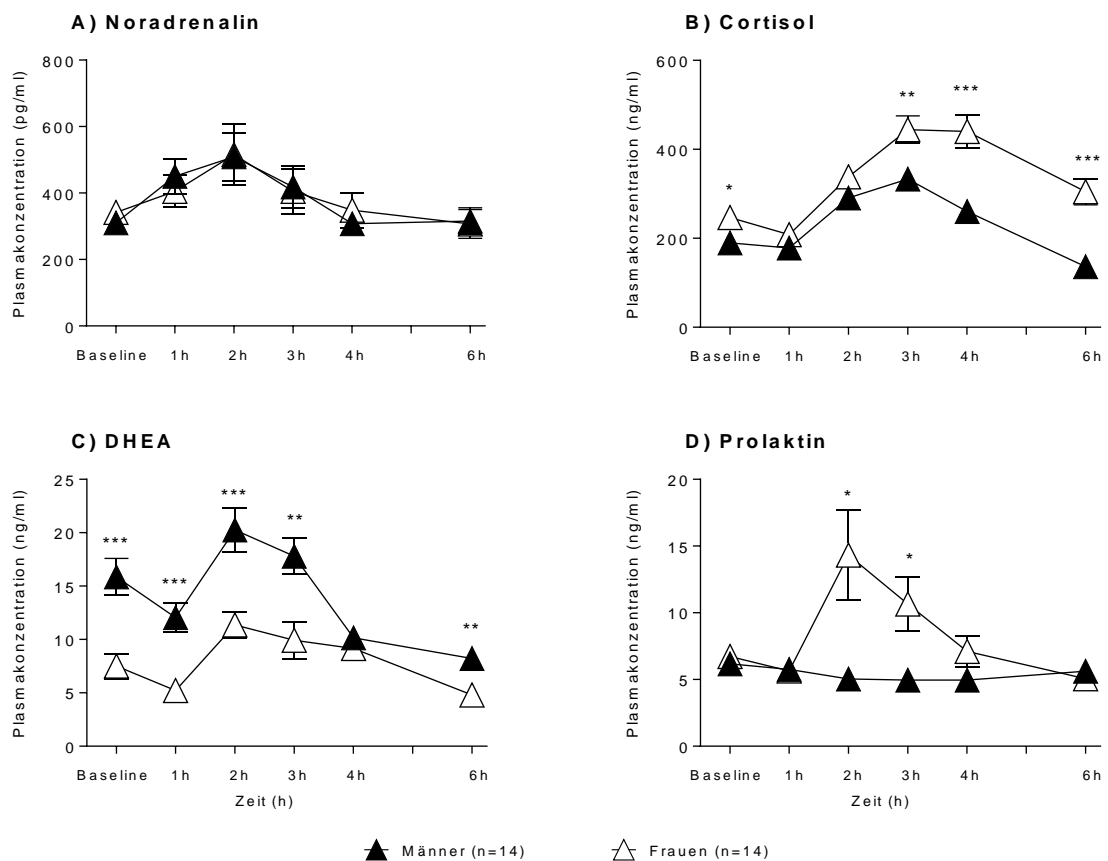


Abb. 6: Neuroendokrine Reaktion

Plasmakonzentration von Noradrenalin (A) und Cortisol (B) sowie die Plasmakonzentration von DHEA (C) und Prolaktin (D) in gesunden Männern ($n = 14$) und Frauen ($n = 14$) vor und nach der Injektion von 0,4 ng/kg LPS. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die genannten signifikanten geschlechterbezogenen Unterschiede von CORT, DHEA und PRL in der durch LPS induzierten Immunantwort ließen sich auch durch die Berechnung der AUC_G , berechnet von der Baseline-Messung bis 6 Stunden nach der Injektion, nachweisen (Tab. 4).

Tabelle 4: Berechnungen der AUC_G der neuroendokrinen Daten

Variable	Männer (n=14)	Frauen (n=14)	p
Noradrenalin (pg/ml)	105 ±13	140 ± 9	0,74
Cortisol (ng/ml)	1516 ± 97	2193 ± 156	0,001
DHEA (ng/ml)	89 ± 6	52 ± 6	<0,001
Prolaktin (ng/ml)	35 ± 2	52 ± 7	0,02

Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Gruppenunterschiede wurden mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Die AUC_G wurde numerisch mit Hilfe der Trapezregel von der Baseline bis 6 Stunden post LPS-Injektion berechnet. $AUC_G = \text{Area under the curve with respect to ground}$.

3.1.5. Fragebögen

Um die Effekte der LPS-Injektion auf die Stimmung, die Zustandsangst und das allgemeine Krankheitsempfinden (Sickness Behavior) der Probanden zu untersuchen, wurden sowohl der STAI-State als auch der MDBF sowie der GASE zu unterschiedlichen Zeitpunkten gegeben und die Daten analysiert. Die Berechnungen der State- Angst, gemessen von der Baseline bis 6 Stunden nach der Injektion, dokumentiert einen kurzzeitigen Anstieg der Zustandsangst infolge der Injektion, welcher sich in beiden Geschlechtern gleich verhält (Zeiteffekt: $F=20,69$; $p < 0,001$; Abb. 7A). Die MDBF Skala der Stimmung „gute vs. schlechte Stimmung“ zeigt korrelierend dazu nach der Injektion bei beiden Geschlechtern eine deutliche Verschlechterung der Stimmungsparameter mit einem Tiefpunkt nach 3 Stunden (Zeiteffekt: $F = 35,50$; $p < 0,001$; Abb. 7B). Die Auswertung der Skala Wachheit „Wachheit vs. Müdigkeit“ dokumentiert zeitgleich einen Anstieg der

Müdigkeit (Zeiteffekt: $F = 27,34$; $p < 0,001$; Abb. 7C) ebenso wie einen Anstieg der Unruhe in der Skala Gelassenheit „Ruhe vs. Unruhe“ (Zeiteffekt: $F = 10,24$; $p < 0,001$; Abb. 7D). Die Auswertung des GASE-Fragebogens zur Beurteilung der unspezifischen Krankheitssymptome zeigt ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern (Männer: $9,4 \pm 2,2$; Frauen: $9,6 \pm 1,8$; $T = 0,09$; $p = 0,92$). Zusammengefasst dokumentieren die Daten aller hier verwendeten Fragebögen keinerlei geschlechterspezifische Unterschiede in den Stimmungsparametern sowie den unspezifischen Krankheitssymptomen in Folge der LPS-Injektion.

