

Klinik und Poliklinik der Neurologie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Effekt einer Depletion regulatorischer T-Zellen auf die Schlaganfall-induzierte
Apoptose von Leukozytensubpopulationen in der murinen Milz**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2017

vorgelegt von: Nina Annika Herz

geb. am: 24.05. 1995

in: Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Dressel

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Bitsch

Tag der Disputation: 02.02.2021

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	I
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
IV. TABELLENVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	6
1.1. Grundlagen des Immunsystems	6
1.2. Regulatorische T-Zellen	7
1.3. Immunologische Folgen eines ischämischen zerebralen Infarkts	9
1.3.1. Lokale Auswirkung des Infarkts	9
1.3.2. Immunologische Manifestation in der Peripherie	10
1.4. Verbindung zwischen Immunsystems und zentralem Nervensystem	11
1.5. Mechanismus der Schlaganfall-induzierten Immunsuppression	12
1.6. Milzreaktion auf einen Schlaganfall	13
1.7. Reaktion der regulatorischen T-Zellen auf den ischämischen Infarkt	15
2 ZIELE DER ARBEIT	18
3 MATERIAL	19
3.1. Laborgeräte und Software	19
3.2. Verbrauchsmaterialien	19
3.3. Reagenzien und Chemikalien	20
3.4. Puffer und Lösungen	20
3.5. Antikörper	21
4 METHODE	22
4.1. Mausmodell	22
4.2. Vorgehen	22
4.2.1. Depletion regulatorischer T-Zellen	22

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Transiente mittlere zerebral-Arterienokklusion (tMCAO)	23
4.2.3	Postoperative Versorgung der Mäuse	24
4.2.5	Herstellung der Gewebsschnitte	24
4.2.6	Immunhistochemische Färbung von Leukozytenpopulationen	25
5	ERGEBNISSE	31
5.1.	Die Färbungen	31
5.2.	Vergleichsfärbung von Dereg- und BL6-Tieren im zeitlichen Verlauf bei „jungen“ Mäusen	36
5.2.1.	Apoptosedichte ausgewählter Lymphozytenpopulationen	36
5.2.2.	Zusammenhang von Apoptosedichte und Schlaganfallvolumen	37
5.3.	Vergleichsfärbung von Dereg- und BL6-Tieren in „alten“ Mäusen	39
5.3.1.	Apoptotische Dichte ausgewählter Populationen	39
5.3.2.	Korrelation von apoptotischer Dichte und Infarkt volumen	40
5.3.3.	Korrelation von Apoptosedichte und Milzvolumen	42
5.4.	Vergleich von „jungen“ und „alten“ Tieren	44
5.4.1.	Apoptosedichte ausgewählter Zellpopulationen	44
5.4.2.	Korrelation von Apoptosedichte und Schlaganfallvolumen	45
5.4.3.	Korrelation von Apoptosedichte und Milzvolumen	47
6	DISKUSSION	49
6.1.	Vergleichsfärbung zwischen Dereg- und BL6-Tieren im zeitlichen Verlauf	49
6.2.	Zusammenhang zwischen Apoptosedichte und Infarkt volumen	51
6.3.	Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und Milzvolumen	51
6.4.	Unterschiede in der Apoptose von Dereg- und BL6-Tieren bei „alten“ und „jungen“ Mäusen	52
6.5.	Limitationen der Arbeit	53
6.6.	Ausblick	53
7	ZUSAMMENFASSUNG	55
8	LITERATURVERZEICHNIS	56
9	ANHANG	65
10	DANKSAGUNG	69

II. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
A. dest.	Aqua destillatum
BL6	C57BL/6 Mausstamm
BP	Blockpuffer
BSA	Bovines Serumalbumin
CCA	Common Carotid Artery / Arteria carotis communis
CD	Cluster of Differentiation
CTL	Cytotoxische T Lymphozyten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dereg	<i>Depletion of regulatory T-Cell</i> , transgener Mausstamm
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FoxP3	Forkhead Box-Protein 3
HHNA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- Achse
ICA	Internal Carotid Artery / Arteria carotis interna
IL	Interleukin
mAB	Monoclonal Antibody
MCA	Middle Cerebral Artery / Arteria cerebri media
NGS	Normal Goat Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodid
RP	Rocking Platform (Schüttler)
SNS	Sympathisches Nervensystem
Th1-/Th2-Zelle	T-Helferzelle Typ1/2
tMCAO	Transient Middle Cerebral Artery Occlusion
Treg	Regulatorische T-Zellen
TUNEL	Terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema der Treg-Differenzierung	8
Abbildung 2:	Darstellung der Gefäßarchitektur zur Versorgung des murinen Gehirns	24
Abbildung 3:	Darstellung der Färbungen zur Apoptose am Beispiel von CD11c ⁺ -Zellen in murinen Milzschnitten.....	29
Abbildung 4:	Auswertung der Färbungen zur Apoptose von CD3 ⁺ /CD4 ⁺ -Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren.....	32
Abbildung 5:	Auswertung der Färbungen zur Apoptose von Ly6G ⁺ -Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren.....	33
Abbildung 6:	Auswertung der Färbungen zur Apoptose von CD11c ⁺ -Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren.....	34
Abbildung 7:	Auswertung der Färbungen zur Apoptose von CD3 ⁺ /CD8 ⁺ -Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren.....	35
Abbildung 8:	Vergleich der Summe der apoptotischen Dichte: Dereg- vs. BL6-Tiere (naiv, D1, D3, D5).....	36
Abbildung 9:	Korrelation der apoptotischen Dichte mit dem Schlaganfallvolumen an Tag 1: Dereg- vs. BL6-Tiere.....	38
Abbildung 10:	Zusammenfassende Darstellung der Apoptose in „alten“ Tieren (D7 und D14)	40
Abbildung 11:	Korrelation von apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen bei „alten“ Tieren: Dereg- vs. BL6-Tiere (D7, D14).....	41
Abbildung 12:	Korrelation der apoptotischen Dichte mit dem Milzvolumen „alter“ Tiere: Dereg- vs. BL6-Tiere (D7, D14)	43
Abbildung 13:	Zusammenfassende Darstellung der apoptotischen Dichte in Dereg- vs. BL6-Tieren („alte“ und „junge“ Tiere, D14).....	44
Abbildung 14:	Korrelation von apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ und „junge“ Tiere, D14).....	46
Abbildung 15:	Korrelation von apoptotischer Dichte und Milzvolumen: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ und „junge“ Tiere, D14).....	48
Abbildung A1:	Apoptotische Dichte: Dereg- vs. BL6-Tiere (naiv, D1, D3, D5)	66
Abbildung A2:	Korrelation von apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ Tiere, D7, D14).....	67
Abbildung A3:	Apoptotische Dichte: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ und „junge“ Tiere, D14).....	68

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte und Software	19
Tabelle 2:	In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3:	In dieser Arbeit verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	20
Tabelle 4:	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen	20
Tabelle 5:	Für Vergleichsfärbungen zur Apoptose von Leukozyten in Dereg- und BL6-Tieren verwendete Antikörper	21
Tabelle 6:	Antikörper-Verdünnung.....	29

1 Einleitung

Das gesunde Hirnparenchym verfügt über einen besonderen Schutz, der unter anderem durch die Selektivität der Blut-Hirn-Schranke erreicht wird. Kommt es jedoch zum Verschluss eines Gefäßes im Gehirn, etwa durch u. a. arteriosklerotisch verkalkte Gefäße oder Thromben, führt dies in dessen Versorgungsgebiet zur Minderdurchblutung. Die Folge der Ischämie nach einem zerebralen Infarkt ist der lokale Verlust der Blut-Hirn-Schranke, die auch eine immunologische Barriere darstellt. Dadurch kann es zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion kommen, was hypoxische Konsequenzen, wie Neurodegeneration und Funktionsverlust, noch verstärkt.

Darüber hinaus wirkt sich das zerebrale Geschehen auf das periphere Immunsystem, wie z. B. die Milz, aus. Auch wurde eine generalisierte Immunsuppression beobachtet, wobei besonders die regulatorischen T-Zellen, als Vertreter der zellulären Abwehr, von Bedeutung zu sein scheinen (Liesz *et al.*, 2009 b).

1.1. Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem lässt sich in einen angeborenen, von Geburt an schnell verfügbaren, und einen adaptiven, erworbenen Anteil unterteilen. Diese Zuordnung ist jedoch vereinfacht, nur durch Interaktion beider Systemanteile kann ein optimaler Schutz gewährleistet werden. In enger Zusammenarbeit können die beiden Systeme den Körper vor schädigenden Einflüssen schützen. Bei einem Schlaganfall gerät dieses Zusammenspiel jedoch aus dem Gleichgewicht.

Beide Systeme bestehen sowohl aus einem humoralen als auch einem zellulären Anteil. Zum schnell verfügbaren angeborenen und unspezifischen System gehören myeloide Zellen, wie Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten. Auch die von den Immunzellen sezernierten humoralen Interleukine und Zytokine tragen zum Immungeschehen bei. Die zelluläre Abwehr des adaptiven Systems, das erst im späteren Verlauf der Immunreaktion seine Funktionalität erreicht, wird primär durch die B- und T-Zellen gebildet. Die in dieser Arbeit betrachteten und mit dem Oberflächenmolekül CD3⁺ ausgestatteten T-Zellen stellen keine einheitliche Zellpopulation dar, sondern können in zytotoxische CD8⁺- und CD4⁺-Helferzellen (Th) unterschieden werden, die sich noch weiter differenzieren lassen.

1.2. Regulatorische T-Zellen

Immunzellen mit suppressiven Eigenschaften und den Oberflächenmolekülen CD3⁺, CD4⁺ und dem Transkriptionsfaktor FoxP3⁺ werden als regulatorische T-Zellen klassifiziert, die nach Prägungsort in natürliche und periphere Tregs unterschieden werden können (Hoepli *et al.*, 2015). Eine Übersicht der suppressiven Mechanismen verschiedener Tregs ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Die peripheren Tregs werden vermutlich durch spezielle Bedingungen, wie die spezifische Antigen-Stimulation, das Zytokin-Milieu und das Vorhandensein von Metaboliten, in ihrer Entwicklung, Funktion und Mobilisation beeinflusst (Hoepli *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013). Für beide Subpopulationen, die natürlichen und die peripheren Tregs, ist das Vorhandensein von IL-2 essentiell (Bluestone & Abbas, 2003). Der Transkriptionsfaktor FoxP3⁺ ist für die suppressiven Eigenschaften maßgeblich. Dies belegen Experimente an Mäusen mit sogenannten „wannabe-Tregs“, d. h. FoxP3⁻-Zellen, die trotz gleicher Entwicklung ihre Funktion nicht erfüllen können (Wan *et al.*, 2007; Williams & Rudensky, 2007).

Tregs zeichnen sich durch die Expression von FoxP3⁺ aus (Xu *et al.*, 2013), was als Marker zum Nachweis von Tregs gilt. Außerdem sind CD25⁺ und *Cytotoxic Lymphocyte associated Protein 4* charakteristisch (Hoepli *et al.*, 2015), wobei es in peripheren Tregs nur zu einer variablen Expression von CD25⁺ kommt (Bluestone & Abbas, 2003). Ihre Aktivierung erfolgt über den T-Zellrezeptor. Mithilfe von löslichen Mediatoren und Zellkontakten können Tregs andere Immunzellen hemmen und blockieren oder eine Produktion von antiinflammatorischen Substanzen induzieren (Xu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013). Das Vorkommen und die Bedeutung von FoxP3⁺ für diese Funktion konnte auch in humanen CD4⁺-CD25⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (Walker *et al.*, 2003).

Einleitung

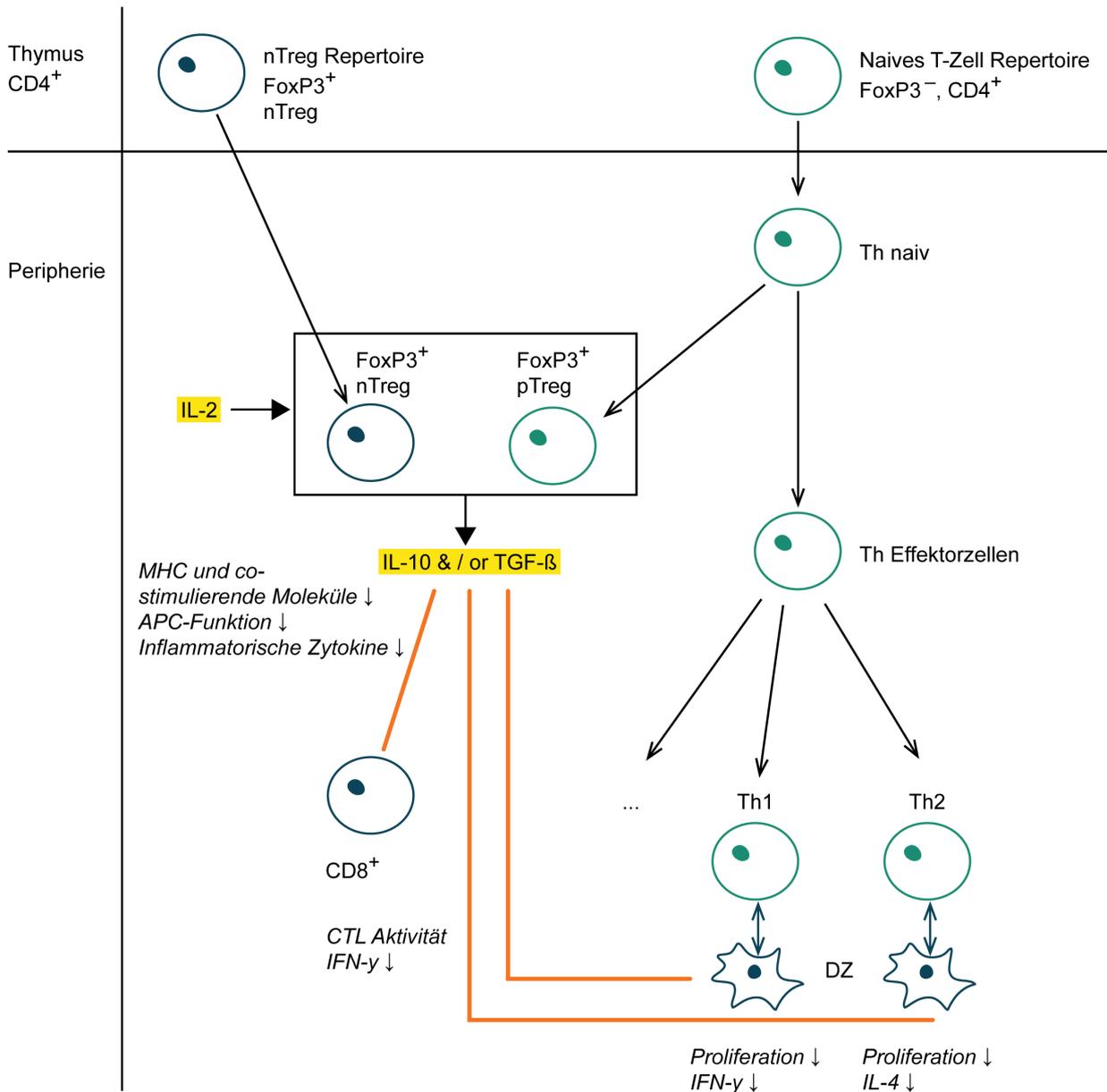


Abbildung 1: Schema der Treg-Differenzierung

Erläuterung: Im Thymus sind zwei Populationen von Tregs existent: die natürlichen FoxP3⁺-(n)Tregs und die naiven FoxP3⁻-CD4⁺-T-Zellen. In der Peripherie differenzieren sich die naiven T-Helferzellen: Während sich einige in Th-Effektorzellen verschiedener Klassen (z. B.: Th1 und Th2) entwickeln, werden andere zu peripheren FoxP3⁺-(p)Tregs. Zusammen mit den nTregs bilden sie das Treg-Repertoire der Peripherie. Unter Einfluss von IL-2 sezernieren diese verstärkt IL-10 und/oder TGF-β. Daraus resultiert eine Reduktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major Histocompatibility Complex = MHC) und der co-stimulierenden Moleküle, eine eingeschränkte Funktion der antigenpräsentierenden Zellen (APC) und eine verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine. Außerdem wirken IL-10 und TGF-β auf die CD8⁺-Zellen, die mit reduzierter Aktivität Zytotoxischer Lymphozyten (CTL) und verminderter Sekretion von IFN-γ reagieren. Unter Einfluss dieser Zytokine (IL-10, TGF-β) kommt es zu vermehrter Interaktion von Dendritischen Zellen (DZ) mit T-Helferzellen (Th1, Th2), was die Proliferation und Sekretion von IFN-γ und IL-4 negativ beeinflusst.

1.3. Immunologische Folgen eines ischämischen zerebralen Infarkts

1.3.1. Lokale Auswirkung des Infarkts

Die lokale Folge der Ischämie nach einem zerebralen Infarkt ist der Untergang von Hirnparenchym, der mit einem Verlust der Integrität der Blut-Hirn-Schranke einhergeht. Die sonst schützende Barriere wird infolgedessen für Lymphozyten durchlässig, die aus der Peripherie in das geschädigte Gewebe einwandern. Die Konsequenz ist eine lokale inflammatorische Reaktion, die mit Neurodegeneration und Funktionsverlust einhergeht.

Die Ly6G⁺-neutrophilen Granulozyten, als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, können 30 Minuten nach dem Schlaganfall in den zerebralen Gefäßen beobachtet werden (Garcia *et al.*, 1994) und wandern sechs Stunden später in das betroffene Gebiet ein (Akopov *et al.*, 1996). Es konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der Ly6G⁺-Zellen und der Infarktgröße gezeigt werden (Akopov *et al.*, 1996). Die neutrophilen Granulozyten haben durch Phagozytose und Produktion von Enzymen eine destruktive Wirkung auf die Blut-Hirn-Schranke (Ning *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006). Ihre selektive Eliminierung führt zur Reduktion des Infarktvolumens (Matsuo *et al.*, 1994).

Die dendritischen Zellen, die auch im Infarktgebiet nachweisbar sind (Stubbe, 2013), stellen, u. a. durch Aktivierung der T-Zellen, eine Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr her. Ein Subtyp, die myeloiden dendritischen CD11c⁺-Zellen, fördern vorrangig die Determinierung der CD4⁺-Zellen zu Th1-Zellen (Witsch *et al.*, 2002), die in ihrer Funktion entzündungsfördernde Interleukine, wie IL-6, sezernieren (Sundberg *et al.*, 2009; Dumitriu *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2006). Es konnte jedoch in zahlreichen Arbeiten beobachtet werden, dass ein antiinflammatorisches Zytokin-Milieu sowie die Anwesenheit von CD11c⁺-Zellen die Differenzierung zu Th2-Zellen fördern (Moore *et al.*, 2001; Arques *et al.*, 2008).

Im Bereich des Infarktgeschehens ist außerdem das Vorhandensein von Tregs evident (Stubbe, 2014), welche die unter 1.2 beschriebenen Funktionen erfüllen. Darüber hinaus sind lokal weitere Moleküle vorhanden, wie zum Beispiel das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1), auf dessen Rolle im folgendem Abschnitt eingegangen wird.