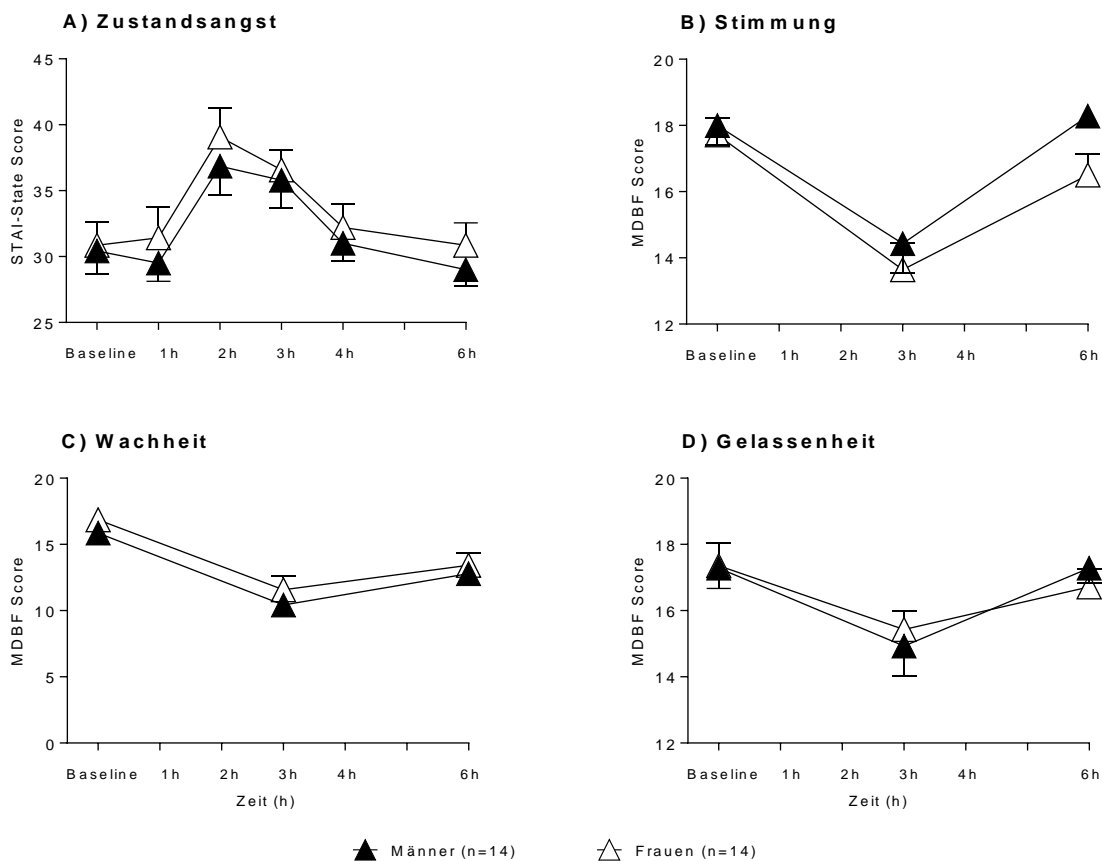


Abb. 7: Psychologische Parameter

Effekte der Injektion von 0,4 ng/kg LPS auf die Zustandsangst (A; ermittelt mit dem STAI-State) sowie die Stimmung (B), die Wachheit (C) und die Gelassenheit (D; ermittelt mit dem MDBF) der Männer (n= 14) und Frauen (n= 14) vor und bis 6 Stunden nach der Injektion. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2. Studie 2 (*ex vivo*)

3.2.1. Soziodemographische und psychologische Daten

Für die *ex vivo* Untersuchungen wurden aus der Gesamtstichprobe insgesamt 28 gesunde Männer und Frauen (14 Männer, 14 Frauen) mit einem Altersdurchschnitt von $26,6 \pm 1,1$ (Altersbereich 20 bis 44 Jahre) und einem durchschnittlichen BMI von $22,8 \pm 0,5$ eingeschlossen (Tab. 5). Die Probanden zeigten keinerlei signifikante Unterschiede in ihrem Alter und BMI oder in den psychologischen Variablen (HADS und STAI-State).

Tabelle 5: Soziodemographische Daten der zweiten Probandengruppe

Variable	Männer (n=14)	Frauen (n=14)	p
Alter (Jahre)	26,6 ± 1	28,6 ± 1,7	0,76
BMI (kg/m ²)	23,0 ± 0,6	22,7 ± 0,6	0,61
HADS Depression (score)	3,1 ± 0,6	2,3 ± 0,8	0,5
HADS Angst (score)	5,9 ± 0,8	3,8 ± 0,8	0,75
STAI-Trait Angst (score)	37,3 ± 1,9	35,5 ± 2,7	0,61
Hormonelle Verhütung:			
Kombinationspille (N)		12	
Pflaster (N)		1	
Vaginalring (N)		1	

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Gruppenunterschiede wurden mittels T-Test für unabhängige Stichproben oder dichotome Merkmale mittels des χ^2 -Test untersucht. P= p-Wert; BMI = *Body mass index*; HADS = *Hospital Anxiety and Depression Scale*.

3.2.2. Sensitivität der Zellen

Die Analysen der *ex vivo* Stimulation der Vollblutproben mit 50 µl LPS ohne die Zugabe der Agonisten zeigten keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der Zytokinsekretion von TNF- α , IL-6 und IL-10. Um den Einfluss von Dexamethason auf die LPS-stimulierte TNF- α , IL-6 und IL-10 Produktion zu untersuchen, wurden die gleichen Analysen durchgeführt. Die Dosis-Wirkungskurven von TNF- α , IL-6 und IL-10 unter Dexamethason zeigen, dass es in Abhängigkeit von der Dexamethasonkonzentration zu einer verringerten Sezernierung der Zytokine kam. Je höher die Agonistenkonzentration in der Probe war, desto geringer war somit auch die Zytokinfreisetzung. Die Daten von IL-6 (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F=0,365$; $p=0,579$; Geschlecht: $F=0,047$; $p=0,830$; Abb. 8A), IL-10 (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F=0,634$; $p=0,475$; Geschlecht: $F=0,069$; $p=0,794$; Abb. 8B) und TNF- α (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F=0,375$; $p=0,616$; Geschlecht: $F=0,324$; $p=0,574$; Abb. 8C) unterschieden sich nicht signifikant, zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf und lieferten somit keinen Anhaltspunkt für geschlechterspezifische Unterschiede in der Sensitivität der Zellen auf Dexamethason. Die Zugabe von Terbutalin führte in Abhängigkeit von seiner Verdünnung zu einer Abnahme der Zytokinproduktion von TNF- α und IL-6, sowie einer gesteigerten Produktion von IL-10. Die Dosis-Wirkungskurven zeigten aber sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen einen ähnlichen Verlauf für IL-6 (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F=0,550$; $p=0,665$; Geschlecht: $F=0,007$; $p=0,934$; Abb. 8D), IL-10 (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F=1,859$; $p=0,142$; Geschlecht: $F=0,428$; $p=0,519$; Abb. 6E) und TNF- α (Zeit x Geschlecht-Interaktion: $F=0,680$; $p=0,583$; Geschlecht: $F=2,93$; $p=0,593$; Abb. 8F) an und lieferten keinen Rückschluss auf signifikante Unterschiede in der Sensitivität der Zellen.

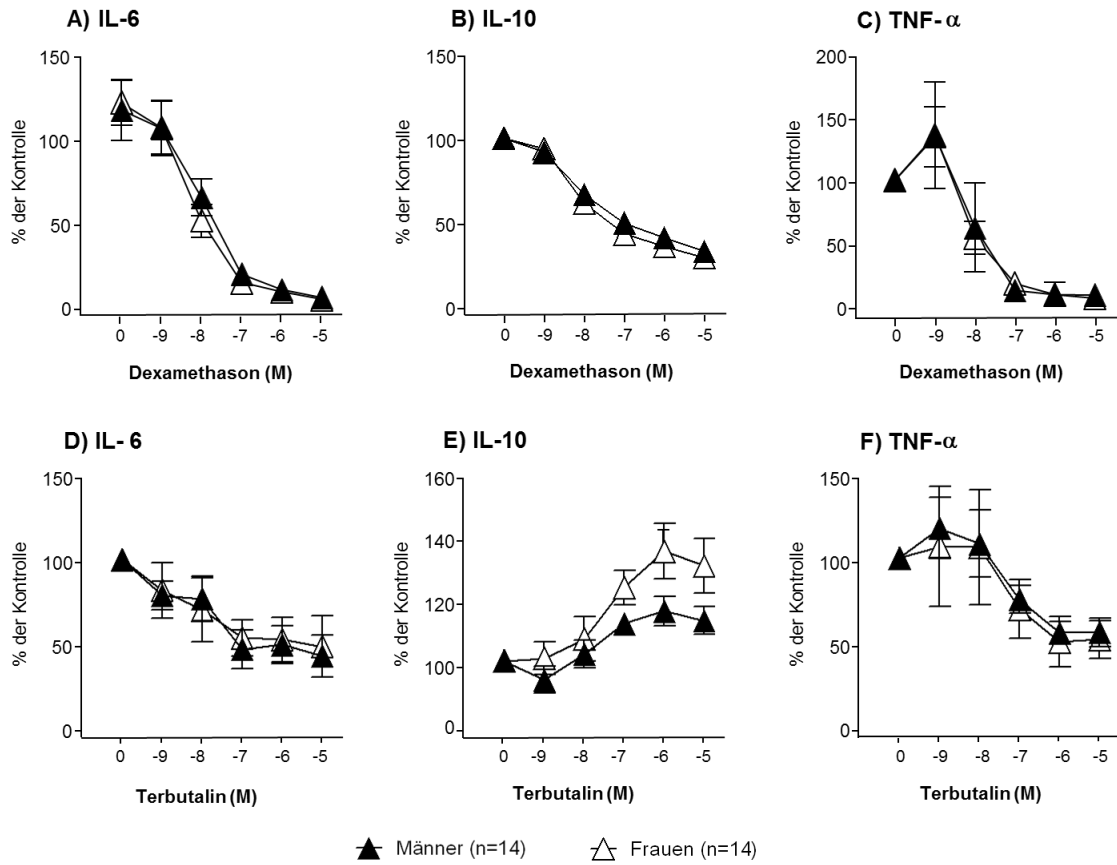


Abb. 8: Sensitivität der Zellen

Effekte von Dexamethason (A bis C) und Terbutalin (D bis E) auf die *ex vivo* Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Ermittelt wurden die Konzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF- α in den Überständen der mit LPS-stimulierten Vollblutproben von je 14 Männern und Frauen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4. Diskussion