1.3.2. Immunologische Manifestation in der Peripherie

Nach einem Schlaganfall leiden 25 bis 65 % der Patienten an sekundären Infektionen (Chamorro *et al.*, 2007 a, b; Sippel *et al.*, 2015), die den Krankheitsverlauf und die Genesung negativ beeinflussen. Klinische Studien zeigen, dass diese Risikoerhöhung für das Auftreten von Infektionen aus dem Schlaganfallereignis und der Reaktion des Immunsystems resultiert und nicht allein als eine Begleiterscheinung des stationären Aufenthaltes mit Bettlägerigkeit zu erklären ist (Vogelgesang *et al.*, 2008; Chamorro *et al.*, 2007 a, b). Diese immunologische Manifestation nach Schädigung des zentralen Nervensystems macht die Bedeutung der Immunantwort auf den Schlaganfall deutlich.

Im peripheren Gewebe lassen sich nach einem Schlaganfall unterschiedliche Reaktionen beobachten. Es kann eine Suppression in Form einer Lymphozytopenie gefolgt von einer Atrophie lymphatischer Organe (Offner *et al.*, 2009) beobachtet werden. Im Tiermodell sind außerdem die beeinträchtigte Aktivierung, die verringerte Funktionalität myeloider Zellen, eine mitogeninduzierte Proliferation und eine Zytokinproduktion von T- und natürlichen Killerzellen evident (Mracsko *et al.*, 2014; Offner *et al.*, 2009; Famakin, 2014). Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für sekundäre Infektionen (Dirnagl *et al.*, 2007), die das supprimierte Immunsystem jedoch aktivieren. Die Immunreaktion führt unter anderem zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße, wodurch die Rekrutierung von Immunzellen, die das Zytokinmilieu verändern, erleichtert wird. Dies könnte zu sekundärem Infarktwachstum beitragen und das Hirnparenchym weiter schädigen (Vogelgesang *et al.*, 2014), was sich negativ auf die Genesung der Patienten auswirkt.

Andererseits ist eine Aktivierung des Immunsystems, zum Beispiel in Form der Aktivierung von T-Zellen (Vogelgesang *et al.*, 2010), nachweisbar. Dies erfolgt durch die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen über Adhäsionsmoleküle und den T-Zell-Rezeptor und führt zu einer Aktivierung der CD8⁺- und CD4⁺-Zellen. Die zytotoxische CD8⁺-Zelle hat zusätzlich zu ihrer lytischen Funktion auch Einfluss auf die Differenzierung der CD4⁺-Helferzelle (Vukmanovic-Stejić *et al.*, 2000, 2001; Noble *et al.*, 1995). Letztere können dann entweder als Th1-Zellen die humorale oder als Th2-Zellen die zelluläre Immunantwort beeinflussen.

Ein wichtiger Indikator für das Outcome scheinen auch die im Serum befindlichen Zytokine sowie das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) zu sein (Vogelgesang *et al.*, 2010; Liesz *et al.*, 2015). Letzteres wird nach einem ischämischen Infarkt proportional zu der Menge des nekrotischen Gewebes von verschiedenen Zellen, u. a. T-Zellen, sezerniert (Scaffidi *et al.*, 2002; Erlandsson *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2008). Eine erhöhte Konzentration geht mit einer starken

proinflammatorischen Reaktion einher und verschiebt das T-Zell-Gleichgewicht zugunsten von Th1-Zellen, welche die Entzündung verstärken. Diese Wirkung erzielt HMGB1 in seiner Funktion als Zytokin sowie durch den begünstigenden Einfluss auf die Bindung anderer proinflammatorischer Mediatoren an spezifische Rezeptoren, was zur Aktivierung weiterer Zellen führt (Lotze & Tracey, 2005).

Eine Erklärung für die Beobachtung von Suppression und Aktivierung bietet die Zwei-Phasentheorie von Offner (Offner *et al.*, 2009). Ergebnisse aus aktuellen Forschungsarbeiten machen es jedoch erforderlich, auch alternative Mechanismen zu diskutieren (Zierath *et al.*, 2013). Auf beide Deutungsvarianten wird im späteren Verlauf (siehe Kapitel 1.5) noch näher eingegangen.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Verbindung des zerebralen Infarktgeschehens mit den systemisch immunologischen Folgen betrachtet.

1.4. Verbindung zwischen Immunsystems und zentralem Nervensystem

Der enge bidirektionale Austausch zwischen Immunsystem und zentralem Nervensystem erfolgt unter anderem über die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) sowie über das sympathische und parasympathische Nervensystem (SNS) (Elenkov *et al.*, 2000).

Einer der Ursprünge der HHNA ist im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus lokalisiert. Nach Stimulation durch Zytokine produziert dieser den Corticotropen Releasing Faktor (CRF). Über weitere Zwischenstufen kommt es zur Bildung von Adrenocorticotrophem Hormon (ACTH), was die Nebennierenrinde zur Sekretion von Glukokortikoiden veranlasst. Diese verhindern die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Wilckens & De Rijk, 1997) und fördern die Sekretion von antiinflammatorischen Mediatoren (Barrat *et al.*, 2002). Dies stellt einen neuroendokrinen Weg der Kommunikation dar, der mit dem parasympathischen cholinergen System verbunden ist, dessen Aktivierung die Ausschüttung von Zytokinen verhindert und somit suppressive Wirkung hat (Pavlov *et al.*, 2003). Bei Aktivierung des Sympathikus kommt es zur Sekretion von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark, worauf im folgenden Abschnitt 1.5 eingegangen wird.

1.5. Mechanismus der Schlaganfall-induzierten Immunsuppression

Das geschädigte Hirnparenchym reagiert direkt nach dem Infarkt mit der Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, die zur Hochregulation von proinflammatorischen Genen führen. Es resultieren erhöhte Konzentrationen u. a. von Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Liu *et al.*, 1994), Interleukin-1 β (IL-1 β) (Liu *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994) und Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Kim *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). Diese Stoffe fördern den verstärkten Einbau von Adhäsionsmolekülen in das Endothel, was die Infiltration von Leukozyten erleichtert (Barone & Feuerstein, 1999), die ihrerseits Zytokine sezernieren. Offner vermutet, dass die Immunantwort biphasisch verläuft: Die erste Phase ist geprägt durch einen starken Anstieg von Leukozyten und deren Sekretion von Zytokinen. Interleukin-1 β aktiviert sowohl die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) als auch das sympathische Nervensystem (SNS) (Offner *et al.*, 2009). Die Aktivierung von HHNA und SNS zeigt sich in der erhöhten Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark (Ajmo *et al.*, 2009; Prass *et al.*, 2003) sowie in einem Anstieg der aus der Nebennierenrinde freigesetzten Glukokortikoiden ins Plasma (Dirnagl *et al.*, 2007). Eine Erhöhung von Cortisol- und Katecholaminwerten im Serum ist sowohl im Tiermodell als auch bei Schlaganfallpatienten evident (Famakin, 2014; Mracsko *et al.*, 2014). Dass diese Erhöhung im Zusammenhang mit einer Immunsuppression steht, zeigen experimentelle Studien und Patientendaten. Dies stellt aus Sicht von Offner die zweite Phase dar (Offner *et al.*, 2009) und erhöht das Risiko für eine Sekundärinfektion (Vogelgesang *et al.*, 2014). SNS und HHNA beeinflussen die Funktionen des Immunsystems und tragen zur Immunsuppression bei. Dies belegen auch Experimente mit pharmakologisch blockierten Adreno- und Glukokortikoidrezeptoren. Grund für die verstärkte Lymphozytopenie nach ischämischem Infarkt könnte die im Vergleich zu den Monozyten und Granulozyten stärkere Expression von Glukokortikoidrezeptoren auf den Lymphozyten sein.

Allerdings steht die Reihenfolge der Ereignisse noch zur Diskussion: Ausgehen könnte die Reaktion auch von der Peripherie, von wo aus die Lymphozyten den Outcome des Schlaganfalls beeinflussen (Zierath *et al.*, 2013). Der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht nicht nur die Infiltration von Zellen in das Gehirn, sondern lässt auch hirnspezifische Antigene, wie das Myelin Basic Protein (MBP), in die Peripherie frei. Es konnte gezeigt werden, dass nach zusätzlicher Infektion bzw. experimenteller Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) die Th1-Reaktion verstärkt wird (Becker *et al.*, 2005). Evident ist auch, dass die Th1-Reaktion auf MBP mit einem negativen Outcome assoziiert ist (Becker *et al.*, 2005; Gee *et al.*, 2008, 2009).

Ob MBP eine Marker- oder eine Mediatorrolle zukommt, gilt es noch zu untersuchen (Zierath *et al.*, 2013).

Neuere Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass es sich um einen selbstverstärkenden Mechanismus handelt (Vogelgesang *et al.*, 2014). Als Folge des Infarkts kommt es demnach lokal zu einer Verschiebung des schützenden antiinflammatorischen zugunsten eines proinflammatorischen Milieus (Iadecola & Anrathner, 2012). Simultan kommt es in der Peripherie zu einer Immunsuppression durch erhöhte Katecholamin- und Steroidwerte, die u. a. mit verstärkter Apoptose einhergehen (Prass *et al.*, 2003) und schließlich eine sekundäre bakterielle Infektion begünstigen (Vogelgesang *et al.*, 2014; Offner *et al.*, 2009). Die verantwortlichen Bakterien tragen Oberflächenmoleküle, die durch das Immunsystem erkannt werden, welches mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen reagiert. Diese können nach dem durch den Infarkt bedingten Verlust der Blut-Hirn-Schranke zum sekundären Infarktwachstum beitragen (Becker *et al.*, 2005; Zierath *et al.*, 2013).

1.6. Milzreaktion auf einen Schlaganfall

Lymphatische Organe wie die Milz sind auch direkt sympathisch innerviert. Folglich kommt es nach dem Infarkt in der Milz zu einem Anstieg der Katecholamin-Konzentration (Ajmo *et al.*, 2009). Die Immunantwort nach Schädigung des zentralen Nervensystems, wie einem zerebralen Infarkt, führt zu einer Reaktion der stark sympathisch innervierten lymphatischen Organe.

Die Milz, als wichtiges Reservoir von Immunzellen, ist für die sekundäre Immunantwort von zentraler Bedeutung. Lokal wird die Milz vom SNS über die Transmitterfreisetzung aktiviert (Bellinger *et al.*, 2008). Sie wird jedoch auch durch periphere Veränderungen, die von Katecholaminen und Glukokortikoiden der Nebennieren vermittelt werden, beeinflusst. Dieser Mechanismus konnte durch die Blockade der Adrenorezeptoren nachgewiesen werden, wodurch die Atrophie der Milz verhindert werden kann. Dieser Effekt deutet auf den Einfluss von Katecholaminen auf die Mobilisation (Winklewski *et al.*, 2014) und die Apoptose der Leukozyten hin, was ursächlich für das verringerte Milzvolumen zu sein scheint. Die Auswanderung von Leukozyten aus der Milz in das geschädigte Gewebe wurde auch durch Experimente von Bronte und Pittet belegt (Bronte & Pittet 2013). In anderen Tierexperimenten wurde nach Induktion eines Schlaganfalls eine Atrophie der Milz beobachtet (Offner *et al.*, 2006 b; Seifert *et al.*, 2013; Ajmo *et al.*, 2008). Zwischen der Größe des Infarkts und dem Ausmaß der Volumenreduktion besteht ein Zusammenhang (Vendrame *et al.*, 2006).

Zusätzlich zur beschriebenen zellulären Reaktion nimmt die Milz auch Einfluss über den humoralen Weg. Offner und andere zeigen, dass Splenozyten nach einem Infarkt mit verstärkter Produktion und Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen reagieren (Offner *et al.*, 2006 a; Offner *et al.*, 2006 b).

Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass die dendritischen Zellen in der Milz bei verstärkter Phagozytose von apoptotischen Zellen, die nach einem ischämischen Infarkt vermehrt entstehen, Zytokine wie z. B. IL-1 β sezernieren (Morelli *et al.*, 2003). Folglich trägt die Milz nach einem ischämischen Infarkt sowohl humoral als auch auf dem zellulären Weg zu sekundärem Infarkt-wachstum und Neurodegeneration bei.

Die Ergebnisse von Studien zur Splenektomie bestätigen den negativen Einfluss der Splenozyten. In Ratten konnte ein signifikanter 80%iger Rückgang des Infarktvolumens nach Splenektomie zwei Wochen vor Infarktinduktion mittels tMCAO nachgewiesen werden. Ajmo *et al.* haben die Reduktion von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und aktivierten Mikroglia beobachtet (Ajmo *et al.*, 2008). Auch Protokolle die eine nicht-invasive Irradiation der Milz vorsahen, führten zum gleichen Ergebnis (Ostrowski *et al.*, 2012). Dieser Effekt konnte bei nicht splenektomierten Tieren durch adoptiven Transfer von Splenozyten umgekehrt werden. Hierbei zeigte sich eine Zunahme von Infarktvolumen und neurologischen Defiziten (Jin *et al.*, 2013).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass es in den sekundären lymphatischen Organen, wie z. B. Milz und Thymus, zu einer erhöhten Frequenz apoptotischer Leukozyten verschiedenster Populationen kommt (Prass *et al.*, 2003; Offner *et al.*, 2006 b). Als Folge der reduzierten Zellzahl wird ab vier Tagen nach Infarkt eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine leichte Abschwächung der Immunantwort beobachtet. Von der erhöhten Apoptoserate sind besonders die in der Milz dominierenden CD19⁺-B-Zellen betroffen. Ihre Apoptose führt zu einem relativen Anstieg von CD4⁺-Zellen (Offner *et al.*, 2006 b). Eine Ausnahme stellen die Tregs dar. Diese zeigen 96 Stunden nach Infarktinduktion einen relativen Anstieg im Vergleich mit scheinoperierten und naiven Tieren (Offner *et al.*, 2006 b). Allerdings zeigt sich, dass neutrophile Granulozyten auf einen Infarkt mit verstärkter Ausschüttung von Arginase reagieren, was die Funktionalität der regulatorischen T-Zellen negativ beeinflusst (Sippel *et al.*, 2015).

1.7. Reaktion der regulatorischen T-Zellen auf den ischämischen Infarkt

Die Tregs vermitteln ihre immunsuppressiven Eigenschaften in mannigfaltiger Weise: Sie sezernieren zytolytische Moleküle, nehmen Zytokine auf, die für proinflammatorische Zellen essentiell sind, und hemmen direkte Effektoren. Lokal könnte durch diese Mechanismen die Inflammation und die Schädigung des Hirnparenchyms reduziert und sogar die Neurogenese gefördert werden. In der Peripherie könnte die antiinflammatorische Wirkung der Tregs eine Immunsuppression verstärken.

Ein ischämischer Infarkt wirkt sich sowohl auf die Quantität als auch auf die Funktionalität der peripheren regulatorischen T-Zellen aus. In Humanstudien beschreiben Xu et al. zwei Tage nach Infarkt einen zahlenmäßigen Rückgang von zirkulierenden Tregs und einen Anstieg ab dem siebenten Tag (Xu *et al.*, 2013). Andere Untersuchungen ergaben einen quantitativen Anstieg ab dem ersten Tag (Yan *et al.*, 2012). Dieser Trend wurde auch im Tiermodell nachgewiesen: Nach einem Schlaganfall findet sich im Blut ein Rückgang von regulatorischen T-Zellen, eine Normalisierung der Werte bis Tag drei (Kleinschnitz *et al.*, 2013), gefolgt von einem Anstieg ab Tag vier (Offner *et al.*, 2006 b).

In den tMCAO-Experimenten von Liesz et al. und der anschließenden Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie ist die Wirkung besonders in den ersten drei Tagen nach Infarkt evident, wenn die Zellen sich noch außerhalb des zentralen Nervensystems befinden (Liesz *et al.*, 2009 b).

Während Hug et al. sowohl für humane als auch für murine Tregs eine unveränderte Funktion und den Erhalt ihrer suppressiven Eigenschaft zeigen (Hug *et al.*, 2011), kommen neuere Untersuchungen zu konträren Ergebnissen. Die Studie von Yan et al. zeigt keine Beeinträchtigung der suppressiven Funktion der Tregs in weiblichen Patienten (Yan *et al.*, 2012), was auch durch weitere Arbeiten bestätigt wird (Ruhnau *et al.*, 2016). Das Ausmaß der Immunsuppression scheint jedoch nicht mit dem relativen Anstieg der Tregs zu korrelieren (Liesz *et al.*, 2015).

Welchen Effekt die regulatorischen T-Zellen nach einem ischämischen Infarkt auf die Apoptoserate der Splenozyten und die Reaktion der Milz haben, gilt es noch zu untersuchen.

Es wurden verschiedene Studien zur Depletion und Anreicherung von regulatorischen T-Zellen durchgeführt, um ihren Einfluss auf das Infarktvolumen und die neurologischen Defizite zu untersuchen. Diese erzielten unterschiedliche Ergebnisse: Als Folge der Depletion weist Liesz ein erhöhtes Schlaganfallvolumen nach (Liesz *et al.*, 2009 b; Liesz *et al.*, 2015), Kleinschnitz

erzielt konträre Ergebnisse (Kleinschnitz *et al.*, 2013). Andere Studien zeigen keinerlei Auswirkungen (Ren *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013 a). Eine Erklärung stellt das Ausmaß des Infarkts dar: Kleine Schlaganfallvolumina, die weniger als 40 % der Hemisphäre betreffen, führten zu protektivem Einfluss der Tregs, scheinbar verursacht durch die Produktion von IL-10 (Liesz *et al.*, 2009 b). Bei größerem Läsionsvolumen ist der Effekt der Treg-Depletion nicht mehr nachweisbar (Liesz *et al.*, 2015).

Des Weiteren zeigt sich, dass Tregs auch nicht-immunologisch das Hirnparenchym schädigen können. Infolge der Interaktion der Tregs mit aktivierten Endothelzellen kommt es zu Thrombusbildung und Reperfusionstörungen (Kleinschnitz *et al.*, 2013). Derartige mikrovaskuläre Dysfunktionen sind mit ihren Konsequenzen nur nach transientser mittlerer Zerebralarterienokklusion (tMCAO) evident und von methodischen Parametern abhängig (Gauberti & Vivien 2015), was einen weiteren Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Resultate in Treg-Anreicherungs-Experimenten bietet (Schuhmann *et al.*, 2015; Na *et al.*, 2014). Dies impliziert, dass bestimmte Bedingungen, wie zum Beispiel durch die tMCAO erzeugt, zu einem schädlichen Einfluss durch die Tregs führen können (Vogelgesang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2013).

Nach einem ischämischen Infarkt kommt es in dem geschädigten Gewebe infolge der Infiltration und Differenzierung von proliferierenden neuronalen Stammzellen (NSC) zur Neurogenese (Hermann *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2014). Nach Depletion der Tregs konnten eine supprimierte Neurogenese und ein verschlechtertes neurologisches Outcome beobachtet werden (Saino *et al.*, 2010), sodass den Tregs hier ein positiver Effekt auf die Neuroregeneration nach Schlaganfall zugeschrieben wird. Ein Mechanismus ist die Sekretion von IL-10 durch die Tregs. Dieses antiinflammatorische Interleukin IL-10 scheint auch für die neuronale Proliferation und Differenzierung essentiell zu sein (Murray, 2006; Saraiva & O'Garra, 2010; Ouyang *et al.*, 2011). Im Mausexperiment konnte gezeigt werden, dass die Injektion von IL-10 die Differenzierung der transplantierten NSCs fördert (Yang *et al.*, 2009). Auch die Ergebnisse von Wang und Jin belegen, dass die Neurogenese durch Immunzellen, u. a. die Tregs, gefördert wird (Wang & Jin, 2015).

Besonders groß ist dabei der Effekt, der durch aktivierte Tregs ausgeübt wird (Wang *et al.*, 2015 a). Als Marker für aktivierte Tregs wurde das Oberflächenmolekül CD39 identifiziert (Mandapathil *et al.*, 2009). Die Expression von CD39 ist altersabhängig (Ruhnau *et al.*, 2016), was zum einen auf Unterschiede der Immunreaktion im Alter hinweist und zum anderen bei der Interpretation sämtlicher Ergebnisse zu berücksichtigen ist.

Einleitung

Aufgrund der hier beschriebenen mannigfaltigen Hinweise auf eine zentrale Rolle der Tregs im Immungeschehen werden diese in der vorliegenden Arbeit näher untersucht, um zu einem besseren Verständnis der Folgen eines Schlaganfalls beizutragen.

2 Ziele der Arbeit

Die Immunantwort nach zerebralem ischämischen Infarkt wird wesentlich durch die Milz beeinflusst. Unter Verwendung der Treg-Depletion wird in dieser Arbeit ihr Einfluss auf die Apoptose verschiedener Leukozytenpopulationen in der Milz analysiert. Untersucht wird dies am Mausmodell mittels des experimentellen Schlaganfalls. Hierzu wird eine CD3⁺/CD4⁺-Doppelfärbung etabliert, um eine Aussage über das Apoptoseverhalten in Subpopulationen der T-Zellen treffen zu können. Der Vergleich der Apoptosedichte wird an Treg-depletierten und nicht-depletierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach ischämischem Infarkt durchgeführt. Außerdem wird geprüft, ob bzw. wie sich das Apoptoseverhalten von „jungem“ (= drei Monate alten) und „altem“ (= einjährigen) Mäusen unterscheidet. Untersucht wird auch, ob ein Zusammenhang zwischen Infarktvolumen und apoptotischer Dichte besteht.

3 Material

3.1. Laborgeräte und Software

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte und Software

Gerät	Bezugsquelle
BZ II Analyzer	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
BZ II Viewer	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Digitalwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Färbekammer	Simport, Bernad-Pilon, Kanada
Färbeküvetten	VWR, Hannover, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Keyence BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Graph Pad Prism 5	GraphPad, San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband / National Institutes of Health, Bethesda, USA
Mausthermometer	Testo AG, Lenzkirch, Deutschland
Mikrotom HM560	Thermo Scientific, Waltham, USA
pH-Messgerät	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Pipetten	Eppendorf Research plus, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer	Brand, Wertheim, Deutschland
Rocking Platform	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland

3.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Deckgläser	Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland
Einwegfilter 150 ml	Apogent Technologies, Rochester, USA
Glasgefäß klein	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Handschuhe	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Holz wattetupfer	Medizinischer Fachbedarf, Universität Greifswald, Deutschland
Labor- und Hygienetuch	ZVG, Troisdorf, Deutschland

Material

Mikrotomklingen	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pap pen (Wachsstift)	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Kisker Biotech, Steinfurt und Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland, BD, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Labortechnik, Krensmünster, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura, Zoeterwonde, Niederlande

3.3. Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien & Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Bovines Serumalbumin	Jackson Laboratories, Burlingame, USA
Diphtherie Toxin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNAse I	Roche, Basel, Schweiz
Ethanol	Chemsolute, Stuttgart, Deutschland
Fetal Calf Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glukose 5 % Infusionslösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Kalium-Chlorid (KCl)	ICN Biochemicals, Eschwege, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Liberase TL	Roche, Basel, Schweiz
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
In situ Cell Death Detection Kit TMR red	Roche, Basel, Schweiz

3.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
10x PBS, pH 7,4	<i>Aqua destillatum (A. dest.)</i> 1,37 M NaCl

Material

1x PBS	27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 18 mM KH ₂ PO ₄ 90 % A. dest. 10 % 10x PBS
4 % PFA, pH 7,5	100 ml A. dest. 4 g PFA
Blockpuffer	10 % NGS 90 % PBS
DNase I	1000 U/ml in 50 mM Tris-HCl (1 mg/ml BSA)
TUNEL-Reaction Mixture	10 % TUNEL <i>Enzyme Solution</i> 90 % TUNEL <i>Label Solution</i>

3.5. Antikörper

Tabelle 5: Für Vergleichsfärbungen zur Apoptose von Leukozyten in Dereg- und BL6-Tieren verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Bezugsquelle	Bestellnummer
Ratte α-Maus CD3 IgG2bκ FITC	17A2	BioLegend, San Diego, USA	100203
Ratte α-Maus CD8a IgG2aκ A647	53-6.7	BioLegend, San Diego, USA	100727
Armenischer Hamster – α-Maus CD11c IgG BV421	N418	BioLegend, San Diego, USA	117314
Ratte α-Maus CD169 IgG2aκ A647	3D6.112	BioLegend, San Diego, USA	142407
Ratte α-Maus Ly6G IgG2aκ BV421	1A8	BioLegend, San Diego, USA	127628
Brilliant Violet 421 anti Maus CD4	GK1.5	BioLegend, San Diego, USA	100437
Kaninchen α-Fluorescein/Oregon green IgG A488	–	Invitrogen, Carlsbad, USA	A11090

Isotyp	Klon	Bezugsquelle	Bestellnummer
Armenischer Hamster IgG BV421	HTK888	BioLegend, San Diego, USA	400936
Ratte IgG2aκ A647	RTK2758	BioLegend, San Diego, USA	400526
Ratte IgG2aκ BV421	RTK2758	BioLegend, San Diego, USA	400535
Ratte IgG2bκ	RTK4530	BioLegend, San Diego, USA	400639

4 Methode

Die vorliegende Arbeit vergleicht das Apoptoseverhalten ausgewählter Leukozytenpopulationen an Milzschnitten von Treg-depletierten (= „Dereg“-) und nicht-depletierten C57BL/6 (= „BL6“-) Tieren. Verwendet wurde dabei das Färbeprotokoll, das von der Autorin vorliegender Arbeit für die CD3⁺/CD4⁺-Doppelfärbung und von J. Ickler für die anderen Färbungen etabliert wurde (Ickler, 2015). Betrachtet wurden dabei „junge“ (= drei Monate alte) Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarktinduktion sowie „alte“ (= einjährige) Tiere an Tag sieben und vierzehn nach dem Infarkt.

4.1. Mausmodell

Für die Experimente dieser Arbeit wurden Dereg-Mäuse verwendet, d. h. transgene Tiere mit einem C57BL/6-Hintergrund. Die C57BL/6-Mäuse dienen als Kontrolltiere und entstammen demselben Wurf. Der für Treg spezifische Transkriptionsfaktor FoxP3 wird in Dereg-Mäusen mit dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) koexprimiert. Aufgrund der 10⁴-fach höheren Affinität des humanen Rezeptors im Vergleich mit dem murinen kann durch Applikation einer niedrigen Dosis des Diphtherietoxins (DT) die spezifische Depletion von Tregs erreicht werden. Diese Methode lässt eine normale Entwicklung des Immunsystems zu (Lahl *et al.*, 2007).

Genehmigt wurden die Tierversuche durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Aktenzeichen 7221.3-1.1-060/12. Die Versuchsterräume des Biotechnikums Greifswald, Walter-Rathenau-Straße 49, dienen der Aufzucht und Haltung der Tiere.

4.2. Vorgehen

4.2.1. Depletion regulatorischer T-Zellen

Die intraperitoneale Verabreichung von 100 µl *Diphtherie Toxin* (DT) mit einer Konzentration von 10 ng/µl DT, gelöst in sterilem 1x PBS (*Phosphate buffered saline*), führte zur gezielten Depletion der Tregs. Die Gabe erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, direkt vor Schlaganfallinduktion.

4.2.2 Transiente mittlere zerebral-Arterienokklusion (tMCAO)

Die Depletion der Tregs, die Induktion des Infarkts durch tMCAO, die dazugehörige Sham-Operation, das Töten der Tiere und die Generierung von Gewebeschnitten wurden von Juliane Schulze (AG Neuroimmunologie) durchgeführt.

Bei einer tMCAO wird ein vorübergehender intraluminaler Verschluss der *Arteria cerebri media* mittels eines Fadens durchgeführt. Die Okklusion führt zu einer gestörten Durchblutung, die besonders in einer Schädigung von *Striatum* und *Cortex* evident ist. Die Läsionen sind reproduzierbar und in ihrem Ausmaß durch die Okklusionszeit variierbar. Die Gefäßversorgung der Maus ist in Abbildung 2 dargestellt.

In Vorbereitung auf den Eingriff wurden die Mäuse mit einem 2,5 % *Isofluran*-Gemisch anästhesiert und anschließend mit 2 % *Isofluran* in 70 % N_2O und 30 % O_2 narkotisiert. Die Tiere befanden sich auf einer Heizmatte, die Körpertemperatur wurde durch Verwendung eines Rektal-Thermometers kontrolliert und konstant gehalten. Nach Eröffnung des Nackens erfolgte die Präparation der *Arteria carotis communis* (CCA). Anschließend wurden Ligaturen an drei Abschnitten angebracht: Die Ligaturen an der *A. carotis externa* und an der CCA wurden sofort verschlossen, die Ligatur distal der Bifurkation erst zum Zeitpunkt der Fixierung des Mikrofilaments. Dieses wurde über die CCA eingeführt und in die *A. carotis interna* bis zum Abgang der *A. cerebri media* vorgeschoben. Die Dauer des Verschlusses betrug 45 Minuten. In dieser Zeit wurde der eröffnete Bereich mit *Xylocain-Gel* versorgt und die Tiere waren nicht narkotisiert. Für die Reperfusion wurde das Filament aus den erneut betäubten Tieren entfernt und anschließend wurden die Wunden verschlossen. Die Folge war die Wiederherstellung des Blutflusses, was bei einem humanen Infarkt der Lyse des Gerinnsels entspräche.

Die Operation der schein-operierten Tiere folgte demselben Protokoll, nur wurde das Silikonfilament nicht bis in die *A. cerebri media* vorgeschoben und sofort wieder entfernt.

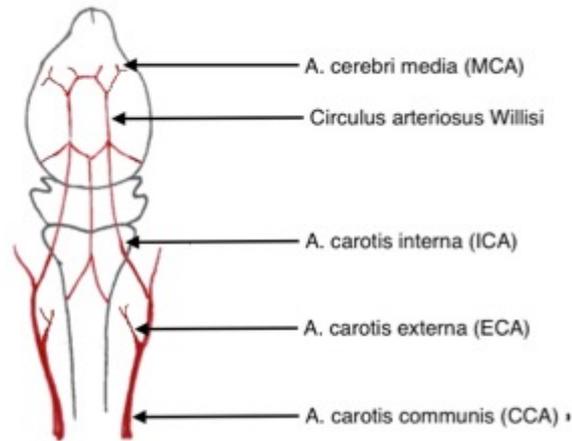


Abbildung 2: Darstellung der Gefäßarchitektur zur Versorgung des murinen Gehirns (modifiziert Darstellung in Anlehnung an (Engel *et al.*, 2011))

4.2.3 Postoperative Versorgung der Mäuse

Nach dem Eingriff wurden die Mäuse in den ersten zwei Stunden kontinuierlich überwacht. Es folgte über eine Woche die tägliche Kontrolle von Gewicht, Temperatur und Wundheilung. Den Tieren stand Wasser und aufgeweichte Nahrung zur Verfügung, außerdem erhielten sie täglich Injektionen von 500 µl Glukose in *aqua ad iniectabilia*. Verloren die Tiere trotz dieser Maßnahmen in den ersten zwei Tagen nach Infarkt über 20 % ihres Gewichtes oder waren andere Hirnareale geschädigt, wurden sie vorzeitig getötet.

4.2.4 Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte unter Narkose von 2,5 % *Isofluran* in O_2 . Anschließend wurde das Blut aus dem linken Ventrikel des Herzens entnommen, in das rechte *Atrium* geschnitten und 0,9 % *NaCl-Lösung* infundiert. Die Milzentnahme erfolgte, nachdem sich kein Blut mehr im Organismus befand. Die Fixierung erfolgte mit 20 ml 4 % *Paraformaldehyd (PFA)-Lösung* mit einer Temperatur von 4 °C. Tiere, die aus genannten Gründen (siehe Kapitel 4.2.3) für das Experiment ausschieden, wurden mittels zervikaler Dislokation unter Narkose durch Juliane Schulze getötet.

4.2.5 Herstellung der Gewebsschnitte

Das gewonnene Gewebe wurde auf Eis in 0,9 % *NaCl-Lösung* gelagert, in Plastik-Einfriergefäße unter Verwendung von *Tissue-Tek* eingebettet und schließlich durch 70 K kalten,

flüssigen Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Milzen erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Schneiden der Organe erfolgte mithilfe eines *Kryotoms*. 24 Stunden zuvor erfolgte der Transfer in einen $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten *Freezer*. Die Schnitte wurden in einer Dicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt, wobei die ersten $100\text{ }\mu\text{m}$ einer jeden Milz verworfen wurden. Es folgten 20 Schnitte, die auf einen vorbereiteten Objektträger transferiert wurden. Der zweite Schnitt auf dem Objektträger folgte jedoch nicht unmittelbar, sondern besaß jeweils einen Abstand von $400\text{ }\mu\text{m}$, da das Zwischenstück verworfen wurde.

4.2.6 Immunhistochemische Färbung von Leukozytenpopulationen

Färbungen zum Nachweis von TUNEL⁺-Leukozyten

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte immunhistochemisch mittels der TUNEL- (*Terminal desoxynucleotidyl dUTP nickend labeling*) Färbung. Diese Methode macht sich die Fragmentierung der zellulären DNA zunutze, die während der Apoptose auftritt. Die entstandenen freien 3'-OH-Enden können von der Desoxynukleotidyl-Transferase mit Nukleotiden verknüpft werden, ebenfalls mit fluorochrom-konjugierten Nukleotiden. Dies ermöglicht die Identifikation der TUNEL⁺-Zellen, also jener Zellen, die apoptotisch sind. Für die Färbung wurden das von J. Ickler angepasste TUNEL-Färbungsprotokoll und das *In Situ Cell Death Detection TMR red Kit* verwendet. Es unterscheidet sich vom Herstellerprotokoll in der Art der Fixierung: Statt der 20-minütigen Fixierung mit *PFA*-Lösung werden die Schnitte zehn Minuten in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem *Aceton* fixiert. Folglich kann auf den Schritt der Permeabilisierung der Zellmembran verzichtet werden, da das *Aceton* auch diese Funktion erfüllt. Um die apoptotischen Zellen einer bestimmten Leukozytenpopulation zuzuordnen, ist die Kombination aus Leukozyten- und TUNEL-Färbung notwendig.

In der vorliegenden Arbeit werden der Effekt der Tregs und die Folgen ihrer Depletion für die Apoptose von Leukozytenpopulationen in der murinen Milz nach Induktion eines zerebralen Infarkts untersucht. Außerdem wird die zeitliche Entwicklung der Apoptose betrachtet: Die Milzen von Tieren werden an Tag 1, 3, 5, 7 und 14 nach Infarktinduktion und mit denen der naiven Tiere verglichen. Weiterhin wird untersucht, ob sich das Apoptoseverhalten im Alter verändert. Dazu werden die Milzen von „jungen“ (= drei Monate alten) und „alten“ (= einjährigen) Tieren untersucht. Betrachtet werden für jedes Tier die Apoptose von Ly6G⁺-neutrophilen Granulozyten, von CD11c⁺-myeloiden Zellen sowie von zwei T-Zell-Subpopulationen: den CD3⁺/CD4⁺-T-Helferzellen und CD8a⁺-zytotoxischen T-Zellen. Der Nachweis

erfolgt aus der Kombination von TUNEL-Färbung und der Färbung des spezifischen Antigens der jeweiligen Leukozytenpopulation. Verwendet wird dafür eines der drei im Folgenden beschriebenen Färbeprotokolle.

Etablierungsfärbungen: Färbeprotokolle TUNEL⁺-Leukozyten

a) bei den CD3⁺/CD4⁺-T-Helferzellen

Aus den Untersuchungen von Vendrame et al. (Vendrame *et al.*, 2000) und Ickler (Ickler, 2015) geht hervor, dass nicht alle CD3⁺-Zellen CD4⁺ exprimieren und es sich bei den CD4⁺-Zellen nicht ausschließlich um CD3⁺-Zellen handeln kann, weshalb zur eindeutigen Identifizierung der CD3⁺/CD4⁺-T-Helferzellen eine Doppelfärbung Anwendung findet (siehe auch die Diskussion in Kapitel 6.2).

Die bei -20 °C gelagerten Milzschnitte werden auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend wird das überschüssige *Tissue-Tek* mittels Wattetupfer und 96%igem *Ethanol* entfernt. Es folgt die fünfminütige Fixierung in einer mit -20 °C kaltem *Aceton* gefüllten Küvette. Die auf dem Objektträger befindlichen Milzschnitte werden mit einem Fettstift umrundet. Es folgen drei Waschungen à zehn Minuten in 1x PBS auf einer *Rockig Platform* (RP). Jeder Schnitt wird dann für 20 Minuten mit 50 µl Blockpuffer bedeckt, der in einer 1:10-Verdünnung von 10 % *Normal Goat Serum* (NGS) in 1x PBS vorliegt. Nun werden die für die Färbung bestimmten Schnitte mit 50 µl des Primärantikörpers *Ratte α-Maus CD3 IgG2bκ FITC* sowie dem Antikörper *CD4-Brilliant Violett 421 anti Maus* bedeckt und die Isotypkontrollen erstellt. Für die CD3⁺/CD4⁺-Färbung ergab eine 1:100-Verdünnung die besten Ergebnisse, weshalb diese hier zur Anwendung kommt. Die jeweils verwendeten Verdünnungen sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Antikörper-Verdünnung

Antikörper	Verdünnung
Ratte α-Maus CD3 IgG2bκ FITC	1:50
Ratte α-Maus CD8a IgG2aκ A647	1:50
Armenischer Hamster – α-Maus CD11c IgG BV421	1:100
Ratte α-Maus CD169 IgG2aκ A647	1:100
Ratte α-Maus Ly6G IgG2aκ BV421	1:100
Kaninchen α-Fluorescein / Oregon green IgG A488	1:100
Brilliant Violett 421 anti Maus CD4	1:50

Alle folgenden Schritte erfolgen lichtgeschützt. Die Milzschnitte werden auf einer RP für zwei Stunden inkubiert. Es folgen erneut drei Waschgänge in 1x PBS. Für die Darstellung von CD3⁺-Zellen ist die Verstärkung des Primärantikörpers mittels des Sekundärantikörpers *Kaninchen α -Fluorescein/Oregon green IgG A488* notwendig. Nach einstündiger Inkubation des Sekundärantikörpers (zur Verdünnung vgl. Tab. 6) schließen sich erneut drei Waschgänge an. Zur Erstellung der Positivkontrolle wird 100 μ l *DNase I* für zehn Minuten auf den Schnitt aufgebracht. Dabei wird eine Stammlösung von 1000 U/ml, bestehend aus 100 mg *DNase I* und 200 mg *Serumalbumin* in 200 ml *Tris-HCL* mit einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Der zweite auf dem Objektträger befindliche Schnitt wird mit 1x PBS bedeckt, um der Austrocknung vorzubeugen. Nach erneuter Waschung wird die *TUNEL-reaction-mixture* angesetzt: aus *Enzyme-solution* und *Lable-solution*, im Verhältnis 1:10 gemischt. Im Folgenden werden alle Schnitte und die Positivkontrolle mit 50 μ l dieser Lösung bedeckt. Der als Negativkontrolle dienende Schnitt wird mit 50 μ l *Lable-solution* und die Isotypkontrollen werden mit demselben Volumen an 1x PBS bedeckt. Die einstündige Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank. Nach drei Waschungen mit einer Dauer von je fünf Minuten werden die Schnitte mit einem Tropfen *Fluoprep* und einem Deckglas versiegelt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei Raumtemperatur gelagert.

b) bei neutrophilen Granulozyten und CD11c⁺ myeloiden dendritischen Zellen (etabliert durch Ickler, 2015)

Das in Protokoll a) beschriebene Vorgehen wird um einen Waschschrift verkürzt und auf eine einstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper reduziert. Eine Verstärkung des Fluorochroms ist bei dieser Färbung nicht erforderlich. Alle nachfolgenden Schritte erfolgen wie unter a) beschrieben.

c) bei CD3⁺/CD8a⁺-Färbung der zytotoxischen T-Zellen (etabliert durch Ickler, 2015)

Die Färbung folgt dem unter a) beschriebenen Protokoll, unterscheidet sich jedoch in dem verwendeten Blockpuffer: Anstelle von NGS wird hier *Fetal Calf Serum* (FCS) verwendet.