Aufbauend auf tierexperimentellen Befunden sowie Beobachtungen und Studien im Menschen konnte bereits dokumentiert werden, dass es Unterschiede in der inflammatorischen Immunantwort zwischen Männern und Frauen gibt. Die experimentelle Administration von LPS führt nicht nur zu einer Aktivierung des Immunsystems, sondern beeinflusst gleichzeitig Parameter des neuro- und endokrinen Systems, die bei der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Die enge Wechselbeziehung zwischen den inflammatorischen Mediatoren des Immunsystems und den neuroendokrinen Mediatoren des ZNS konnte durch verschiedene Studien nachgewiesen werden (Dantzer et al., 2008; Tracey, 2010). Besonders die pro-inflammatorischen Zytokine üben Einfluss auf das ZNS aus und bewirken über verschiedene Pfade eine Veränderung von neuropsychologischen Parametern und Verhaltensprozessen (DellaGioia und Hannestad, 2010; Yirmiya und Goshen, 2011). Unbekannt ist bisher, inwieweit sich Männer und Frauen in der experimentell induzierten akuten systemischen Immunreaktion im Hinblick auf inflammatorische und neuroendokrine Reaktionen unterscheiden. Zudem ist es schwierig, die systemischen Reaktionen auf das Endotoxin von den zellulären Reaktionen zu unterscheiden, da diese eng miteinander verknüpft sind. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit experimentell eine akute systemische Inflammation im Menschen mittels intravenöser Verabreichung von niedrig dosiertem Endotoxin (LPS) induziert und dieses Modell genutzt, um die Effekte der Endotoxämie auf inflammatorische und neuroendokrine Reaktionen im Geschlechtervergleich zu untersuchen.

4.1. Die inflammatorische Reaktion (*in vivo*)

Unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur lautete die erste Hypothese in dieser Arbeit, dass Frauen im Gegensatz zu Männern während einer experimentell induzierten systemischen Entzündungsreaktion, durch die stärker ausgeprägte pro-inflammatorische Immunantwort, auch gleichzeitig stärker ausgeprägte Symptome des Sickness Behavior zeigen. Durch die intravenöse Injektion des niedrig dosierten LPS konnte sowohl in den Männern als auch in den Frauen erfolgreich eine akute systemische Entzündungsreaktion experimentell induziert werden. Die Aktivierung

des Immunsystems wurde durch charakteristische Merkmale, wie dem transienten Anstieg der Körpertemperatur, begleitet und verlief in beiden Geschlechtern gleich. Zudem ließ sich bei beiden Versuchspersonengruppen eine ähnliche Veränderung der Leukozytenverteilung dokumentieren, wobei Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden konnten. Die Anzahl der Monozyten sank zunächst in beiden Geschlechtern gleich ab, wobei die Monozyten der Frauen für einen erneuten Anstieg länger benötigten. Zudem stieg die Anzahl der zirkulierenden Neutrophilen in den Männern höher an als in den Frauen. Während sich Männer und Frauen hinsichtlich der Plasmakonzentration des löslichen CD14 nicht unterschieden, zeigten Frauen höhere LBP Plasmakonzentrationen sowie höhere inflammatorische Zytokinspiegel als Männer. So konnte in den Plasmaproben der Frauen eine signifikant höhere Plasmakonzentration des LBP festgestellt werden als in den Proben der Männer. Ferner führte die akute inflammatorische Immunreaktion zu einer signifikanten Veränderung der pro- und anti-inflammatorischen Zytokinspiegel in beiden Probandengruppen. Hierbei reagierten die Frauen mit einer stärkeren pro-inflammatorischen Reaktion auf das Endotoxin und zeigten höhere Plasmakonzentrationen von TNF- α und IL-6. Zudem war die Plasmakonzentration des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokinrezeptoragonisten IL-1ra in Frauen leicht erhöht, wohingegen die Männer mit einer höheren Sezernierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 reagierten. Die hier gewonnenen Ergebnisse decken sich weitgehend mit der bestehenden Literatur und bestätigen die durch klinische Beobachtungen und experimentelle Studien gewonnenen Befunde, dass Frauen mit einer stärker ausgeprägten pro-inflammatorischen Immunantwort und mit einer Verschiebung des Zytokinspiegels reagieren (Klein, 2012; van Eijk et al., 2007). Parallel zu den inflammatorischen Reaktionen auf das Endotoxin zeigten sich auch Veränderungen in den selbstberichteten Stimmungsparametern und unspezifischen Krankheitssymptomen, die durch die genutzten Fragebögen erfasst wurden. Durch die induzierte akute systemische Entzündungsreaktion kam es in beiden Geschlechtern zu einer kurzzeitigen Verschlechterung der Stimmungsparameter. So stieg einerseits die Zustandsangst nach der Injektion sowohl in den Männern als auch in den Frauen gleich an. Andererseits kam es zu einer Verschlechterung der Stimmung (gute vs. schlechte Stimmung), zu einem Anstieg der Müdigkeit und zu einer Zunahme der Unruhe. Die hier berichtete kurzzeitige negative Verschiebung

der selbstberichteten Stimmungsparameter, welche mit der inflammatorischen Immunantwort einhergeht, deckt sich mit der bestehenden Literatur (Benson et al., 2015; DellaGioia und Hannestad, 2010). So demonstriert beispielsweise die Verschlechterung der Stimmung sowie die Zunahme der Zustandsangst die Wechselbeziehung zwischen Immunsystem und ZNS, welche vor allem durch den Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine mediiert wird. Studiendaten liefern Belege dafür, dass das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 der Hauptmediator für Veränderungen von Stimmungsparametern ist. Ferner werden Veränderungen dieser Parameter in der bisherigen Literatur als Hauptsymptome des Sickness Behavior gedeutet, welche wiederum durch die pro-inflammatorischen Zytokine, wie dem IL6, beeinflusst werden (Dantzer et al., 2008). Die dokumentierte kurzzeitige Verschlechterung der Stimmungsparameter nach circa drei Stunden lässt sich auf die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine zurückführen. Der anschließende Anstieg der Stimmung lässt sich wiederum durch den Einfluss der anti-inflammatorischen Zytokine erklären. Anti-inflammatorische Zytokine wie das IL-10 wirken auf die Produktion und die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine ein und regulieren diese durch Inhibierung. Dadurch wird nicht nur die inflammatorische Reaktion reguliert, sondern auch die Intensität und die Dauer der Stimmungsparameter und des Sickness Behavior bestimmt (Heyen et al., 2000; Richwine et al., 2009). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Frauen durch die erhöhte Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α sowie durch die verminderte Sezernierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gleichzeitig mit einer stärker ausgeprägten negativen Verschiebung der Stimmungsparameter und des Sickness Behavior reagieren würden als die Männer. Die Veränderungen der Stimmungsparameter waren jedoch sowohl in den Männern als auch in den Frauen gleich und zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Dauer und Intensität.