Mikroskopische Auswertung

Die getrockneten Schnitte werden am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Im ersten Schritt wird eine Navigationskarte, die *Navigation Map*, eine Gesamtübersicht in zehnfacher Vergrößerung, durch das Zusammenfügen vieler Einzelbilder erstellt (siehe Abbildung 3a). Anhand dieses Bildes werden acht Leukozyten-Cluster ausgewählt (siehe Abbildung 3b), die

möglichst gleichmäßig über die Milz verteilt sind. Da Ly6G⁺- und CD11c⁺-Zellen nicht in Clustern vorliegen, dienen die durch CD169⁺ charakterisierten Marginalzonen-Makrophagen der Orientierung.

Für jede Bildposition werden in verschiedenen Schnittebenen Bilder erstellt und anschließend zu einem *Z-Stack* zusammengefügt. Dies geschieht für alle Schnitte im *Texas-Red-Kanal*, der die optimale Anregungswellenlänge 562 nm und eine Emission von 624 nm filtert. Dieser Vorgang wird im Kanal des für die Färbung spezifischen Fluorochroms wiederholt. Bei der Färbung der myeloiden CD11c⁺ und der neutrophilen Granulozyten Ly6G⁺ entstehen Bilder in 20-facher Vergrößerung, für die Darstellung der anderen Populationen in 40-facher Vergrößerung (siehe Abbildung 3c, d und e). Die *Z-Stack*-Bilder werden anschließend mittels des *Analysers* zu *full focus*-Bildern zusammengefügt und die entstandenen Bilder aller Kanäle zu einem *Overlay* übereinandergelegt (siehe Abbildung 3f). Als Resultat entstehen Bilder, auf denen sowohl die apoptotischen TUNEL⁺-Zellen als auch die jeweilige Leukozytenpopulation dargestellt sind.

Es folgt die manuelle Auszählung der doppelt positiv gefärbten Zellen (siehe Abbildung 3g). Mithilfe der *Brightness Extraction*-Funktion im *Dynamic Cell Count* der *BZ Analyser Software* wird die von Leukozyten einer bestimmten Population bedeckte Fläche für jedes der acht Positionen erhoben. Sowohl für die gezählten Zellen als auch für die bestimmte Fläche wird der Mittelwert aus den acht Positionen der beiden Schnitte gebildet und für die Bestimmung der apoptotischen Dichte verwendet. Diese ist nun ein Maß für die mittlere Anzahl der TUNEL⁺-Leukozyten einer bestimmten Population – pro bedeckter Fläche aller Leukozyten dieser Population (gemessen in mm).

Methode

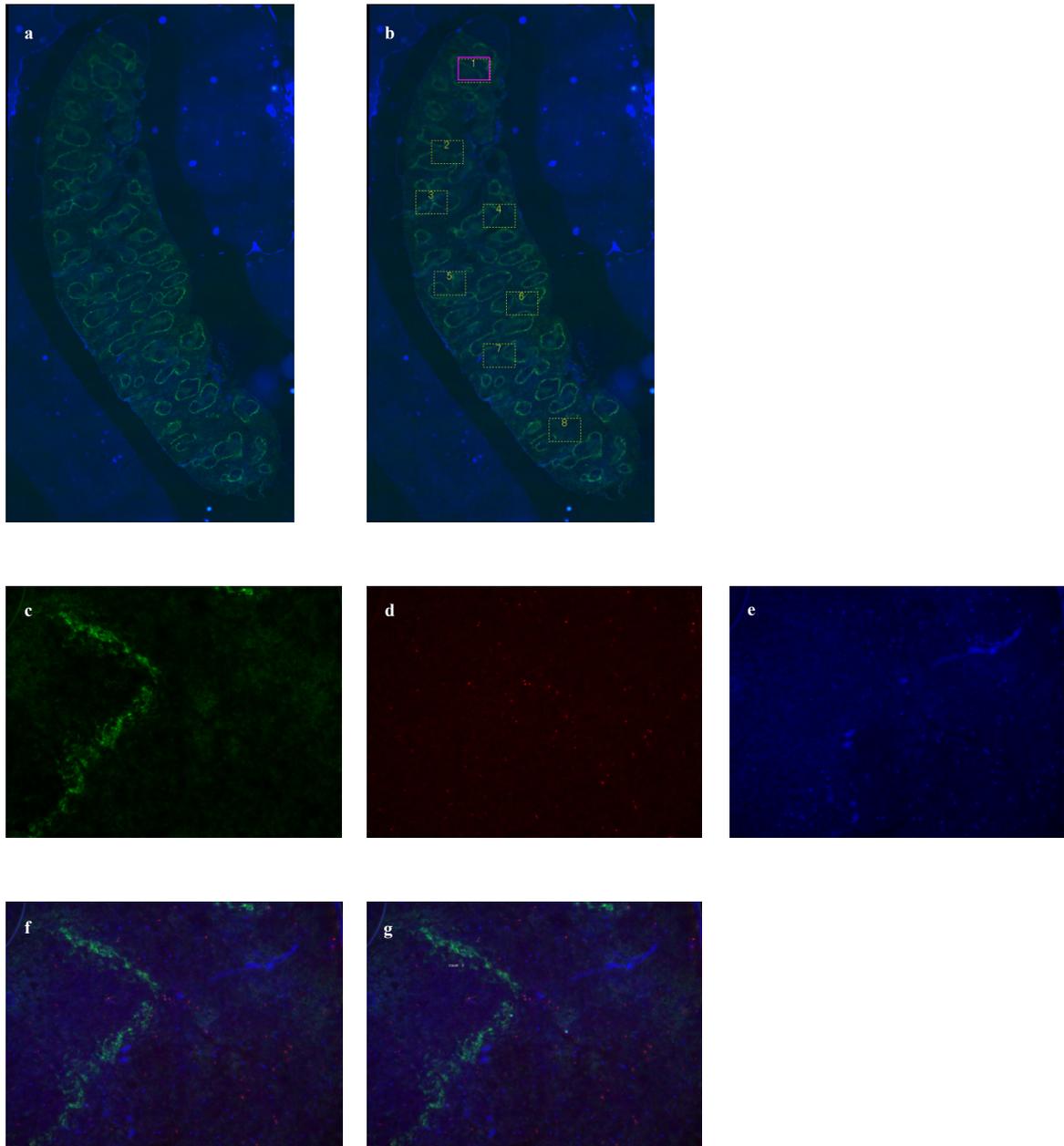


Abbildung 3: Darstellung der Färbungen zur Apoptose am Beispiel von $CD11c^+$ -Zellen in murinen Milzschnitten

Erläuterung: In **a**) dargestellt ist in 10-facher Vergrößerung eine *Navigation Map* für eine $CD11c^+$ -Färbung (*Overlay* aus Bildern, die im *Dapi*- und *Cy5*-Kanal aufgenommen wurden) **b**) zeigt die Auswahl von acht $CD11c^+$ -Zell-Clustern zur Auswertung; **c**) zeigt das in Abb. 3 b) mit „4“ markierte Cluster mit erkennbaren $CD169^+$ -Zellen, aufgenommen im *Cy5*-Kanal in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/1,1 s); **d**) zeigt das in Abb. 3 b) mit „4“ markierte Cluster mit apoptotischen Zellen, aufgenommen im *Texas-Red*-Kanal in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/12 s); **e**) zeigt das in Abb. 3 b) mit „4“ markierte Cluster mit erkennbaren $CD11c^+$ -Zellen, aufgenommen im *Dapi*-Kanal in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1,2,5 s); **f**) *Overlay* aus c, d und e; **g**) *Overlay* f mit markierten Counts.

Statistische Auswertung

Die auf diese Weise berechnete apoptotische Dichte wird mithilfe der *One-way-ANOVA* und sich anschließendem *Bonferroni Multiple Comparison-Test* auf Signifikanzen überprüft. Im Folgenden werden die Signifikanzniveaus: * signifikant (5 %), ** sehr signifikant (≤ 1 %) und *** hochsignifikant ($\leq 0,1$ %) verwendet. Die Ergebnisse werden zu verschiedenen Zeitpunkten auf Unterschiede zwischen Dereg- und BL6-Tieren sowie im Vergleich zu naiven Tieren getestet. Um die apoptotische Dichte innerhalb einer Gruppe zu analysieren, wird ein *t-Test* verwendet. Mittels *Pearson-Test* wird zudem überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Infarkt volumen und apoptotischer Dichte besteht.

5 Ergebnisse

5.1. Die Färbungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der im Kapitel 4.2.6 beschriebenen Färbungen exemplarisch dargestellt.

Das erste Bild (a) zeigt ein Übersichtsbild der Milz, die der Auswahl der acht Leukozytencluster dient (b). Für jedes der acht Ausschnitte werden Bilder in drei Kanälen aufgenommen, die abhängig von dem in der Färbung spezifischen Flouorchroms gewählt sind (d, e, f). Aus diesen drei Einzelbildern wird ein Overlay erzeugt, um doppelt gefärbte Zellen darzustellen (c). Des Weiteren werden eine Positiv- (g), eine Negativ- (h), sowie eine Isotypkontrolle (i) erstellt.

Ergebnisse

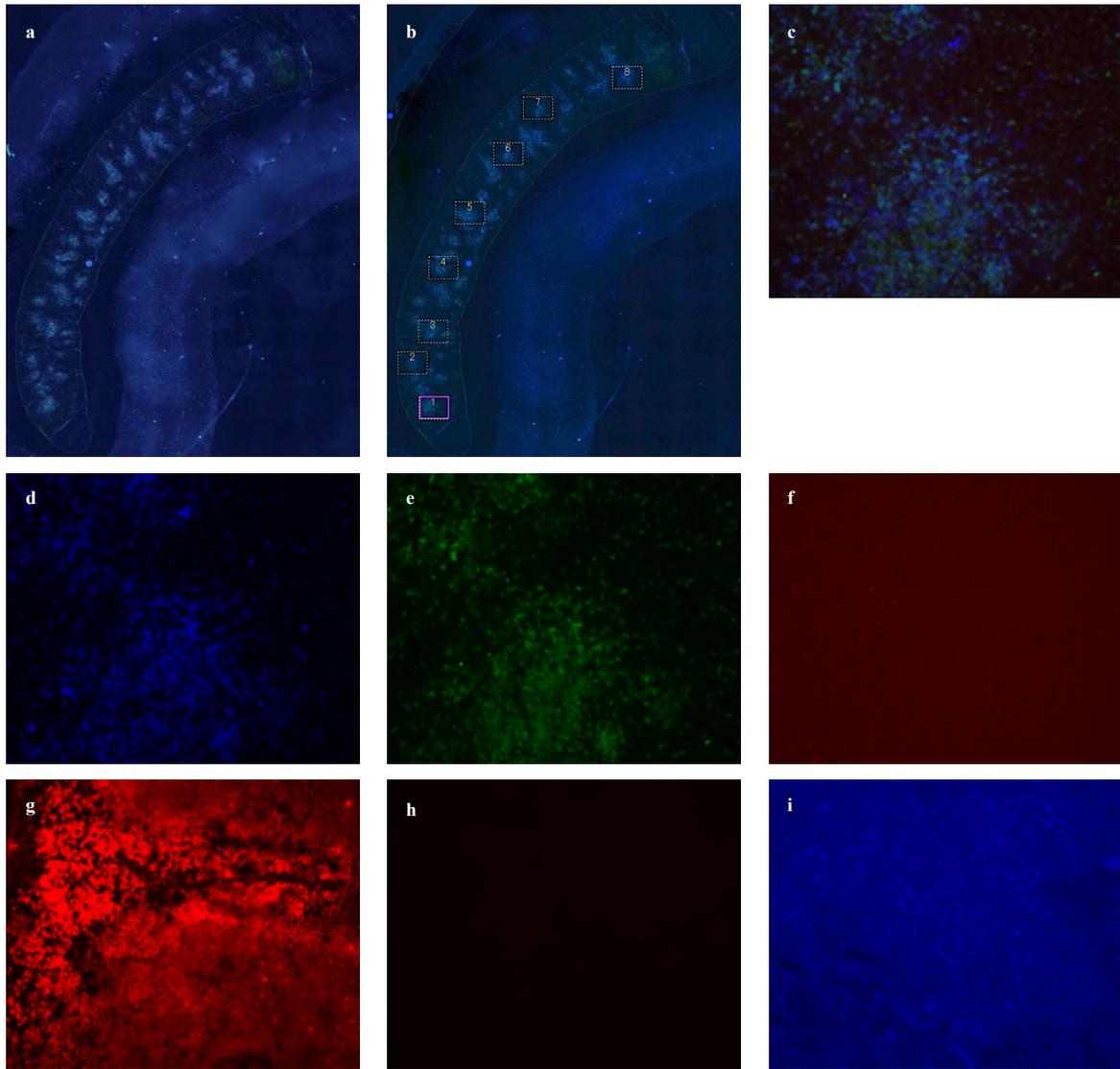


Abbildung 4: Auswertung der Färbungen zur Apoptose von CD3⁺/CD4⁺-Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren

Erläuterung: Bild **a**) stellt in 10-facher Vergrößerung eine *Navigation Map* für eine CD3⁺/CD4⁺-Färbung dar (*Overlay* aus Bildern, die im *GFP-* und *Dapi-Kanal* aufgenommen wurden); **b**) zeigt die Auswahl von acht CD3⁺-Zell-Clustern zur Auswertung; **c**) ist der *Overlay* von **d**, **e** und **f**; **d**) zeigt das in **Abb. 4 b**) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren CD4⁺-Zellen, aufgenommen im *Dapi-Kanal* in 40-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/1,8 s); **e**) zeigt das in **Abb. 4 b**) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren apoptotischen CD3⁺-Zellen, aufgenommen im *GFP-Kanal* in 40-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1,1 s); **f**) zeigt das in **Abb. 4 b**) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren apoptotischen Zellen, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/2 s); **g**) stellt die Positivkontrolle der TUNEL-Färbung dar, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2 s); **h**) zeigt die Negativkontrolle der TUNEL-Färbung im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2 s); **i**) ist die Isotypkontrolle mittels Ratte IgG2bk aufgenommen im *GFP-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1,1 s).

Ergebnisse

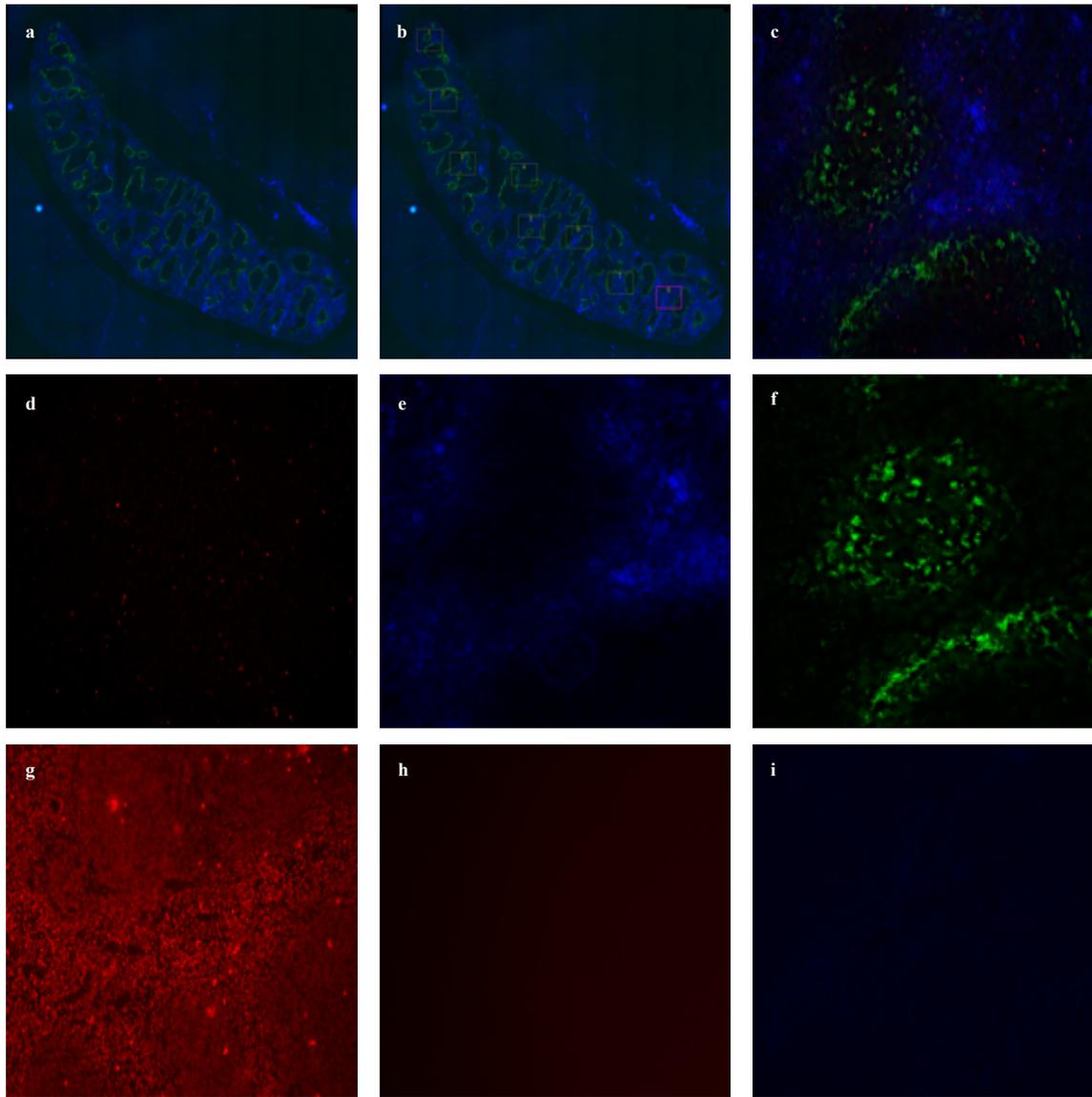


Abbildung 5: Auswertung der Färbungen zur Apoptose von Ly6G⁺-Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren

Erläuterung: In Bild **a**) ist in 10-facher Vergrößerung eine *Navigation Map* für eine Ly6G⁺-Färbung dargestellt (*Overlay* aus Bildern, die im *Dapi-* und *Cy5-Kanal* aufgenommen wurden); **b**) zeigt die Auswahl von acht Ly6G Zell-Clustern zur Auswertung; **c**) ist der *Overlay* von **d**, **e** und **f**; **d**) zeigt das in Abb. 5 b) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren apoptotischen Zellen, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/8 s); **e**) zeigt das in Abb. 5 b) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren Ly6G⁺-Zellen, aufgenommen im *Dapi-Kanal* in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1,11 s); **f**) zeigt das in Abb. 5 b) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren CD169⁺-Zellen, aufgenommen im *Cy5-Kanal* in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1 s); **g**) stellt die Positivkontrolle der TUNEL-Färbung dar, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2 s); **h**) zeigt die Negativkontrolle der TUNEL-Färbung im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/8 s); **i**) ist die Isotypkontrolle mittels Ratte IgG2ak BV421 aufgenommen im *Dapi-Kanal* in 20-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1,11 s).

Ergebnisse

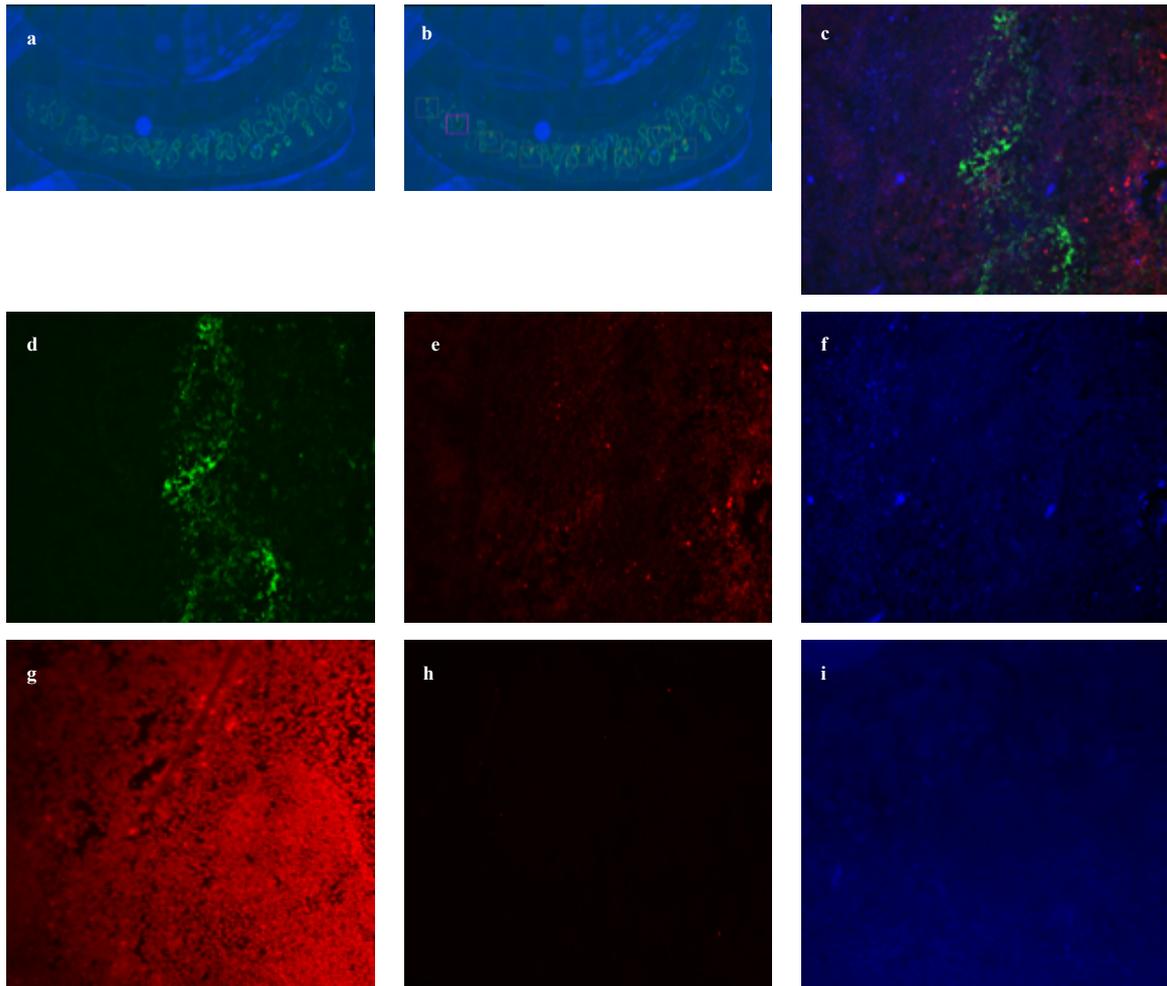


Abbildung 6: Auswertung der Färbungen zur Apoptose von CD11c⁺-Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren

Erläuterung: In Bild **a**) ist in 10-facher Vergrößerung eine *Navigation Map* für eine CD11c⁺-Färbung (*Overlay* aus Bildern, die im *Dapi-* und *Cy5-Kanal* aufgenommen wurden dargestellt); **b**) zeigt die Auswahl von acht CD11c⁺-Zell-Clustern zur Auswertung; **c**) ist der *Overlay* von **d**), **e**) und **f**); **d**) zeigt das in **b**) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren CD169⁺-Zellen, aufgenommen im *Cy5-Kanal* in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1,2 s); **e**) zeigt das in **b**) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren apoptotischen Zellen, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/2,8 s); **f**) zeigt das in **b**) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren CD11c⁺-Zellen, aufgenommen im *Dapi-Kanal* in 20-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1,8 s); **g**) stellt die Positivkontrolle der TUNEL-Färbung dar, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 20-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2,8 s); **h**) zeigt die Negativkontrolle der TUNEL-Färbung im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2,8 s); **i**) ist die Isotypkontrolle mit Armenischem Hamster IgG BV421 aufgenommen im *Dapi-Kanal* in 20-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1,8 s).

Ergebnisse

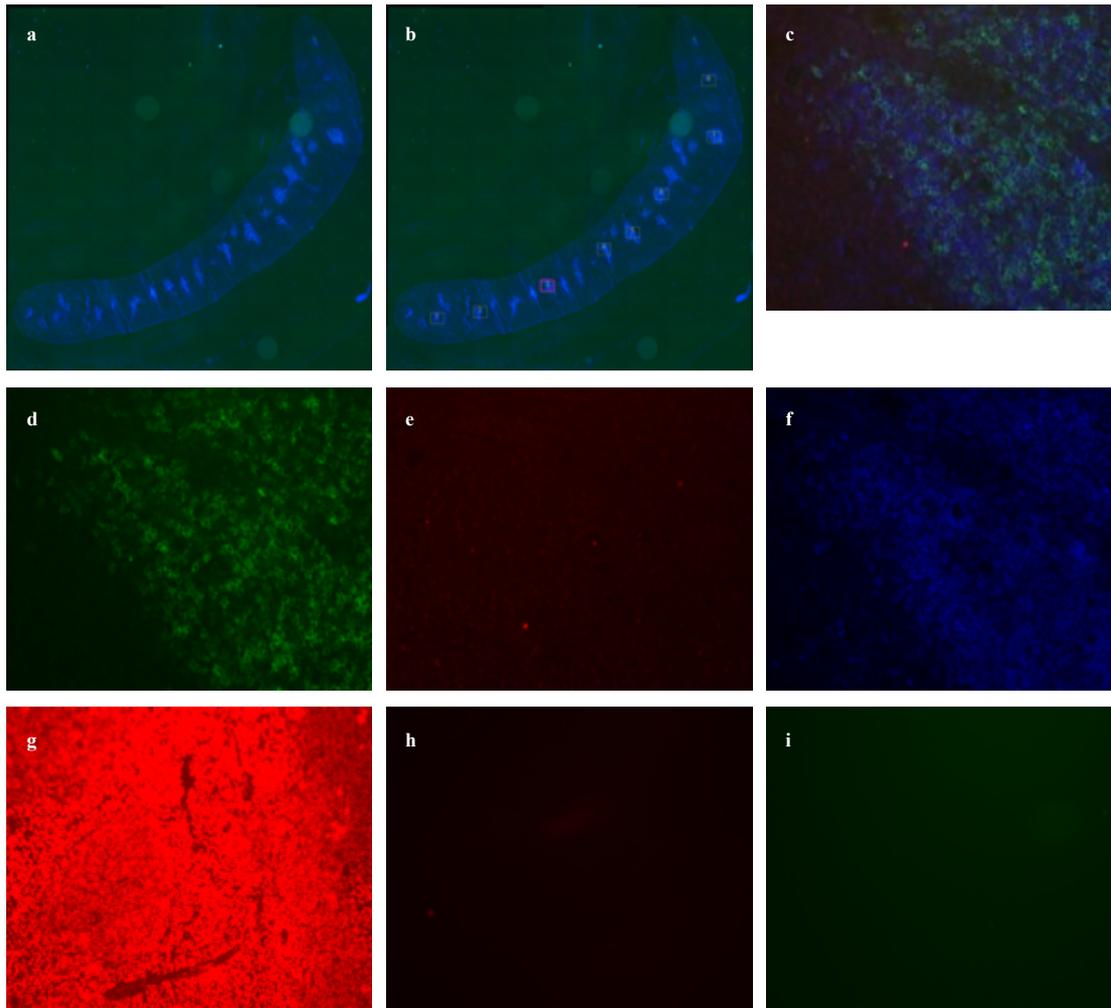


Abbildung 7: Auswertung der Färbungen zur Apoptose von $CD3^+/CD8^+$ -Zellen in murinen Milzschnitten von Dereg- und BL6-Tieren

Erläuterung: In Bild **a**) ist in 10-facher Vergrößerung eine *Navigation Map* für eine $CD3^+/CD8^+$ -Färbung dargestellt (*Overlay* aus Bildern, die im *GFP-* und *Cy5-Kanal* aufgenommen wurden); **b**) zeigt die Auswahl von acht $CD8^+$ -Zell-Clustern zur Auswertung; **c**) ist der *Overlay* von **d**), **e**) und **f**); **d**) zeigt das in Abb. 7 b) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren $CD8^+$ -Zellen, aufgenommen im *Cy5-Kanal* in 40-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 5 s); **e**) zeigt das in Abb. 7 b) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren apoptotischen Zellen, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/2,5 s); **f**) zeigt das in Abb. 7 b) mit „1“ markierte Cluster mit erkennbaren $CD3^+$ -Zellen, aufgenommen im *GFP-Kanal* in 40-facher Vergrößerung nach Fokussierung der einzelnen Bilder des entsprechenden *Z-Stacks* (Belichtungszeit: 1/2 s); **g**) stellt die Positivkontrolle der TUNEL-Färbung, aufgenommen im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2,5 s); **h**) zeigt die Negativkontrolle der TUNEL-Färbung im *Texas-Red-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 1/2,5 s); **i**) ist die Isotypkontrolle mit mittels Ratte IgG2ak A647 aufgenommen im *Cy5-Kanal* in 40-facher Vergrößerung (Belichtungszeit: 5 s).

5.2. Vergleichsfärbung von Dereg- und BL6-Tieren im zeitlichen Verlauf bei „jungen“ Mäusen

Verwendet werden die Milzen drei Monate „junger“ Mäuse. Die Zuordnung zu den Gruppen Tag 1 bis 5 beschreibt den Tötungszeitpunkt nach Schlaganfallinduktion. Am Tag der Operation wurde das Ausmaß des Infarkts im MRT untersucht. Unterschieden werden Gruppen von BL6-, Dereg- und naiven Tieren (nicht Sham operiert).

5.2.1. Apoptosedichte ausgewählter Lymphozytenpopulationen

Die Bestimmung der apoptotischen Dichte folgt dem im Kapitel 4.2.6 beschriebenen Protokoll. Die erhobenen Werte der Einzelfärbungen werden in Abbildung 8 in ihrer Gesamtheit betrachtet. Bei gemeinsamer Betrachtung der apoptotischen Dichte aller untersuchten Zellpopulationen zeigt sich für die Dereg-Tiere eine relativ konstante apoptotische Dichte, während für die BL6-Tiere nach einem starken Anstieg an Tag 1 ein abnehmender Trend evident ist, der sich den Werten der Dereg-Tiere annähert. Die Untersuchung mittels *One-Way-ANOVA* und anschließendem *Bonferroni-Test for selected pairs of columns* ergibt einen sehr signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Dereg- und BL6-Tieren an Tag 1.

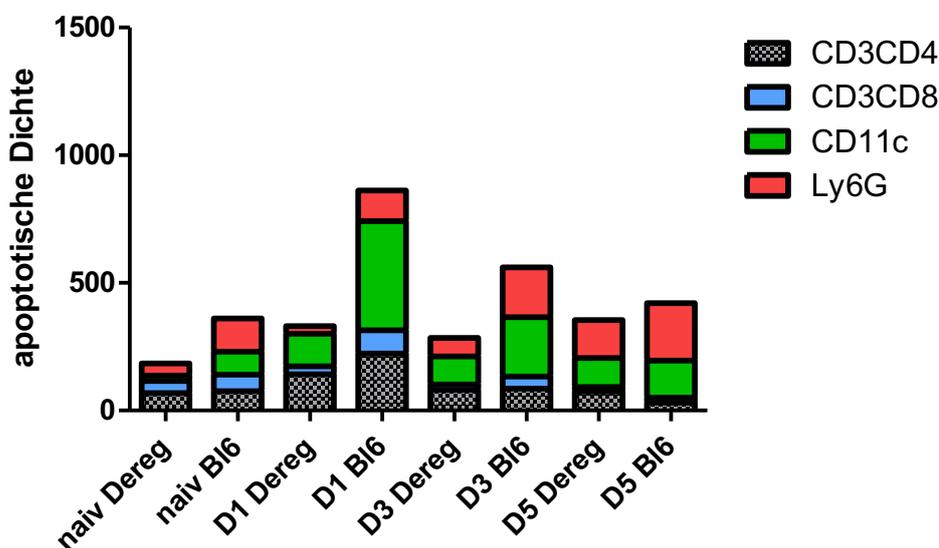


Abbildung 8: Vergleich der Summe der apoptotischen Dichte: Dereg- vs. BL6-Tiere (naiv, D1, D3, D5)

Erläuterung: Es wurden zu jedem Zeitpunkt (Tag 1, 3 und 5) und in jeder Gruppe Färbungen von $n = 5$ ausgewertet (Ausnahme BL6, Tag 5: $n = 4$). Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet und eine Normalverteilung angenommen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way-ANOVA* und anschließendem *Bonferroni-Test for selected pairs of columns*. Verglichen wurden jeweils BL6- mit Dereg-Tieren: naiv, D1, D3 und D5. Signifikanz ergibt sich für D1 mit $p < 0,01$.

Des Weiteren wurde untersucht, welche Populationen die signifikanten Unterschiede verursachen. Dabei wurde aufgrund des explorativen Charakters der Studie und der begrenzten Anzahl an Tieren auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet. Entsprechende Darstellungen für die einzelnen Zellarten können dem Anhang (Abb. A1) entnommen werden. Die Verwendung von *One-Way-ANOVA* ergab zwei signifikante Unterschiede: Die apoptotische Dichte von CD3⁺/CD4⁺-Zellen ist in naiven BL6-Tieren signifikant niedriger ($p < 0,001$) als die in BL6-Tieren an Tag 1. Außerdem ist die apoptotische Dichte von CD3⁺/CD8⁺-Zellen in Dereg-Tieren an Tag 1 signifikant niedriger ($p < 0,015$) als in BL6-Tieren an Tag 1.

In allen vier untersuchten Populationen zeigt sich ein Trend zur Abnahme der Unterschiede in der Apoptosedichte bei Dereg- und BL6-Tieren zum 5. Tag hin. Die apoptotische Dichte ist in BL6-Tieren generell höher als in Dereg-Tieren desselben Zeitpunktes. Eine Abweichung von diesem Trend zeigt die Apoptose von CD3⁺/CD4⁺-Zellen an Tag 5.

5.2.2. Zusammenhang von Apoptosedichte und Schlaganfallvolumen

Im Folgenden wurde die apoptotische Dichte auf eine Korrelation mit der Infarktgröße, die am 1. Tag nach Infarkt im MRT gemessen wurde, mittels *Pearson-Test* untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Ein signifikanter Zusammenhang zeigt sich für die Dereg-Tiere am 5. Tag bei den Färbungen Ly6G⁺/TUNEL und CD11c⁺/TUNEL. Für die Ly6G⁺-Färbung ergibt sich ein *Pearson's r* von 0,8844 sowie ein *p-Value* von 0,0193. Die Untersuchung der CD11c⁺ ergibt ein *Pearson's r* von 0,9416 und ein *p-Value* von 0,0168. In beiden Fällen geht ein hohes Schlaganfallvolumen mit einer erhöhten apoptotischen Dichte einher.

Ergebnisse

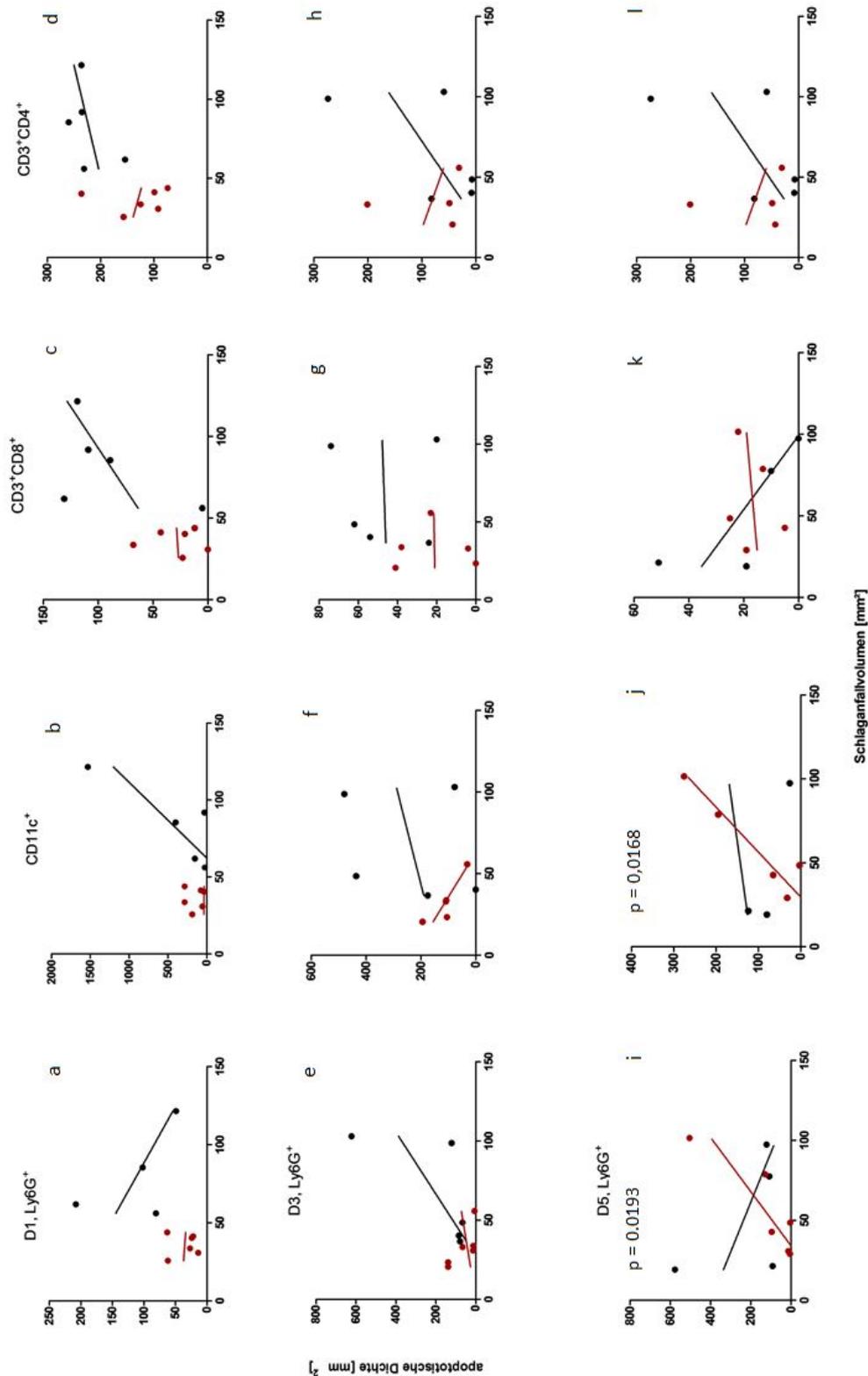


Abbildung 9: Korrelation der apoptotischen Dichte mit dem Schlaganfallvolumen an Tag 1: Dereg- vs. BL6-Tiere

Erläuterung: Die Werte der apoptotischen Dichte der Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen entsprechen den unter [Abb. 8](#) beschriebenen Ergebnissen: n = 5 (Ausnahme BL6, Tag 5: n = 4). Unterschieden wurde nach Färbung und Gruppenzugehörigkeit (Tag 1, 3, 5). Die Daten der Dereg-Tiere sind in Rot und die der BL6-Tiere in Schwarz dargestellt. Die Normalverteilung wird angenommen. Unter Verwendung eines *Pearson-Tests* zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen für die Dereg-Tiere an Tag 5 bei den Färbungen Ly6G⁺/TUNEL (*Pearson's r* = 0,8844, *p-Value* = 0,0193; vgl. [Abb. 9i](#)) und CD11c⁺/TUNEL (*Pearson's r* = 0,9416, *p-Value* = 0,0168; vgl. [Abb. 9j](#)).