Zusammenfassend konnten wir im ersten Schritt nachweisen, dass Frauen in der Tat mit einer stärker ausgeprägten pro-inflammatorischen Immunantwort reagieren als Männer und Männer hingegen mit einer höheren Sezernierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 reagieren als Frauen. Jedoch hatte diese Verschiebung des Zytokinpiegels keinen signifikanten geschlechterspezifischen Einfluss auf die Symptome des Sickness Behavior. Die Daten liefern somit keinen Beleg für Geschlechterunterschiede in dem Sickness Behavior als Reaktion auf das

LPS, obwohl es signifikante Unterschiede in der Ausprägung der inflammatorischen Immunantwort gab. Daher konnte die Hypothese, dass Frauen durch die erhöhte pro-inflammatorische Zytokinsekretion auch gleichzeitig ein stärker ausgeprägtes Sickness Behavior zeigen, nicht bestätigt werden. Welche Mechanismen dahinterstehen und wodurch die unterschiedlich verlaufende Verschiebung des Zytokinprofils hervorgerufen wird, ist noch unklar. Ein Erklärungsansatz in der unterschiedlichen Zytokinsekretion bietet die erhöhte Plasmakonzentration des LBP in den Proben der Frauen. Wie einleitend erwähnt, spielt das LBP eine wesentliche Rolle bei der Detektion von Pathogenen und bindet das zirkulierende LPS, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird (Beutler und Poltorak, 2001; Poltorak et al., 1998). Der LBP/LPS-Komplex bindet wiederum an die CD14 Rezeptoren, welche sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorkommen, und transferiert diesen zu den Toll-like Rezeptoren 4. Dadurch werden die TLR 4 aktiviert und die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Typ-1 Interferonen initiiert (Lu et al., 2008). Die beschriebene Signalkaskade könnte durch die erhöhten Plasmakonzentrationen des LBP in den Frauen ebenso zu einer erhöhten Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine führen. Je höher die Konzentration des LBP ist, umso mehr LPS kann gebunden werden, wodurch wiederum eine erhöhte Anzahl an TLR 4 aktiviert werden und es zu einer höheren Sekretion von beispielsweise IL-6 kommt (Duzendorfer et al., 2004). Warum dies jedoch keinen Einfluss auf die neuropsychologischen Funktionen hat bzw. warum sich Frauen hier nicht deutlich von den Männern unterscheiden, ist unklar. Die gewonnenen Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass der weibliche Organismus zentrale oder periphere Kompensationsmechanismen besitzt, die dem Überschießen der pro-inflammatorischen Immunreaktion entgegenwirken und so zeitgleich eine Überreaktion der neuropsychologischen Funktionen verhindern.

4.2. Die neuroendokrine Reaktion (*in vivo*)

Die zweite Hypothese dieser Arbeit lautete, dass Frauen durch die stärker ausgeprägte inflammatorische Immunantwort gleichzeitig mit einer stärkeren Aktivierung des neuroendokrinen Systems reagieren und dieses Einfluss auf die Zytokinsekretion und das Sickness Behavior nimmt. Durch die Injektion von LPS kam es in beiden Geschlechtern zu einer erfolgreich induzierten Immunaktivierung, bei der es parallel zur Aktivierung des neuroendokrinen Systems kam, ohne dass jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt werden konnten. Sowohl in den Männern als auch in den Frauen kam es zu einem vergleichbaren Anstieg der Plasmakonzentration von Noradrenalin, was einen Nachweis für die durch Zytokine medierte Aktivierung des sympathischen Nervensystems liefert. Da sich hierbei keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der Plasmakonzentration des Noradrenalins feststellen lassen, lief die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und das Ausmaß der Aktivierung in beiden Geschlechtern scheinbar gleich ab. Zudem wirkt Noradrenalin inhibitorisch auf proinflammatorische Prozesse und verhindert daher ein Überschießen der Immunantwort (Sternberg, 2006). Diese enge Verbindung der inflammatorischen und neuroendokrinen Parameter und ihre Wechselwirkung spielen nachweislich eine wichtige Rolle in der Feedback Regulation der Immunantwort (Tracey, 2009, 2010). Möglicherweise liegt hier ein Kompensationsmechanismus des weiblichen Organismus verborgen, der die erheblichen Unterschiede in der proinflammatorischen Zytokinsekretion aufwiegt und ihren Einfluss auf das ZNS reguliert. So gibt es beispielsweise Belege dafür, dass es geschlechterspezifische Unterschiede in der Sensitivität auf das periphere Noradrenalin gibt. Van Eijk et al. zeigten 2007 in ihrer Studie, dass Männer und Frauen auf die Administration von LPS mit Unterschieden in der Noradrenalin induzierten Vasokonstriktion reagierten. So reagierten Männer mit einer stärker abgeschwächten Vasokonstriktion als Frauen auf das Endotoxin. Erklärt wurde dies durch Veränderungen der β_2 -adrenergen Rezeptoren. Bekannt ist, dass die β_2 -adrenergen Rezeptoren die am häufigsten vorkommenden Rezeptoren auf Immunzellen sind. Daher kann spekuliert werden, ob die β_2 -adrenergen Rezeptoren nicht ausschließlich Einfluss auf die Vasokonstriktion haben, sondern ebenfalls eine noch unbekannt Rolle im Immunsystem spielen. Eine höhere Sensitivität der weiblichen Immunzellen auf

Noradrenalin könnte daher zu geschlechterspezifischen Unterschieden in der Feedback Regulation der inflammatorischen Immunantwort führen, obwohl es keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration gibt. Ferner stieg die Plasmakonzentration von Cortisol an, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachweisen ließen. So waren die gemessenen Cortisolwerte in den Frauen höher und von längerer Dauer als die ermittelten Cortisolspiegel in den Männern. Zurückzuführen ist dieser Unterschied wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Zytokinprofile in Männern und Frauen. Durch die erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinspiegel der Frauen werden gleichzeitig vermehrt Botenstoffe zum ZNS gesendet. Die verstärkte Signalweiterleitung führt dementsprechend zu einer stärker ausgeprägten Stimulation der HPA-Achse und somit zu erhöhten Plasmakonzentrationen von Cortisol. Dieser Mechanismus stellt eine potentielle Erklärung für die fehlenden Unterschiede im Sickness Behavior dar. Durch die verstärkte Stimulation der HPA-Achse wird ebenfalls mehr Cortisol ausgeschüttet, was wiederum inhibitorisch auf die pro-inflammatorischen Mediatoren wirkt (Sternberg, 2006). Studien belegen, dass Glukokortikoide entscheidend die Sezernierung der pro-inflammatorischen Zytokine hemmt (Heffner, 2011). Weiterführend konnte nach einem kurzzeitigen Absinken der Plasmakonzentration von DHEA ein erneuter Anstieg der DHEA-Konzentration in beiden Geschlechtern festgestellt werden. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurven war über die Zeit gemessen in beiden Geschlechtern ähnlich. Allerdings war die DHEA Plasmakonzentration in den Männern, gemessen von der Baseline bis sechs Stunden nach der Injektion, höher als in den Frauen. Die Frauen reagierten hingegen generell auf die Injektion bis zwei Stunden nach dieser mit einer stärkeren Reaktion auf das Endotoxin. Die Analyse der Daten zeigte daher eine erhöhte Ausschüttung von DHEA und einen höheren Anstieg der Plasmakonzentration innerhalb der ersten zwei Stunden in den Frauen. Diese Unterschiede in der DHEA-Ausschüttung könnten eine weitere mögliche Erklärung für kompensatorische Mechanismen des weiblichen Organismus darstellen, um ein Überschießen der pro-inflammatorischen Immunantwort im ZNS zu verhindern. Durch die Aktivierung der HPA-Achse kommt es wie erwähnt einerseits zur Ausschüttung von Glukokortikoiden. Andererseits wird DHEA sezerniert, bei dem es sich um ein anti-inflammatorisches Hormon handelt, das die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine inhibiert (Aleves et al., 2016; Pratschke et al., 2014;

Silverman et al., 2005; Wu et al., 2015). Studien dokumentieren, dass das DHEA regulierend wirkt und dazu beiträgt, die Homöostase des Organismus aufrechtzuerhalten. So konnten beispielsweise niedrige Serumkonzentrationen von DHEA mit entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Overman et al., 2012). Andererseits führte die Administration von DHEA im septischen Tiermodell zu einer verbesserten Überlebensrate der Tiere (Al-Banna et al., 2014; Alves et al., 2016; Schmitz et al., 2010). Wir konnten in der vorliegenden Arbeit dokumentieren, dass die Frauen innerhalb der ersten zwei Stunden mit einer stärkeren DHEA Ausschüttung auf das Endotoxin reagieren als die Männer. Diese schnelle und ausgeprägte Reaktion könnte beispielsweise noch unbekannte regulative Mechanismen in Gang setzen, die der stärker ausgeprägten Modulation der neuropsychologischen Funktionen entgegenwirkt. Ein weiterer Mechanismus könnte jedoch auch in der neuroendokrinen Regulation des Hormons Prolaktin liegen. Die Plasmakonzentration von Prolaktin stieg infolge der Injektion mit Endotoxin nur in den Frauen an und blieb in den Männern bei einer konstanten Konzentration. Prolaktin wird als Reaktion auf die Aktivierung des Immunsystems durch den Hypophysenvorderlappen vermehrt sezerniert und wirkt der inhibitorischen Wirkung von Noradrenalin und Cortisol bzw. der anti-inflammatorischen Immunreaktion entgegen (Suarez et al., 2015). Pro-inflammatorische Zytokine wirken stimulierend auf die Produktion von Prolaktin ein und führen zu einer erhöhten Ausschüttung. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Unterschiede in der Sezernierung von Prolaktin könnten demnach auf die signifikant höhere Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine in Frauen zurückzuführen sein. Interessanterweise konnten Studien, die Patienten mit einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) untersuchten, dennoch in beiden Geschlechtern eine erhöhte Konzentration von Prolaktin nachweisen (Maxime et al., 2007). Daher scheint es durch unbekannte Mechanismen im männlichen Organismus sehr wohl zu einer Erhöhung des Prolaktinspiegels zu kommen. Dies könnte bedeuten, dass es einen speziellen Schwellenwert gibt, der erreicht werden muss, damit es auch bei Männern zu einer vermehrten Ausschüttung von Prolaktin kommt (Vardas et al., 2014).

Zusammenfassend liefern die Analysen der neuroendokrinen Parameter Belege dafür, dass es nicht nur in der inflammatorischen Reaktion auf das niedrig dosierte LPS geschlechterspezifische Unterschiede gibt. Viel mehr zeigen sich diese

signifikanten Unterschiede ebenfalls auf neuroendokriner Ebene. Interessanterweise scheinen diese Unterschiede der neuroendokrinen Mediatoren, anders als erwartet, keinen Einfluss auf die Zustandsangst, die allgemeinen Stimmungsparameter oder das Sickness Behavior in Männern und Frauen zu haben. Ferner liefern die Ergebnisse keinen Nachweis für mögliche Kompensationsmechanismen des weiblichen Organismus aufgrund derer die fehlenden geschlechterspezifischen Unterschiede in der Stimmung und im Sickness Behavior erklärt werden können. Daher bleibt zu diesem Zeitpunkt weiterhin unklar, welche Mechanismen des weiblichen Organismus dem Überschießen der pro-inflammatorischen Immunantwort entgegenwirken.

4.3. Sensitivität der Zellen (*ex vivo*)

Aufbauend auf die *in vivo* Untersuchungen in dieser Arbeit lautet die dritte Hypothese, dass sich die Immunzellen von Männern und Frauen bereits in ihrer Sensitivität auf die Botenstoffe des neuroendokrinen Systems unterscheiden und dies Einfluss auf die Zytokinseznierung und die beobachteten Geschlechterunterschiede hat. Daher wurde *ex vivo* untersucht, ob sich auf Zellebene Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Glukokortikod- und Adrenozeptor-Agonisten feststellen lassen und dies einen mechanistischen Hinweis auf die Ursache der stärker ausgeprägten Zytokinseznierung liefert.

Die Behandlung der LPS-stimulierten Proben mit Terbutalin führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der TNF- α Synthese, wobei die Dosis-Wirkungskurve in beiden Geschlechtern gleich verlief. Ferner konnte eine erhöhte Produktion von IL-10 festgestellt werden, was im Einklang mit der bisherigen Literatur steht (Lucas et al., 2007). Die Sezernierung von IL-6 blieb unter Zugabe von Terbutalin weitestgehend konstant und veränderte sich weder in Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen noch in Bezug auf das Geschlecht. In Abhängigkeit von seiner Konzentration führte das synthetische Glukokortikoid Dexamethason zu einer inhibierten Synthese von TNF- α , IL-10 sowie IL-6. Die Dosis-Wirkungskurven der männlichen sowie der weiblichen Immunzellen unterscheiden sich nicht in ihrem Verlauf. Es konnten keine Unterschiede in der

Zytokinsezernierung der Immunzellen als Reaktion auf die Stimulation mit LPS gefunden werden. Die *ex vivo* Untersuchungen dokumentieren, dass weder geschlechterspezifische Unterschiede in Reaktion der Immunzellen auf das Endotoxin noch Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität der Immunzellen auf glukokortikoide und adrenerge Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden konnten. Die Daten stehen somit in Kontrast zu den Befunden der *in vivo* Untersuchungen. *In vivo* reagierten die Frauen neben einer stärker ausgeprägten pro-inflammatorischen Immunantwort gleichzeitig mit einem Anstieg des Cortisolspiegels. Daher wäre zu vermuten gewesen, dass die Immunzellen des weiblichen Organismus *ex vivo* weniger sensitiv auf die endokrinen anti-inflammatorischen Mediatoren reagieren als die männlichen Immunzellen. Die Daten belegen jedoch, dass es keine Unterschiede gibt und somit können zelluläre Mechanismen als Ursache für die abweichenden Zytokinprofile der Männer und Frauen ausgeschlossen werden. Es ist zu vermuten, dass die vorher nachgewiesenen Unterschiede der Plasmakonzentrationen der Zytokine auf Abweichungen in der systemischen Zytokinantwort zurückzuführen sind, nicht aber auf die zelluläre Antwort. Während die zirkulierenden Zytokine *in vivo* durch Leber und Nieren abgebaut werden (Andres-Hernando et al. 2012), geschieht dies *ex vivo* durch die Bindung an Zytokinrezeptoren. Somit unterscheiden sich die *in* und *ex vivo* Mechanismen der Zytokin-clearance, bei der Unterschiede nur unter *in vivo* Bedingungen, aber nicht *ex vivo* sichtbar wären. Dies könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit dokumentierten Geschlechterunterschiede in der Reaktion auf LPS sein. Es muss jedoch weitergehend geklärt werden, auf welche Mechanismen die Entstehung der dokumentierten Geschlechterunterschiede beruhen und welche kompensatorischen Mechanismen des weiblichen Organismus dafür verantwortlich sind, dass Frauen beispielsweise nicht mit deutlich schwereren Symptomen des Sickness Behavior reagieren.

4.4. Ausblick

Die hier dargestellten Befunde dokumentieren eindeutig, dass es nicht nur in der inflammatorischen, sondern auch in der neuroendokrinen Immunantwort auf niedrig-dosiertes Endotoxin Unterschiede zwischen Männern und Frauen gibt. Zudem geben sie fundierte Hinweise darauf, dass der weibliche Organismus über verschiedene Mechanismen verfügt, die der starken pro-inflammatorischen Immunantwort entgegenwirken. Da sich auf Zellebene keine Unterschiede zwischen den Immunzellen von Männern und Frauen nachweisen lassen, müssen diese kompensatorischen Mechanismen auf systemischer Ebene liegen. Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Mechanismen für diese Geschlechterunterschiede und eventuelle kompensatorische Mechanismen verantwortlich sind. Zudem gibt es Daten anderer Studien, die diese Geschlechterunterschiede in der Zytokinseznierung als Reaktion auf das Endotoxin nicht dokumentieren konnten (Coyle et al., 2006). Worauf dies zurückzuführen ist, ist noch unklar und sollte bei zukünftigen Studien genauer untersucht werden. Ein Grund könnte sein, dass Frauen in unterschiedlichen Zyklusphasen untersucht wurden und die Datenerfassung vorab nicht auf eine bestimmte Phase beschränkt wurde. Basierend auf diesem Gedanken könnte ein weiterer Grund für die bestehenden Differenzen in den Daten sein, dass Frauen mit hormoneller Verhütung anders reagieren als Frauen ohne hormonelle Verhütung. Zudem beschäftigten sich Studien, die Geschlechterunterschiede untersuchten, meist nur mit der inflammatorischen Immunreaktion, nicht aber mit der neuroendokrinen Reaktion im Hinblick auf Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Die hier erhobenen Daten weisen jedoch auf deutliche Unterschiede in den neuroendokrinen Mediatoren hin. Daher sollte ihr Einfluss bei weiteren Studien genauer untersucht werden. Bis heute ist die Anzahl der Studien, die aussagekräftige Belege für Unterschiede in der inflammatorischen und neuroendokrinen Reaktion auf eine akute systemische Entzündungsreaktion im experimentellen Modell geben, sehr überschaubar. Ferner sollte untersucht werden, welche Schaltunkte in der inflammatorischen Feedback Regulation bei Patientinnen mit beispielsweise neuropsychiatrischen Störungen beeinträchtigt sind. Dies könnte einen Hinweis auf die beteiligten Mechanismen geben, da die Wechselbeziehung zwischen dem Immunsystem und ZNS bei verschiedenen