5.3. Vergleichsfärbung von Dereg- und BL6-Tieren in „alten“ Mäusen

Die im Folgenden zur Auswertung kommenden Milzen entstammen Tieren, deren postoperative Infarkt- und Milzvolumina in regelmäßigen Abständen (12 Stunden, 3, 5, 7 und evtl. 14 Tage postoperativ) mittels MRT untersucht wurden. Es handelt sich um einjährige („alte“) Tiere. Untersucht wird auch hier der Unterschied in der Apoptosedichte zwischen Treg-depletierten Dereg- und BL6-Tieren im zeitlichen Verlauf (D7, D14).

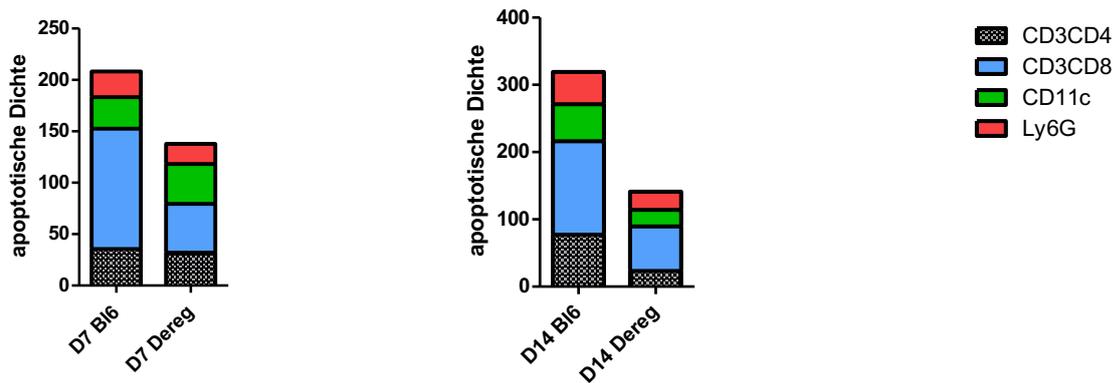
5.3.1. Apoptotische Dichte ausgewählter Populationen

Für die Bestimmung der apoptotischen Dichte wurde wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben vorgegangen. Abbildung 10 veranschaulicht die erhobenen Daten graphisch. Eine Darstellung mit getrennten Graphen für jeden Zelltyp findet sich im Anhang (siehe Abb. A2).

Es wurden die Milzen „alter“ Tiere sieben (D7) bzw. vierzehn Tage (D14) nach Infarkt mithilfe der in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Färbungen untersucht. Unter Verwendung von *One-Way-ANOVA* mit anschließendem *Bonferroni-Test* ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelbar.

Für die „alten“ Tiere lässt sich in allen vier Populationen ein Trend zu höherer Varianz feststellen. Zudem zeigt sich eine Tendenz zu höheren Mittelwerten bei der Apoptosedichte in BL6-Tieren. Der Unterschied ist besonders in den CD3⁺/CD8⁺-Zellen evident. Eine Ausnahme stellt die CD11c⁺/TUNEL-Färbung in den D7-Tieren dar, in der keine Abnahme der Apoptosedichte in den Dereg-Tieren evident ist.

Abbildung 10: Zusammenfassende Darstellung der Apoptose in „alten Tieren“ (D7, D14)



Erläuterung: Werte der apoptotischen Dichte bei Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen für Dereg- und BL6-Tiere. Zur Auswertung kamen n = 5 BL6- bzw. n = 4 Dereg-Tiere. Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet. Eine Normalverteilung wird angenommen.

5.3.2. Korrelation von apoptotischer Dichte und Infarktvolumen

Im Folgenden wird mittels *Pearson-Test* gezeigt, ob die im Kapitel 5.2.1 bestimmte apoptotische Dichte der ausgewählten Färbungen mit dem im MRT gemessenen Schlaganfallvolumen (drei Tage postoperativ) korreliert. Die Ergebnisse sind Abbildung 11 zu entnehmen.

Mit einem *Pearson's r* von 0,9901 und einem *p-Value* von 0,0099 lässt sich eine sehr signifikante Korrelation in der CD3⁺/CD8⁺/TUNEL-Färbung der „alten“ BL6-Tiere (D14) zeigen. Eine Signifikanz besteht außerdem in der CD11c⁺/TUNEL-Färbung der „alten“ Dereg-Tiere (D7) – bei einem *Pearson's r* von 0,955 und einem *p-Value* von 0,0447.

In beiden Gruppen geht folglich ein hohes Infarktvolumen mit einer hohen apoptotischen Dichte der jeweiligen Lymphozytenpopulation einher.

Ergebnisse

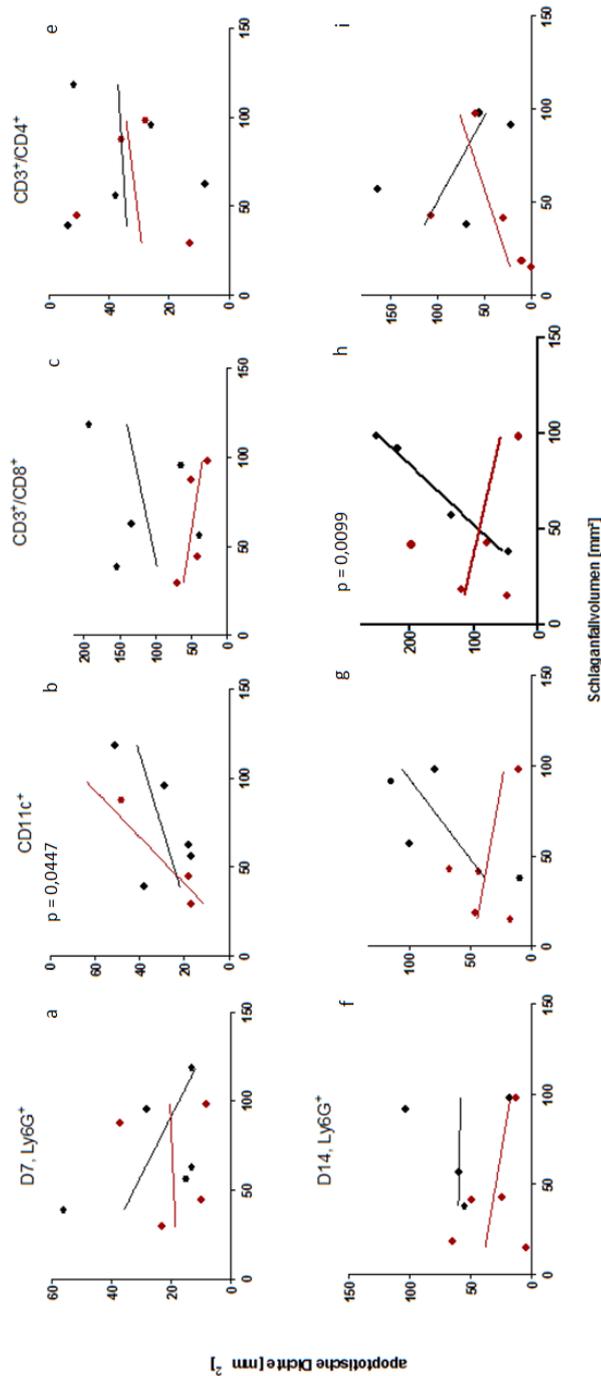


Abbildung 11: Korrelation von apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen bei „alten“ Tieren: Dereg- vs. BL6-Tiere (D7, D14)

Erläuterung: Die Werte der apoptotischen Dichte der Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen entsprechen den unter [Abb. 8](#) beschriebenen Ergebnissen für die „alten“ Tiere D7 (obere Reihe) bzw. D14 (untere Reihe). Unterschieden wurde nach Färbung und Gruppenzugehörigkeit (D7, D14). Zur Auswertung kommen jeweils fünf BL6-Tiere D7 und Dereg-Tiere D14. Für die BL6-Tiere D14 und die Dereg-Tiere D7 gilt $n = 4$. Die Daten der Dereg-Tiere werden in Rot und die der BL6-Tiere in Schwarz dargestellt und eine Normalverteilung angenommen. Ein Datenpunkt bildet die mittlere apoptotische Dichte für ein Tier ab, wofür zwei Milzschnitte aus je acht Clustern zur Auswertung kamen. Dieser wurde gegen das Schlaganfallvolumen aufgetragen. Unter Verwendung eines *Pearson-Tests* zeigen sich sehr signifikante Korrelationen für die BL6-Tiere D14 der Färbung CD3⁺/CD8⁺/TUNEL (*Pearson's* $r = 0,9901$, $p\text{-Value} = 0,0099$; vgl. [Abb. 11h](#)). Eine Signifikanz besteht außerdem für die CD11c⁺-Färbung der „alten“ Dereg-Tiere D7 (*Pearson's* $r = 0,9553$, $p\text{-Value} = 0,0447$; vgl. [Abb. 11b](#)).

5.3.3. Korrelation von Apoptosedichte und Milzvolumen

Die berechnete apoptotische Dichte wurde auch auf eine Korrelation mit dem Milzvolumen drei Tage nach der Operation untersucht. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse. Mittels *Pearson-Test* kann keine Korrelation ermittelt werden.

Ergebnisse

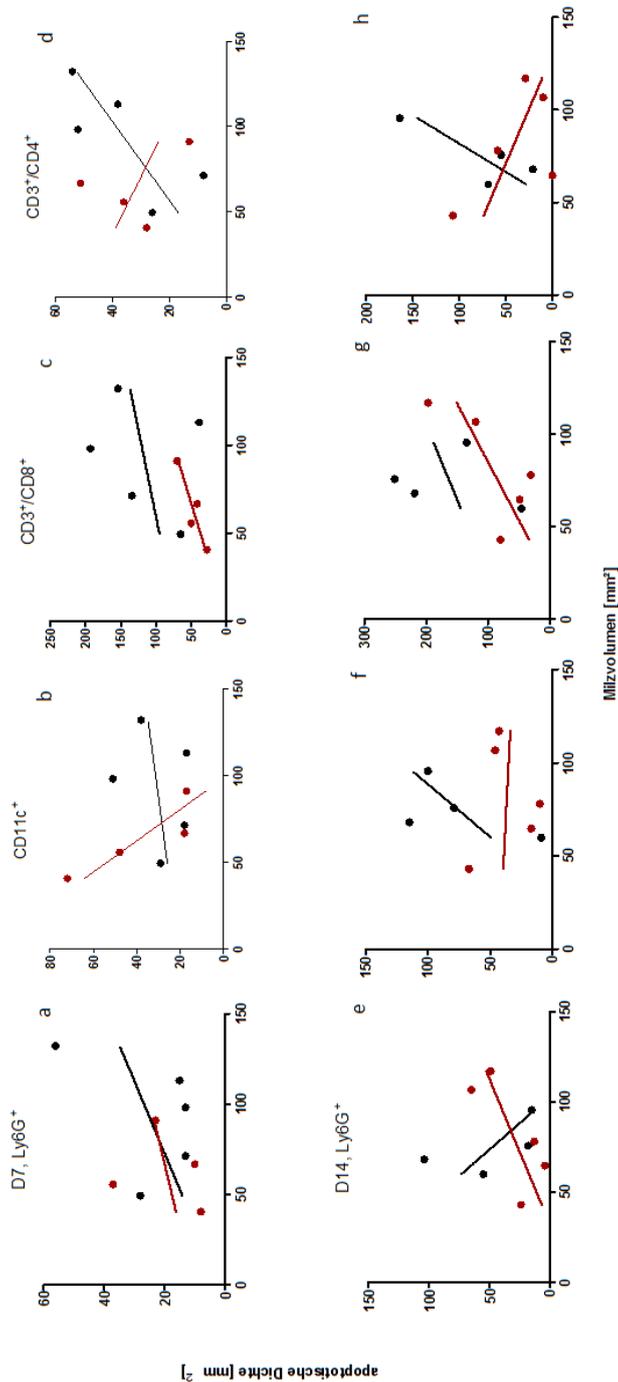


Abbildung 12: Korrelation der apoptotischen Dichte mit dem Milzvolumen „alter Tiere“: Dereg- vs. BL6-Tiere (D7, D14)

Erläuterung: Die Abbildung zeigt die apoptotische Dichte der Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbung für Dereg- (rot) und BL6-Tiere (schwarz) an Tag 7 bzw. 14 nach Infarkt. Eine Normalverteilung wird angenommen. Ein Datenpunkt bildet die mittlere apoptotische Dichte für ein Tier ab, wofür zwei Milzschnitte aus je acht Clustern zur Auswertung kamen – dieser wurde gegen das Milzvolumen aufgetragen. Für D7, BL6 & D14, Dereg gilt n = 5; D7, für Dereg & D14, BL6: n = 4. Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet. Eine Normalverteilung wird angenommen. Die Ergebnisse wurden mittels *Pearson-Test* untersucht, wobei keine Korrelation ermittelt werden konnte.

5.4. Vergleich von „jungen“ und „alten“ Tieren

Untersucht wurde, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, die apoptotische Dichte der vier Leukozytenpopulationen. Der Vergleich erfolgt zwischen drei Monate alten („jungen“) und einjährigen („alten“) Tieren, 14 Tage postoperativ (D14).

5.4.1. Apoptosedichte ausgewählter Zellpopulationen

Die apoptotische Dichte wurde nach dem in Kapitel 4.2.6 dargestellten Protokoll bestimmt. Die zusammengefassten Ergebnisse sind Abbildung 13 zu entnehmen. Eine detaillierte Auswertung findet sich im Anhang (siehe Abb. A3).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Mit Ausnahme der CD11c⁺-Zellen zeigt sich ein Trend zu höherer Varianz und höheren Mittelwerten in der Apoptose für die BL6-Tiere, sowohl in „jungen“ als auch in „alten“ Tieren. Für die BL6-Tiere ist die Apoptose in CD11c⁺, CD3⁺/CD8⁺ und CD3⁺/CD4⁺ bei den „jungen“ Tieren höher als bei den „alten“. In den Dereg-Tieren ist die apoptotische Dichte der CD3⁺/CD8⁺- und CD3⁺/CD4⁺-Zellen ähnlich. Für die Ly6G⁺- und CD11c⁺-Zellen liegt die Apoptosedichte in den „jungen“ Dereg-Tieren höher als bei den „alten“ Tieren.

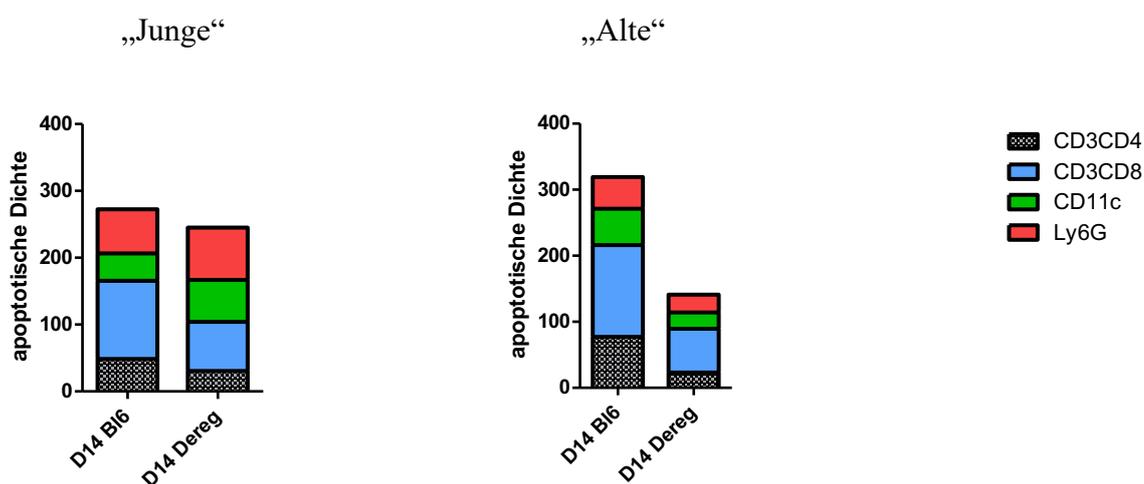


Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der apoptotischen Dichte in Dereg- vs. BL6-Tieren („alte“ und „junge“ Tiere, D14)

Erläuterung: Die Zuordnung zu einer Gruppe erfolgte nach BL6- und Dereg-Tieren sowie nach dem Alter der Tiere („alt“ = einjährig, „jung“ = dreimonatig). Die für die Darstellung ermittelten Mittelwerte sind in Säulen dargestellt und aus den Ergebnissen der Einzelfärbungen (siehe Anhang, Abb. A3) für CD3⁺/CD4⁺ (grau), CD3⁺/CD8⁺ (blau), CD11c⁺ (grün) und Ly6G⁺ (rot) ermittelt. n = 5 (Ausnahme: „alte“, D14, BL6: n = 4).

5.4.2. Korrelation von Apoptosedichte und Schlaganfallvolumen

Die berechnete apoptotische Dichte für die „jungen“ Tiere wurde mittels *Pearson-Test* auf eine Korrelation mit dem Schlaganfallvolumen an Tag 3 nach Infarktinduktion untersucht (siehe Abb. 14). Es wurde keine Signifikanz für die „jungen“ Tiere ermittelt.

Um einen besseren Vergleich zwischen „jungen“ und „alten“ Tieren zu ermöglichen, werden im Folgenden erneut die Ergebnisse für die unter Kapitel 5.2.1 ermittelten Daten abgebildet.