Erkrankungen einen wichtigen Schalterpunkt darstellt. Störungen dieser Beziehung führen oftmals zu neuropsychiatrischen Störungen oder zu chronischen Entzündungen. Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, die dahinterstehenden Mechanismen genauestens zu verstehen, um sie für therapeutische Zwecke sinnvoll nutzen zu können. Nicht zuletzt kann durch die Entschlüsselung dieser geschlechterspezifischen Unterschiede nicht nur die therapeutische Wirksamkeit verbessert werden, sondern gleichzeitig die Patientensicherheit erhöht werden. So variiert beispielsweise die Toxizität von Arzneimitteln zwischen den Geschlechtern. Dies alles stellt die Dringlichkeit dar, mit der sich zukünftige Studien mit Geschlechterunterschieden und den daran beteiligten unterschiedlichen Mechanismen auseinandersetzen sollten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Geschlechterunterschiede in der inflammatorischen und neuroendokrinen Reaktion auf eine experimentelle Endotoxämie beim Menschen untersucht. Hierzu wurde eine akute systemische Immunreaktion mithilfe von niedrig dosiertem Endotoxin (Lipopolysaccharid (LPS), 0,4 ng/ kg Körpergewicht) in gesunden Männern und Frauen induziert. Es konnte gezeigt werden, dass der weibliche Organismus *in vivo* während einer akuten systemischen Entzündungsreaktion mit einer stärker ausgeprägten Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) reagiert. Als Folge auf die intravenöse Injektion von LPS kam es zu einer Zunahme der Zustandsangst, zu einer negativen Verschiebung der Stimmungsparameter sowie zu einer Zunahme der Symptome des Sickness Behaviors, jedoch ohne signifikante Geschlechterunterschiede. Nichtsdestotrotz konnten signifikante Unterschiede in der neuroendokrinen Reaktion nachgewiesen werden. So reagierten die weiblichen Probanden mit einer höheren Sezernierung von Cortisol und Prolaktin als die männlichen. Der Noradrenalin und der Dehydroepiandrosteron (DHEA) Spiegel veränderte sich hingegen in beiden Geschlechtern ohne signifikante Unterschiede. Die Hypothese, dass die erhöhte pro-inflammatorische Immunantwort zeitgleich mit einem stärker ausgeprägten Sickness Behavior einhergeht, konnte nicht bestätigt werden. Auch die nachgewiesenen geschlechterspezifischen Unterschiede in der neuroendokrinen Immunantwort lieferten keine eindeutige Erklärung für die unterschiedlich verlaufende inflammatorische Immunantwort oder die fehlenden Unterschiede in der neuropsychologischen Reaktion. Ferner zeigte die *ex vivo* Untersuchung der Immunzellen auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Sensitivität gegenüber glukokortikoiden und adrenergen Rezeptor-Agonisten keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend stellen die Befunde dieser Arbeit dar, dass es gravierende Geschlechterunterschiede in der akuten inflammatorischen und neuroendokrinen Immunantwort gibt. Diese spiegeln sich jedoch nicht in den neuropsychologischen Reaktionen wieder. Die Daten deuten darauf hin, dass der weibliche Organismus über kompensatorische Mechanismen verfügt, die der stärkeren inflammatorischen Immunantwort entgegenwirken und so Unterschiede in den neuropsychologischen Reaktionen unterbinden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdullah, M., Pei-Shin, C., Mun-Yee, C., Eusni Rahayu Mohd, T., Rajesh, R., Chong Pei, P., Sharmili V. (2012): Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cell. Immunol.* 272, 214-219.
2. Al-Banna, N., Pavlovic, D., Sharawi, N., Bac, V. H., Jaskulski, M., Balzer, C., Weber, S., Nedeljkov, V., & Lehmann, C. (2014): Combination of dehydroepiandrosterone and orthovanadate administration reduces intestinal leukocyte recruitment in models of experimental sepsis. *Microvasc. Res.* 95, 82-87.
2. Altemus, M., Sarvaiya, N., & Neill Epperson, C. (2014): Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 320-330.
3. Alves, V. B. F., Basso, P. J., Nardini, V., Silva, A., Chica, J. E. L., & Cardoso, C. R. D. (2016): Dehydroepiandrosterone (DHEA) restrains intestinal inflammation by rendering leukocytes hyporesponsive and balancing colitogenic inflammatory responses. *Immunobiol.* 221, 934-943.
4. Andres-Hernando, A., Dursun, B., Altmann, C., Ahuja, N., He, Z., Bhargava, R., Edelstein, C.E., Jani, A., Hoke, T.S., Klein, C., Faubel, S. (2012): Cytokine production increases and cytokine clearance decreases in mice with bilateral nephrectomy. *Nephrol Dial Transplant.* 27, 4339-4347.
5. Angele, M. K., Pratschke, S., Hubbard, W. J., & Chaudry, I. H. (2014): Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 5, 12-19.
6. Bahador, M., & Cross, A. S. (2007): From therapy to experimental model: a hundred years of endotoxin administration to human subjects. *J. Endotoxin Res.* 13, 251-279.
7. Barton, G. M. (2008): A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* 118, 413-420.
8. Bekker, M. H. J., & van Mens-Verhulst, J. (2007): Anxiety Disorders: Sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. *Gender Medicine* 4, 178-193.
9. Benson, S., Kattoor, J., Wegner, A., Hammes, F., Reidick, D., Grigoleit, J. S., Engler, H., Oberbeck, R., Schedlowski, M., & Elsenbruch, S. (2012): Acute

- experimental endotoxemia induces visceral hypersensitivity and altered pain evaluation in healthy humans. *Pain* 153, 794-799.
10. Benson, S., Rebernik, L., Wegner, A., Kleine-Borgmann, J., Engler, H., Schlamann, M., Forsting, M., Schedlowski, M., & Elsenbruch, S. (2015): Neural circuitry mediating inflammation-induced central pain amplification in human experimental endotoxemia. *Brain Behav. Immun.* 48, 222-231.
 11. Berghöfer, B., Frommer, T., Haley, G., Fink, L., Bein, G., Hackstein, H. (2006) TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *Journal Immunol.*, 177, 2088-2096; DOI: 10.4049/jimmunol.177.4.2088.
 12. Besedovsky, H. O., & del Rey, A. (1996): Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 64-102.
 13. Beutler, B., & Poltorak, A. (2001): Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit. Care Medicine* 29, 2-6.
 14. Bluthe, R. M., Walter, V., Parnet, P., Laye, S., Lestage, J., Verrier, D., Poole, S., Stenning, B. E., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (1994): Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C. R. Acad. Sci. III* 317, 499-503.
 15. Bobjer, J., Katrinaki, M., Tsatsanis, C., Lundberg Giwercman, Y., Giwercman, A. (2013): Negative Association between Testosterone Concentration and Inflammatory Markers in Young Men: A Nested Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* 8(4), [e61466].
 16. Casimir, G. J. A., Heldenbergh, F., Hanssens, L., Mulier, S., Heinrichs, C., Lefevre, N., Desir, J., Corazza, F., & Duchateau, J. (2010): Gender differences and inflammation: an in vitro model of blood cells stimulation in prepubescent children. *J. Inflamm.* 7, 1-7.
 17. Chiu, I. M., von Hehn, C. A., & Woolf, C. J. (2012): Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat. Neurosci.* 15, 1063-1067.
 18. Choudhry, M. A., Bland, K. I., & Chaudry, I. H. (2007): Trauma and immune response-effect of gender differences. *Injury* 38, 1382-1391.
 19. Cook, M.B., McGlynn, K.A., Devesa, S.S., Freedman, N.D., Anderson, W.F. (2011): Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 20, 1629-1637.