Ergebnisse

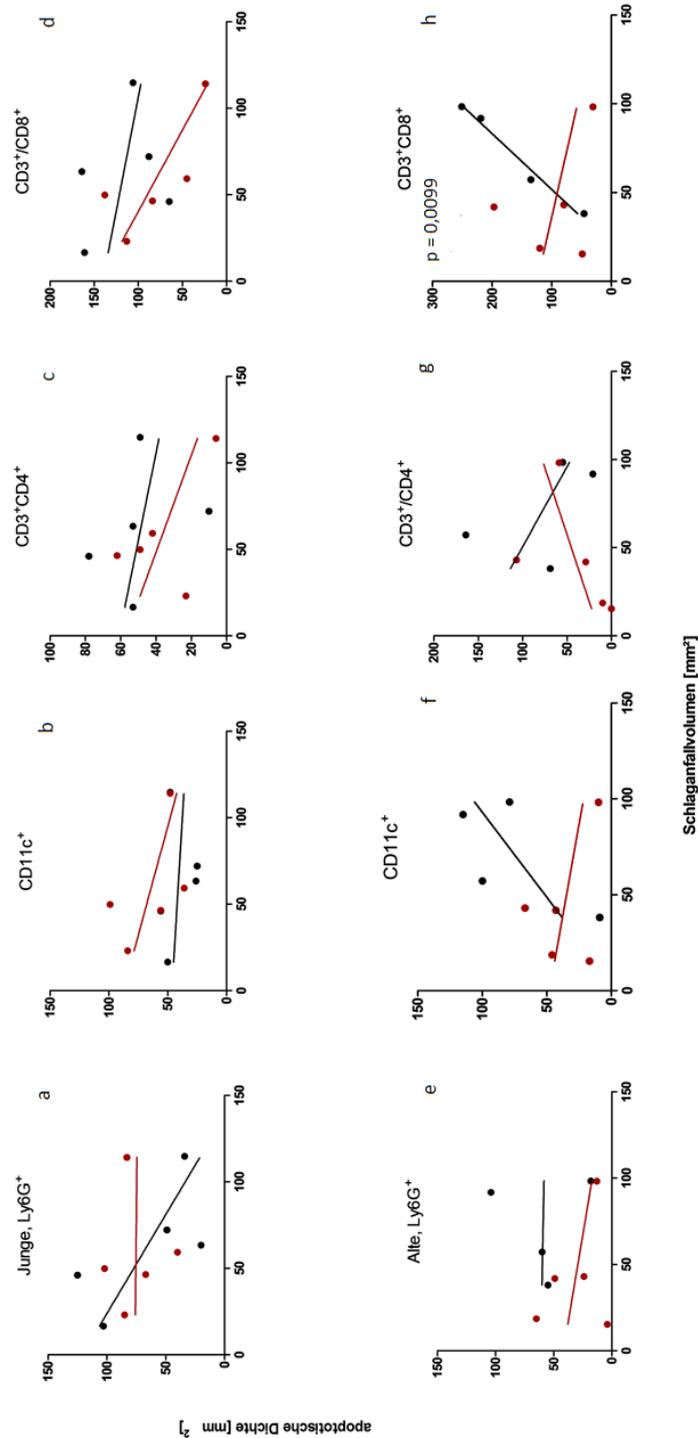


Abbildung 14: Korrelation von apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ und „junge“ Tiere, D14)

Erläuterung: Die Werte der apoptotische Dichte der Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen entsprechen den unter 5.3.1 beschriebenen Ergebnissen für die „jungen“ Tiere D14 (obere Reihe) bzw. „alten“ Tieren D14 (untere Reihe). Unterschieden wurde nach Färbung und Gruppenzugehörigkeit („jung“, „alt“). Die Daten der Dereg-Tiere werden in Rot und die der BL6-Tiere in Schwarz dargestellt. Eine Normalverteilung wird angenommen. Ein Datenpunkt bildet die mittlere apoptotische Dichte für ein Tier ab, wofür zwei Milzschnitte aus je acht Clustern zur Auswertung kamen – das Ergebnis wurde gegen das Schlaganfallvolumen drei Tage postoperativ aufgetragen. Für die „jungen“ Tiere gilt n = 5. Die Daten der „alten“ Tiere D14 entsprechen denen in Abb.10. Der *Pearson-Test* ergab eine sehr signifikante Korrelation für die BL6-Tiere D 14 bei der CD3⁺/CD8⁺/TUNEL-Färbung (*Pearson's r* = 0,9901, *p-Value* = 0,0099; vgl. Abb. 14h).

5.4.3. Korrelation von Apoptosedichte und Milzvolumen

Die Ergebnisse der apoptotischen Dichte für die Färbungen der „alten“ und „jungen“ Tiere werden im Zusammenhang mit den im MRT bestimmten Milzvolumina der Tiere drei Tage nach Infarkt untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 15 dargestellt.

Mittels *Pearson-Test* zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen der apoptotischen Dichte der CD11c⁺-Zellen und dem Milzvolumen für die „jungen“ BL6-Tiere, mit einem *Pearson's r* von 0,9239 und einem *p-Value* von 0,0249. Bei dieser Gruppe geht eine hohe apoptotische Dichte mit einem großen Milzvolumen einher.

Ergebnisse

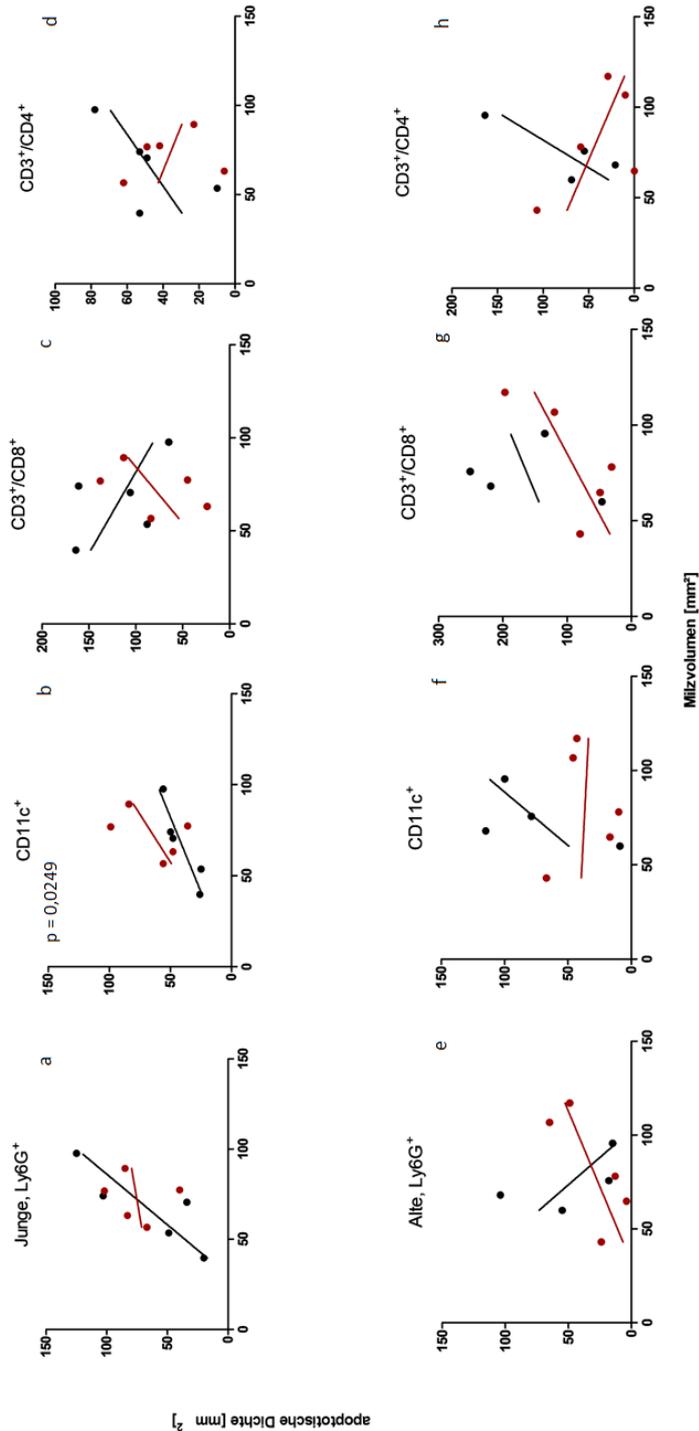


Abbildung 15: Korrelation von apoptotischer Dichte und Milzvolumen: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ und „junge“ Tiere, D14)

Erläuterung: Abbildung 15 zeigt die Darstellung der Werte der apoptotischen Dichte bei Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen für Dereg- (rot) und BL6-Tiere (schwarz) an Tag 14 nach Infarkt. Es kamen vier BL6- und fünf Dereg-Tiere zur Auswertung. Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet und eine Normalverteilung angenommen. Ein Datenpunkt bildet die mittlere apoptotische Dichte für ein Tier ab, wofür zwei Milzschnitte aus je acht Clustern zur Auswertung kamen. Dieser wurde gegen das Milzvolumen drei Tage postoperativ aufgetragen. Die Anwendung eines *Pearson-Tests* ergibt eine Korrelation zwischen der apoptotischen Dichte der CD11c⁺-Zellen und dem Milzvolumen für die „jungen“ BL6-Tiere, mit einem *Pearson's r* von 0,9239 und einem *p-Value* von 0,0249 (vgl. Abb. 15b). Die Daten der „alten“ Tiere D14 entsprechen denen in Abb. 11.

6 Diskussion

6.1. Vergleichsfärbung zwischen Dereg- und BL6-Tieren im zeitlichen Verlauf

Die Auswirkung einer Treg-Depletion auf die Apoptosedichte ausgewählter Leukozytenpopulationen in der murinen Milz nach induziertem Schlaganfall wurde für die „jungen“ Tiere im Alter von 3 Monaten untersucht. Für die Zeitspanne von Tag 1 bis 5 zeigte sich, dass die apoptotische Dichte im zeitlichen Verlauf für die Dereg-Tiere relativ konstant bleibt (siehe Apoptosedichte ausgewählter Lymphozytenpopulationen 5.2.1), während diese in den BL6-Tieren stärker variiert. Dieses Resultat scheint nicht methodisch begründet zu sein, da Selbiges auch in anderen Arbeiten für die CD3⁺ beobachtet wurde (Ickler, 2015).

Zudem zeigte sich ein starker Anstieg in der Apoptosedichte der BL6-Tiere, der sich sehr signifikant von der in Dereg-Tieren unterscheidet, was in vorliegender Arbeit für die CD3⁺/CD8⁺ an D1 gezeigt wird (siehe Anhang, Abb. A1). Eine Zunahme der Apoptose konnte auch von Liesz und Prass im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Schlaganfall beobachtet werden (Liesz *et al.*, 2009 a; Prass *et al.*, 2003). Dieser Zeitraum wurde mit dem hier verwendeten Protokoll nicht erfasst.

Auf den starken Anstieg der Apoptose an Tag 1 folgt eine Abnahme, wobei sich die Werte denen der Dereg-Tiere annähern. In diesem Punkt unterscheiden sich die hier beschriebenen Ergebnisse von denen Offners, der nach 22 Stunden einen leichten, nach 96 Stunden jedoch einen starken Anstieg beobachtete (Offner *et al.*, 2006 b).

Der sehr signifikante Anstieg in der Apoptose von CD3⁺/CD4⁺ in BL6-Tieren einen Tag nach Infarkt (siehe Anhang, Abb. A1), könnte mit einem quantitativen Anstieg dieser Population im Zusammenhang stehen, da ein Anstieg von CD3⁺/CD4⁺ mit dem Vorhandensein von Tregs verbunden zu sein scheint. Dies belegen Ergebnisse aus Experimenten zum adoptiven Transfer von Tregs, die einen quantitativen Anstieg von CD3⁺/CD4⁺ zeigen (Li *et al.*, 2013 b). Die von Li beobachtete Zunahme auch von CD3⁺/CD8⁺ ließ sich in vorliegender Arbeit jedoch nicht bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Untersuchungen an Tag 7 und 14 nach Infarkt durchgeführt, mit dem Ziel, auch langfristige Auswirkungen einer Depletion zu erfassen. Es zeigt

sich für die BL6-Tiere eine leichte Zunahme in der Apoptosedichte der untersuchten Leukozytenpopulationen, während diese in den Dereg-Tieren nahezu unverändert bleibt (Abb. 10).

Zusammenfassend lässt sich zu allen betrachteten Zeitpunkten feststellen, dass in der Summe die apoptotische Dichte der berücksichtigten Leukozytenpopulationen in den BL6-Tieren stets höher ist, als die der Dereg-Tiere (siehe 5.2.1, 5.3.1). Diese Beobachtung führt zur Hypothese, dass Tregs einen Beitrag zur Induktion der Apoptose in der Milz leisten und damit immunsuppressive Wirkung haben. Unter der Annahme, dass die Reaktion des Immunsystems nach einem Infarkt von der Peripherie ausgeht (Zierath *et al.*, 2013), lässt sich ebenfalls vermuten, dass die Tregs durch Verminderung der Immunreaktion das Outcome nach einem Schlaganfall verbessern können.

Die Betrachtung des späten Zeitpunktes D14 macht es notwendig, sich mit dem experimentellen Modell der Treg Zell Depletion, das in dieser Arbeit Anwendung findet, auseinanderzusetzen: Es handelt sich nur um eine transiente und keine dauerhafte Depletion. In der Literatur finden sich Hinweise, dass sich 21 Tage nach Treg-Depletion der Treg-Anteil wieder normalisiert hat und dem der Kontrolltiere entspricht (Kleinschnitz *et al.*, 2013). Diese Befunde sind bei der Einschätzung der Ergebnisse der D14-Tiere zu berücksichtigen, die von diesem Effekt beeinflusst sein könnten und dessen Ausmaß für unsere Versuchsbedingungen nicht bestimmt worden ist.

Methodisch ebenfalls bedeutsam ist die jeweils angewandte Variante zur Bestimmung der apoptotischen Dichte: Offner nutzt zur Berechnung der Dichte das gesamte Milzvolumen (Offner *et al.*, 2006 b, 2009). In dieser Arbeit sowie der von J. Ickler wird ausschließlich die von der jeweiligen Leukozytenpopulation bedeckte Fläche als Berechnungsgrundlage herangezogen (Ickler, 2015). Die Bestimmung der apoptotischen Dichte wurde dadurch erschwert, dass einzelne auszuwertende Schnitte leichte Defekte an den Rändern aufwiesen, was zu Ungenauigkeiten bei der Abschätzung der Milzgrenzen führt. Auch gilt es zu berücksichtigen, dass die Leukozytencluster nicht homogen in der Milz verteilt vorliegen, sondern in den Randregionen nur vereinzelt aufzufinden sind. Um die Vergleichbarkeit zu erhöhen, wurden für die Experimente dieser Arbeit Schnitte ähnlicher Tiefe verwendet. Des Weiteren betrachtet Offner die Apoptosedichte aller Leukozyten, wohingegen hier die Dichte differenziert wurde. Dies ist bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen und macht deutlich, dass die Ergebnisse von Offner nicht direkt mit denen von J. Ickler und denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind.

Zu beachten ist weiterhin, dass sich die Darstellungsmethoden apoptotischer Zellen unterscheiden: Bei der *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS)-Analyse erfolgt die Darstellung mittels *Annexin V* und *Propidium-Iodid*, was es ermöglicht, sowohl frühe V/PI⁻-, als auch späte V/PI⁺-Stadien der Apoptose zu detektieren (Kleinschnitz *et al.*, 2013). Die hier Anwendung findende TUNEL-Färbung (Kyrylkova *et al.*, 2012, Herstellerprotokoll des *In Situ Cell Detection Kit TMRred* version 11, Roche) erfasst dagegen hauptsächlich spät-apoptotische Zellen. Dies könnte zu einer vergleichsweise geringeren Anzahl detektierter apoptotischer Zellen in dem hier verwendeten Protokoll führen.

6.2. Zusammenhang zwischen Apoptosedichte und Infarktvolumen

In Vorarbeiten konnte eine Korrelation von hoher Apoptosedichte und Infarktvolumen bei der CD3⁺/TUNEL-Färbung für die Dereg-Tiere festgestellt werden (Ickler, 2015). Dieser Zusammenhang lässt sich auch in den hier gewonnenen Ergebnissen erkennen: Signifikanzen finden sich im zeitlichen Verlauf für Dereg-Tiere an D5 in der Apoptose von Ly6G⁻- und CD11c⁺-Zellen (Abb. 9). Im zeitlichen Verlauf zeigt sich besonders zu späteren Zeitpunkten eine Korrelation zwischen einem initial hohen Schlaganfallvolumen und hohen Apoptosewerten. Alle weiteren explorativen Analysen ergaben jedoch keine signifikanten Zusammenhänge.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ausmaß des Infarktvolumens bei Abwesenheit der Tregs stärker mit der Apoptose einiger Lymphozytenpopulationen korreliert und dieser Zusammenhang im späteren Verlauf an Bedeutung zunimmt. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Tregs eine modulierende Funktion haben, die diese Unterschiede abschwächt und besonders für die langfristige Genesung bedeutsam sind.

6.3. Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und Milzvolumen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Apoptosedichte der Leukozytenpopulationen auf einen Zusammenhang mit der Milzgröße untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse lassen kaum eine Korrelation zwischen Apoptosedichte und Milzvolumen erkennen. Ausschließlich für die „jungen“ BL6-Tiere in der CD11c⁺-Färbung lässt sich eine Signifikanz nachweisen (Abb. 15).

Das Schlaganfallvolumen korreliert mit dem Milzvolumen (Vendrame *et al.*, 2006). Außerdem wurde unter Kapitel 6.2 ein möglicher Zusammenhang zwischen Infarktvolumen und Apoptose aufgezeigt. Dieser Zusammenhang steht jedoch in der Literatur zur Diskussion, wo auch eine

zweiphasige Reaktion der Milz beschrieben wird: Auf eine Verkleinerungs- (Offner *et al.*, 2006 b) folgt eine Expansionsphase (Sahota *et al.*, 2012). Wenn die untersuchten Milzen sich aufgrund unterschiedlicher Infarkt volumina bei der Auswertung in unterschiedlichen Phasen befinden, würde dies eine Erklärung für den in vorliegender Arbeit nicht zu erkennenden Zusammenhang von Apoptosedichte und Milzvolumen darstellen.

6.4. Unterschiede in der Apoptose von Dereg- und BL6-Tieren bei „alten“ und „jungen“ Mäusen

Da der Schlaganfall im Alter an klinischer Relevanz gewinnt, wird in dieser Arbeit untersucht, ob sich die Apoptose der Leukozytenpopulationen nach Infarkt altersbedingt unterscheidet und ob sich die für „junge“ Tiere generierten Ergebnisse auf „alte“ Tiere übertragen lassen.

Die Untersuchung zeigte, dass eine höhere Apoptose und Varianz von BL6-Tieren im Vergleich zu Dereg-Tieren (was für die „jungen“ Tiere unter Kapitel 5.2 gezeigt wurde), auch in den einjährigen, „alten“ Tieren evident ist (siehe Anhang, Abb. A2). Jedoch sind leichte Unterschiede in der Verteilung ersichtlich: Die Apoptosedichte ist bei „alten“ Tieren insgesamt höher und die Varianz ist stärker ausgeprägt als bei „jungen“ Tieren (Abb. 13).