20. Coyle, S. M., Calvano, S. E., & Lowry, S. F. (2006): Gender influences in vivo human responses to endotoxin. *Shock* 26, 538-543.
21. Dantzer, R. (2001): Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933, 222-234.
22. Dantzer, R. (2004): Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399-411.
23. Dantzer, R., Capuron, L., Irwin, M. R., Miller, A. H., Ollat, H., Perry, V. H., Rousey, S., & Yirmiya, R. (2008): Identification and treatment of symptoms associated with inflammation in medically ill patients. *Psychoneuroendocrinol.* 33, 18-29.
24. Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2007): Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.* 21, 153-160.
25. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008): From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 46-56.
26. Dayan, C.M., & Daniels, G. H. (1996): Chronic autoimmune Thyroiditis. *N. Engl. J. Med.* 335, 99-107.
27. DellaGioia, N., & Hannestad, J. (2010): A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. *Neurosci. Biobehav. Revi.* 34, 130-143.
28. Dunzendorfer, S., Lee, H. K., Soldau, K., & Tobias, P. S. (2004): Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J.* 18, 1117-1119.
29. Eskandari, F., Webster, J. I., & Sternberg, E. M. (2003): Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res. Ther.* 5, 251-265.
30. Fairweather, D., Frisancho-Kiss, S., & Rose, N. R. (2008): Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am. J. Pathol.*, 173, 600–609.
31. Franceschi, C., & Campisi, J. (2014): Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 69, 4-9.

32. Furman, D., Hejblum, B. P., Simon, N., Jovic, V., Dekker, C. L., Thiebaut, R., Tibshirani, R. J., & Davis, M. M. (2014): Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111, 869-874.
33. Gabay, C. (2006): Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 8, 3.
34. Grigoleit, J. S., Oberbeck, J. R., Lichte, P., Kobbe, P., Wolf, O. T., Montag, T., del Rey, A., Gizewski, E. R., Engler, H., & Schedlowski, M. (2010): Lipopolysaccharide-induced experimental immune activation does not impair memory functions in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 561-567.
35. Hannah, M. G., Bajic, V. B. & Klein, S. L. (2008): Sex differences in the recognition of an innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain Behav. Immun.* 22, 503-516.
36. Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012): Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. *Neuropsychopharmacol.* 37, 137-162.
37. Heffner, K. L. (2011). Neuroendocrine Effects of Stress on Immunity in the Elderly: Implications for Inflammatory Disease. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 31, 95-108.
38. Heyen, J. R., Ye, S., Finck, B. N., & Johnson, R. W. (2000): Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 77, 138-147.
39. Hopkins, S. J. (2007): Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. *Acta Biomed*, 78, 231-247.
40. Kalinchenko, S.Y., Tishova, Y. A., Mskhalaya, G. J., Gooren, L. J. G., Giltay, E. J., Saad, F. (2010): Effects of testosterone supplementation on markers of the metabolic syndrome and inflammation in hypogonadal men with the metabolic syndrome: the double-blinded placebo-controlled Moscow study. *Clin. Endocrinol.* 73, 602-612.
41. Kanterman, J., Sade-Feldman, M., & Baniyash, M. (2012): New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Semin. Cancer Biol.* 22, 307-318.
42. Kawai, T., & Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunol.* 11, 373-384.

43. Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005): Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 768-768.
44. Keyel, P. A. (2014): How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* 69, 136-145.
45. Kitchens, R. L., & Thompson, P. A. (2005): Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endo. Res.* 11, 225-229.
46. Klein, S. L. (2012): Immune cells have sex and so should journal articles. *Endocrinology*, 153, 2544-2550.
47. Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016): Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 626-638.
48. Klein, S. L., Jedlicka, A., & Pekosz, A. (2010): The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect. Dis.* 10, 338-349.
49. Kullmann, J. S., Grigoleit, J.-S., & Schedlowski, M. (2011): Effekte Akuter Entzündungsreaktionen auf Gedächtnisleistungen, Befindlichkeiten und Neurale Aktivitäten. *Zeitschri. Med. Psychol.* 20, 108-117.
50. Kullmann, J. S., Grigoleit, J. S., Wolf, O. T., Engler, H., Oberbeck, R., Elsenbruch, S., Forsting, M., Schedlowski, M., & Gizewski, E. R. (2014): Experimental human endotoxemia enhances brain activity during social cognition. *Soc. Cogn. Affect Neurosci.* 9, 786-793.
51. Larson, S. J., & Dunn, A. J. (2001): Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav. Immun.* 15, 371-387.
52. Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.
53. Lucas, A., Cobelens, P. M., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Holtmann, G., Haag, S., Gerken, G., Langhorst, J., Dobos, G. J., Schedlowski, M., & Elsenbruch, S. (2007). Disturbed in vitro adrenergic modulation of cytokine production in inflammatory bowel diseases in remission. *J. of Neuroimmunol.* 182, 195-203.
54. Lucas, K., & Maes, M. (2013): Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.* 48, 190-204.

55. Maes, M., Berk, M., Goehler, L., Song, C., Anderson, G., Galecki, P., Leonard, B., (2012): Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med.*, 10, 66.
56. Marriott, I., & Huet-Hudson, Y. M. (2006): Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol. Res.* 34, 177-192.
57. Maxime, V., Siami, S., & Annane, D. (2007): Metabolism modulators in sepsis: The abnormal pituitary response. *Critical Care Medicine*, 35, S596-S601.
58. Medzhitov, R. (2010). Inflammation (2010): new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-776.
59. Meisel, C., Schwab, J. M., Prass, K., Meisel, A., & Dirnagl, U. (2005): Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 775-786.
60. Mogil, J. S. (2012): Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 859-866.
61. Moieni, M., Irwin, M. R., Jevtic, I., Olmstead, R., Breen, E. C., & Eisenberger, N. I. (2015): Sex Differences in Depressive and Socioemotional Responses to an Inflammatory Challenge: Implications for Sex Differences in Depression. *Neuropsychopharmacol.* 40, 1709-1716.
62. Nance, D. M., & Sanders, V. M. (2007): Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behavior and Immunity*, 21, 736-745.
63. Needham, B. D., & Trent, M. S. (2013): Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Rev. Microbiol.* 11, 467-481.
64. O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2012): microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 295-312.
65. Ortega-Gomez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013): Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol. Med.* 5, 661-674.
66. Overman, C. L., Hartkamp, A., Bossema, E. R., Bijl, M., Godaert, G. L. R., Bijlsma, J. W. J., Derksen, R. H. W. M., & Geenen, R. (2012): Fatigue in patients with systemic lupus erythematosus: the role of dehydroepiandrosterone sulphate. *Lupus* 21, 1515-1521.
67. Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E. K. L., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S. N., & Beutler, B. (1998): Genetic and Physical Mapping

- of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region. *Blood Cells Mol. Dis.* 24, 340-355.
68. Poon, D. C., Ho, Y. S., Chiu, K., Wong, H. L., & Chang, R. C. (2015): Sickness: From the focus on cytokines, prostaglandins, and complement factors to the perspectives of neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 57, 30-45.
69. Pratschke, S., von Dossow-Hanfstingl, V., Dietz, J., Schneider, C. P., Tufman, A., Albertsmeier, M., Winter, H., & Angele, M. K. (2014): Dehydroepiandrosterone modulates T-cell response after major abdominal surgery. *J. Surg. Res.* 189, 117-125.
70. Pruessner, J. C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., & Hellhammer, D. H. (2003): Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinol.* 28, 916-931.
71. Quan, N., Whiteside, M., & Herkenham, M. (1998): Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res.* 802, 189-197.
72. Richwine, A. F., Sparkman, N. L., Dilger, R. N., Buchanan, J. B., & Johnson, R. W. (2009): Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.* 23, 794-802.
73. Rief, W., Barsky, A. J., Glombiewski, J. A., Nestoriuc, Y., Glaesmer, H., & Braehler, E. (2011): Assessing general side effects in clinical trials: reference data from the general population. *Pharmacoepidemiol. Drug Safety* 20, 405-415.
74. Romeo, H. E., Tio, D. L., Rahman, S. U., Chiappelli, F., & Taylor, A. N. (2001): The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J. Neuroimmunol.* 115, 91-100.
75. Schedlowski, M., Engler, H., & Grigoleit, J.-S. (2014): Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: A model to disentangle immune-to-brain communication. *Brain Behav. Immunity.* 35, 1-8.
76. Schmitz, D., Kobbe, P., Wegner, A., Hammes, F., & Oberbeck, R. (2010): Dehydroepiandrosterone modulates survival and immune functions during sepsis depending on the way of drug administration. *Med. Chem.* 6, 229-232.

77. Schroder, J., Kahlke, V., Staubach, K. H., Zabel, P., & Stuber, F. (1998): Gender differences in human sepsis. *Arch. Surg.* 133, 1200-1205.
78. Shattuck, E.C., Muehlenbein, M.P. (2016): Towards an Integrative Picture of Human Sickness Behavior, Brain, Behavior, and Immunity, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.00>
79. Silverman, M. N., Pearce, B. D., Biron, C. A., & Miller, A. H. (2005): Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 18, 41-78.
80. Sternberg, E. M. (2006): Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 318-328.
81. Suarez, A. L. P., Lopez-Rincon, G., Neri, P. A. M., & Estrada-Chavez, C. (2015): Prolactin in Inflammatory Response. *Adv. Exp. Med. Bio.* 846, 243-264.
82. Tam, A., Morrish, D., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S. P., & Sin, D. D. (2011): The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Womens Health* 11, 24.
83. Tracey, K. J. (2009): Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418-428.
84. Tracey, K. J. (2010): Understanding immunity requires more than immunology. *Nat. Immunol.* 11, 561-564.
85. van Eijk, L. T., Dorresteijn, M. J., Smits, P., van der Hoeven, J. G., Netea, M. G., & Pickkers, P. (2007): Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers. *Crit. Care Med.* 35, 1464-1469.
86. Vardas, K., Apostolou, K., Briassouli, E., Goukos, D., Psarra, K., Botoula, E., Tsagarakis, S., Magira, E., Routsis, C., Nanas, S., & Briassoulis, G. (2014): Early Response Roles for Prolactin Cortisol and Circulating and Cellular Levels of Heat Shock Proteins 72 and 90 alpha in Severe Sepsis and SIRS. *Biomed. Res. Internat.*, Artikel ID 803561, 8.
87. Villacres, M. C., Longmate, J., Auge, C., & Diamond, D. J. (2004): Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: Evidence for gender differences in cytokine secretion. *Human Immunol.* 65, 476-485.
88. Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000): Cytokine signals propagate through the brain. *Mol. Psych.* 5, 604-615.

89. Viveros-Paredes, J. M., Puebla-Perez, A. M., Gutierrez-Coronado, O., Sandoval-Ramirez, L., & Villasenor-Garcia, M. M. (2006): Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. *Internat-Immunopharmacol.* 6, 774-781.
90. Vom Steeg, L., & Klein, S. L. (2016): Sex matters in infectious diseases pathogenesis. *PLoS Pathog.* 12 (2), [e1005374].
91. Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Mooney-Heiberger, K., Martinez, J., Furness, L., Smith, K. P., & Maier, S. F. (1994): Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 639, 283-299.
92. Weismuller, K., Bauer, M., Hofer, S., & Weigand, M. A. (2010): The neuroendocrine axis and the pathophysiology of sepsis. *Anasth. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 45, 574-578.
93. Whitacre, C. C. (2001): Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunol.* 2, 777-780.
94. Wohltmann, C. D., Franklin, G. A., Boaz, P. W., Luchette, F. A., Kearney, P. A., Richardson, J. D., & Spain, D. A. (2001): A multicenter evaluation of whether gender dimorphism affects survival after trauma. *Am. J. Surg.* 181, 297-300.
95. Wright, C. E., Strike, P. C., Brydon, L., & Steptoe, A. (2005): Acute inflammation and negative mood: mediation by cytokine activation. *Brain Behav. Immun.* 19, 345-350.
96. Wu, Z., Li, L. L., Zheng, L. T., Xu, Z. H., Guo, L., & Zhen, X. C. (2015): Allosteric modulation of sigma-1 receptors by SKF83959 inhibits microglia-mediated inflammation. *J. Neurochem.* 134, 904-914.
97. Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Imm.*, 25, 181-213.
98. Zhang, J. M., & An, J. (2007): Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27-37.
99. Zigmond, A. S., & Snaith, R. P. (1983): The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr. Scand.* 67, 361-370.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	<i>Adrenocorticotropes Hormon</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BD	Blutdruck
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	<i>Body mass index</i>
°C	Grad Celsius
CA	Katecholamin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Unterscheidungsgruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale)
CORT	Cortisol
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormon</i>
CRP	C-reaktives Protein
DEXA	Dexamethason
DHEA	Dehydroepiandrosteron
E. coli	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzym linked immunosorbent Assay</i>
EU	<i>Endotoxin Units</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GASE	<i>Genetic Assessment of Side Effects</i>
GC	Glukokortikoid
GICN	D-Glukosamin
HADS	<i>Hospital Anxiety and Depression Scale</i>
HCT	Hämatokrit
Hep	L-Glycero-D-Manno-Heptose
HF	Herzfrequenz
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden
IFN	Interferon
IL	Interleukin

IL-1ra	<i>Interleukin-1 Receptor Agonist</i>
IRAK	<i>IL-1-Receptor-Associated Kinase</i>
KDO	2-Keto-3-Desoxyoctonsäure
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LEUK	Leukozyten
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDBF	Mehrdimensionaler Befindlichkeits-Fragebogen
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein- 1</i>
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NA	Noradrenalin
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i> (Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen)
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B-cells</i> (Transkriptionsfaktor aktivierter B-Zellen)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
P	Phosphat
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PRL	Prolaktin
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
SEM	Standardfehler
SNS	Sympathisches Nervensystem
STAI	<i>State-Trait Anxiety Inventory</i>
TERB	Terbutalin
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
TLS	Thorakolumbales System
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (Tumornekrosefaktor- α)
TRA	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors</i>
TRIF	<i>TIR Domain Containing Adapter Protein Inducing IFNβ</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bidirektionale Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem	S. 5
Abb. 2: Aufbau eines gramnegativen Bakteriums	S. 13
Abb. 3: LPS Signalweg	S. 15
Abb. 4: Körpertemperatur und Differenzialblutbild	S. 34
Abb. 5: Inflammatorische Reaktion	S. 35
Abb. 6: Neuroendokrine Reaktion	S. 37
Abb. 7: Psychologische Parameter	S. 39
Abb. 8: Sensitivität der Zellen	S. 42

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Soziodemographische Daten der ersten Probandengruppe	S. 31
Tab. 2: Klinische Daten	S. 32
Tab. 3: Berechnung der AUC_G der inflammatorischen Parameter	S. 36
Tab. 4: Berechnung der AUC_G der neuroendokrinen Parameter	S. 38
Tab. 5: Soziodemographische Daten der zweiten Probandengruppe	S. 40

7.4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Harald Engler für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas sowie die hervorragende Betreuung meines Dissertationsprojekts. Seine Unterstützung, die stets freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Sigrid Elsenbruch für die kooperative Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Zeit am Institut.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. Sven Benson, der mit mir zusammen viele interessante Projekte durchgeführt hat und mich stets fachlich und freundschaftlich unterstützte.

Bei Herrn Dr. Alexander Wegner und Elisa Engelbrecht möchte ich mich herzlich für die kooperative Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Stunden bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin dem gesamten Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie für das angenehme Arbeitsumfeld, die perfekte Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft. Zudem möchte ich mich bei allen anderen Personen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen, mich unterstützt und maßgeblich zum Gelingen dieses Dissertationsprojekts beigetragen haben.

Zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung und den stetigen Rückhalt während meiner gesamten Ausbildung und allen sonstigen Lebenslagen bedanken.

7.5. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.