Die Korrelation zwischen Schlaganfallvolumen und Apoptosedichte ausgewählter Leukozytenpopulationen ist für „alte“ Tiere offensichtlicher: Es zeigt sich ein Zusammenhang bei den „alten“ Tieren D7, Dereg, CD11c⁺ und eine sehr signifikante Korrelation in D14, BL6 bei CD3⁺/CD8⁺ (Abb. 11). Dieses Ergebnis passt zu der beschriebenen Zunahme von Tregs im Alter (Dotson *et al.*, 2014) und ihren unveränderten Eigenschaften nach einem Infarkt, was sowohl für murine als auch für humane Tregs nachgewiesen wurde (Hug *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2012). Zudem scheint die Schwere des Infarkts keinen Einfluss auf die Apoptose humaner Tregs zu haben (Yan *et al.*, 2012).

Die deutlicheren Zusammenhänge zwischen Infarkt volumen und Apoptosedichte sowie die verstärkten Effekte bei vorhandenen Tregs im Alter unterstützen die in „jungen“ Tieren erzielten Ergebnisse, wobei feine Unterschiede in der Verteilung auf die Zellpopulationen bestehen. Diese Ergebnisse sind bei der Bewertung von Treg-Daten „junger“ Tiere zu berücksichtigen und machen eventuell auch kleine Unterschiede relevant, die es dann in „alten“ Tieren zu überprüfen gilt.

6.5. Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf Untersuchungen an kleinen Tierzahlen, die je nach Versuch bei 4 oder 5 lagen (siehe Kapitel 5.2). Eine Erhöhung der Tierzahl wäre in Anbetracht der hohen Varianz in BL6-Tieren sinnvoll und könnte weitere Zusammenhänge und Korrelationen erkennen lassen.

Von Interesse könnte auch die Erweiterung der Gruppe „alter“ Tiere sein, zeigt diese doch stärkere Effekte.

Es musste zudem eine Auswahl der zu untersuchenden Leukozytenpopulationen getroffen werden, wodurch möglicherweise nicht alle Effekte erfasst wurden.

6.6. Ausblick

Die in dieser Arbeit festgestellten Unterschiede in BL6- und Dereg-Tieren gilt es weiter zu untersuchen. Die Effekte einer Depletion in „alten“ Tieren sind eindeutiger, was hilfreich bei der Ergründung ihrer Funktion und Rolle nach einem Schlaganfall sein könnte. Auch wenn die Übertragung von tierexperimentell erzeugten Befunden auf den Menschen mit größter Vorsicht erfolgen muss, könnte der im Alter zunehmende Einfluss der Tregs auch für Menschen zutreffen. Parallelen zu Anzahl und altersbedingtem Verhalten von murinen und humanen Tregs wurden bereits in anderen Arbeiten untersucht (Hug *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2012).

Da die Prävalenz von Schlaganfällen besonders im Alter zunimmt, würde dies die Forschung an „alten“ Mäusen nahelegen. Interessant wäre auch die Untersuchung der Treg-Depletion auf andere Teile des Immunsystems, um weitere Erkenntnisse zur Treg-Funktion nach einem Schlaganfall zu generieren.

Von klinischer Relevanz dürfte auch die nähere Untersuchung der geschlechtsspezifischen Unterschiede sein. Im Menschen können Unterschiede in der Reaktion auf einen Schlaganfall zwischen Männern und Frauen beobachtet werden, wobei der Outcome bei den untersuchten Frauen wesentlich schlechter ist als der der Männer (Di Carlo *et al.*, 2003). Ein möglicher Erklärungsansatz stellt der quantitative und funktionelle Unterschied der Tregs dar (Yan *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Splenektomie die geschlechtsspezifischen Differenzen reduziert: Bei männlichen Tieren führt der Eingriff zu einer Reduktion des Schlaganfallvolumens auf das niedrigere Niveau der weiblichen Tiere. In weiblichen Tieren dagegen konnte kein Effekt einer Milzentfernung nachgewiesen werden (Yan *et al.*, 2012). Allerdings wurde

eine höhere Anzahl peripherer CD4⁺-Zellen und peripherer Tregs in weiblichen Tieren ermittelt (Dotson *et al.*, 2014). Dies lässt die Vermutung zu, dass mithilfe von Experimenten zur Treg-Depletion weitere Informationen zur geschlechtsspezifischen Immunantwort gewonnen werden können (Dotson *et al.*, 2015).

Weitere Untersuchungen zeigen außerdem, dass es viele langfristige immunologische Folgen eines Schlaganfalls gibt, die durch Tregs vermittelt sind. Diese gehen aber über den in vorliegender Arbeit untersuchten Zeitraum hinaus (Stubbe, 2013). Dies impliziert, dass Experimente über eine längere Zeitspanne relevante Erkenntnisse erbringen könnten, die der weiteren Aufklärung der Treg-Funktion dienlich wären. Ein besseres Verständnis könnte helfen, gezieltere Therapieoptionen zu entwickeln, um den Outcome bei Schlaganfallpatienten zu verbessern.

7 Zusammenfassung

Bei Verschluss einer Zerebralarterie kommt es zu einer lokalen Minderdurchblutung und folglich zum Absterben von Gewebe der betroffenen Region sowie zur Induktion einer lokalen Inflammation. Diese Reaktion am Patienten kann auch beim experimentellen Verschluss mittels tMCAO (transiente Middle Cerebral Artery Occlusion) beobachtet werden.

Die Auswirkung des Schlaganfalls betrifft nicht ausschließlich das Hirngewebe, sondern führt auch zu einer Immunsuppression in der Peripherie: Es kommt zu Lymphozytopenie, erhöhter Apoptose der Splenozyten und zu einer Atrophie lymphatischer Organe, wie z. B. der Milz.

Die immunologischen Folgen des Schlaganfalls und speziell die Funktionen verschiedener Leukozytenpopulationen stehen im Fokus aktueller Forschungen. Die Rolle der Tregs, besonders mit fortschreitendem Alter, ist bisher nicht eindeutig geklärt und wurde daher in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden FoxP3⁺-Treg-depletierte Tiere (Deregs) mit C57BL/6 (BL6) naiven und schlaganfallinduzierten Tiere verglichen. Untersucht wurde die apoptotische Dichte (Anzahl apoptotischer Leukozyten einer Population pro mm² von dieser Population bedeckter Fläche) von ausgewählten Lymphozytenpopulationen: CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, Ly6G⁺ und CD11c⁺. Die Untersuchung erfolgt im folgenden Design: 1) Entwicklung der Apoptose im zeitlichen Verlauf 1 bis 7 Tage bzw. 7 bis 14 Tage nach Infarkt. Diese Untersuchung ergab einen Trend zu höherer Apoptose und Varianz in BL6-Tieren sowie Signifikanzen für einzelne Populationen und Zeitpunkte. 2) Es wurden die Unterschiede zwischen „jungen“ und „alten“ Tieren untersucht, wobei sich die in „jungen“ Tieren beobachtete Tendenz zu höherer Apoptose und Varianz in BL6-Tieren stärker zeigte. 3) Des Weiteren wurde der Zusammenhang von Apoptosedichte und Schlaganfallvolumen untersucht. Dabei konnten vereinzelt Korrelationen zwischen hoher Apoptose und Infarktgröße ermittelt werden, die in den „alten“ Tieren stärker ausgeprägt sind. Die Korrelationen traten sowohl in BL6- als auch in Dereg-Tieren auf. 4) Die Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen apoptotischer Dichte und Milzvolumen ergaben ausschließlich für die CD11c⁺-Färbung der „jungen“ BL6-Tiere eine Korrelation. Einige Effekte und Trends gilt es noch mit größerer Tierzahl zu überprüfen.

8 Literaturverzeichnis

1. Ajmo CT, Vernon DOL, Collier L, et al. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res.* 2008;86(10):2227–2234. doi:10.1002/jnr.21661.
2. Ajmo CT, Collier LA, Leonardo CC, et al. Blockade of adrenoreceptors inhibits the splenic response to stroke. *Exp Neurol.* 2009;218(1):47–55. doi:10.1016/j.expneurol.2009.03.044.
3. Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke.* 1996;27:1739–1743. doi:10.1161/01.STR.27.10.1739.
4. Arques JL, Regoli M, Bertelli E, et al. Persistence of apoptosis-resistant T cell-activating dendritic cells promotes T helper type-2 response and IgE antibody production. *Mol Immunol.* 2008;45(8):2177–2186. doi:10.1016/j.molimm.2007.12.004.
5. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(8):819–834. doi:10.1097/00004647-199908000-00001.
6. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195(5):603–616. doi:10.1084/jem.20011629.
7. Becker KJ, Kindrick DL, Lester MP, et al. Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(12):1634–1644. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600160.
8. Bellinger DL, Millar BA, Perez S, et al. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cell Immunol.* 2008;252(1–2):27–56. doi:10.1016/j.cellimm.2007.09.005.
9. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):253–257. doi:10.1038/nri1032.
10. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* 2013;39(5):806–818. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.010.
11. Chamorro A, Amaro S, Vargas M, et al. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2007 a;252(1):29–35. doi:10.1016/j.jns.2006.10.001.

12. Chamorro Á, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: A manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke*. 2007 b;38(3):1097–1103. doi:10.1161/01.STR.0000258346.68966.9d.
13. Chen S, Wu H, Klebe D, et al. Regulatory T cell in stroke: a new paradigm for immune regulation. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:689827. doi:10.1155/2013/689827.
14. Di Carlo A, Lamassa M, Baldereschi M, et al. Sex differences in the clinical presentation, resource use, and 3-month outcome of acute stroke in Europe: Data from a multicenter multinational hospital-based registry. *Stroke*. 2003;34(5):1114–1119. doi:10.1161/01.STR.0000068410.07397.D7.
15. Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*. 2007;38(2 Suppl):770–773. doi:10.1161/01.STR.0000251441.89665.bc.
16. Dotson AL, Zhu W, Libal N, et al. Different immunological mechanisms govern protection from experimental stroke in young and older mice with recombinant TCR ligand therapy. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(September):284. doi:10.3389/fncel.2014.00284.
17. Dotson AL, Wang J, Saugstad J, et al. Splenectomy reduces infarct volume and neuroinflammation in male but not female mice in experimental stroke. *J Neuroimmunol*. 2015;278:289–298. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.11.020.
18. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol*. 2005;174(12):7506–7515. doi:10.4049/jimmunol.174.12.7506.
19. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, et al. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):595–638. doi:11121511.
20. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, et al. Modeling stroke in mice – middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*. 2011;47:e2423. doi:10.3791/2423.
21. Erlandsson H-H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. In: *European journal of immunology*. 2004;34 (6):1503–1512. doi: 10.1002/eji.200424916.

22. Famakin BM. The Immune Response to Acute Focal Cerebral Ischemia and Associated Post-stroke Immunodepression: A Focused Review. *Aging Dis.* 2014;5(5):307–326. doi:10.14336/AD.2014.0500307.
23. Garcia JH, Liu K-F, Ho K-L. Neuronal Necrosis After Middle Cerebral Artery Occlusion in Wistar Rats Progresses at Different Time Intervals in the Caudoputamen and the Cortex. *Stroke.* 1995;26:636–643. doi:10.1161/01.STR.26.4.636
24. Gauberti M, Vivien D. Letter by Gauberti and Vivien regarding article, “amplification of regulatory T cells using a CD28 superagonist reduces brain damage after ischemic stroke in mice”. *Stroke.* 2015;46(2):e50–1. doi:10.1161/STROKEAHA.114.008071.
25. Gee JM, Kalil A, Thullbery M, et al. Induction of immunologic tolerance to myelin basic protein prevents central nervous system autoimmunity and improves outcome after stroke. *Stroke.* 2008;39(5):1575–1582. doi:10.1161/STROKEAHA.107.501486.
26. Gee JM, Zierath D, Hadwin J, et al. "Long term immunologic consequences of experimental stroke and mucosal tolerance. *Exp Transl Stroke Med.* 2009;1:3. doi:10.1186/2040-7378-1-3.
27. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, et al. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock.* 2006;25(6):571–574. doi:10.1097/01.shk.0000209540.99176.72.
28. Hermann DM, Chopp M. Promoting neurological recovery in the post-acute stroke phase: benefits and challenges. *Eur Neurol.* 2014;72(5–6):317–25. doi: 10.1159/000365171.
29. Hoeppli RE, Wu D, Cook L, et al. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Front Immunol.* 2015;6:61. doi:10.3389/fimmu.2015.00061.
30. Hug A, Liesz A, Muerle B, et al. Reduced efficacy of circulating costimulatory cells after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2011;42(12):3580–3586. doi:10.1161/STROKEAHA.111.620948.
31. Iadecola C, Anrathner J. The immunology of stroke: from mechanism to translation. *Nat Med.* 2012;17(7):796–808. doi:10.1038/nm.2399.
32. Ickler J. Der Effekt einer Treg-Depletion auf die Apoptose von Leukozytensubpopulationen nach experimentellem Schlaganfall in der Milz der Maus. 2015.

33. Jin R, Zhu X, Liu L, et al. Simvastatin attenuates stroke-induced splenic atrophy and lung susceptibility to spontaneous bacterial infection in mice. *Stroke*. 2013;44(4):1135–1143. doi:10.1161/STROKEAHA.111.000633.
34. Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol*. 2006;200(1):38–49. doi:10.1016/j.expneurol.2006.01.032.
35. Kim JS, Gautam SC, Chopp M, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of neuroimmunology*. 1995;56(2):127–134.
36. Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A, et al. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*. 2013;121(4):679–691. doi:10.1182/blood-2012-04-426734.
37. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, et al. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 2012;887:41–47. doi:10.1007/978-1-61779-860-3_5.
38. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of FoxP3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*. 2007;204(1):57–63. doi:10.1084/jem.20061852.
39. Li P, Gan Y, Sun B-L, et al. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol*. 2013 a;74(3):458–471. doi:10.1002/ana.23815.
40. Li P, Mao L, Zhou G, et al. Adoptive regulatory t-cell therapy preserves systemic immune homeostasis after cerebral ischemia. *Stroke*. 2013 b;44(12):3509–3515. doi:10.1161/STROKEAHA.113.002637.
41. Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, et al. The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: Immunodepression versus immunomodulation. *Stroke*. 2009 a;40(8):2849–2858. doi:10.1161/STROKEAHA.109.549618.
42. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med*. 2009 b;15(2):192–199. doi:10.1038/nm.1927.
43. Liesz A, Hu X, Kleinschnitz C, et al. Functional role of regulatory lymphocytes in stroke: facts and controversies. *Stroke*. 2015;46(5):1422–1430. doi:10.1161/STROKEAHA.114.008608.

44. Liu T, McDonnell PC, Young PR, et al. Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke*. 1993;24(11):1746–50. doi:10.1161/01.STR.24.11.1746.
45. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994;25(7):1481–1488. doi:10.1161/01.STR.25.7.1481.
46. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331–342. doi:10.1038/nri1594.
47. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, et al. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods*. 2009;346(1):55–63. doi:10.1016/j.jim.2009.05.004.
48. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke*. 1994;25(7):1469–1475. doi:10.1161/01.STR.25.7.1469.
49. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
50. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: Dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood*. 2003;101(2):611–620. doi:10.1182/blood-2002-06-1769.
51. Mracsko E, Liesz A, Karcher S, et al. Differential effects of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis on systemic immune cells after severe experimental stroke. *Brain Behav Immun*. 2014;41:200–209. doi:10.1016/j.bbi.2014.05.015.
52. Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(4):379–386. doi:10.1016/j.coph.2006.01.010.
53. Na S-Y, Mracsko E, Liesz A, et al. Amplification of Regulatory T Cells Using a CD28 Superagonist Reduces Brain Damage After Ischemic Stroke in Mice. *Stroke*. 2014;46(1):212–220. doi:10.1161/STROKEAHA.114.007756.
54. Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, et al. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology*. 2006;66(10):1550–1555. doi:10.1212/01.wnl.0000216133.98416.b4.

55. Noble A, Macary PA, Kemeny DM. IFN-gamma and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8⁺ T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. *J Immunol.* 1995;155(6):2928–2937. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673710>.
56. Offner H, Subramanian S, Parker SM, et al. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 a;26(5):654–665. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600217.
57. Offner H, Subramanian S, Parker SM, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006 b;176(11):6523–6531.
58. Offner H, Vandenbark AA, Hurn PD. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience.* 2009;158(3):1098–1111. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.033.
59. Ostrowski RP, Schulte RW, Nie Y, et al. Acute Splenic Irradiation Reduces Brain Injury in the Rat Focal Ischemic Stroke Model. *Transl Stroke Res.* 2012;3(4):473–481. doi:10.1007/s12975-012-0206-5.
60. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, et al. IY29CH04-Ouyang Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71–109. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312.
61. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, et al. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 2003;9(5–8):125–134. doi:10.3892/mmr.2012.751.
62. Prass K, Meisel C, Hoflich C, et al. Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1-like Immunostimulation. *J Exp Med.* 2003;198(5):725–736. doi:10.1084/jem.20021098.
63. Qiu J, Nishimura M, Wang Y, et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(5):927–938. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600582.
64. Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, et al. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis.* 2011;26(1):87–90. doi:10.1007/s11011-010-9226-6.

65. Ruan L, Lau B, Wang J, et al. Neurogenesis in neurological and psychiatric diseases and brain injury: From bench to bedside. *Progress in Neurobiology*. 2014;115:116–137. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.12.006.
66. Ruhnau J, Schulze J, Sarnowski B von, et al. Reduced Numbers and Impaired Function of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Ischemic Stroke Patients. vol. 2016, Article ID 2974605, 9 pages, 2016. doi:10.1155/2016/2974605.
67. Sahota P, Vahidy F, Nguyen C, et al. Changes in spleen size in patients with acute ischemic stroke: a pilot observational study. *Int J Stroke*. 2012;8(2):60–67. doi:10.1111/ijvs.12022.
68. Saino O, Taguchi A, Nakagomi T, et al. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J Neurosci Res*. 2010;88:2385–2397.
69. Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:170–181. doi:10.1038/nri2711.
70. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191–195. doi:10.1038/nature09475.
71. Schuhmann MK, Kraft P, Stoll G, et al. CD28 superagonist-mediated boost of regulatory T cells increases thrombo-inflammation and ischemic neurodegeneration during the acute phase of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(1):6–10. doi:10.1038/jcbfm.2014.175.
72. Seifert HA, Hall AA, Chapman CB, et al. A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(4):1017–1024. doi:10.1007/s11481-012-9406-8.
73. Sippel TR, Shimizu T, Strnad F, et al. Arginase I release from activated neutrophils induces peripheral immunosuppression in a murine model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(10):1657–1663. doi:10.1038/jcbfm.2015.103.
74. Stubbe Stubbe, T.: Lokalisierung und Charakterisierung FoxP3+ regulatorischer T-Zellen bis zu 30 Tage nach mechanischer und ischämischer Läsion des Gehirns; 2014. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, urn:nbn:de:kobv:11-100215092.

75. Sundberg E, Fasth AER, Palmblad K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 acts as a proliferation signal for activated T lymphocytes. *Immunobiology*. 2009;214(4):303–309. doi:10.1016/j.imbio.2008.09.006.
76. Vendrame M, Gemma C, Pennypacker KR, et al. Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function. *Exp Neurol*. 2006;199(1):191–200. doi:10.1016/j.expneurol.2006.03.017.
77. Vogelgesang A, Grunwald U, Langner S, et al. Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. *Stroke*. 2008;39:237–241. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.493635.
78. Vogelgesang A, May VEL, Grunwald U, et al. Functional status of peripheral blood T-cells in ischemic stroke patients. *PLoS One*. 2010;5(1):e8718. doi:10.1371/journal.pone.0008718.
79. Vogelgesang A, Becker KJ, Dressel A. Immunological consequences of ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*. 2014;129(1):1–12. doi:10.1111/ane.12165.
80. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, et al. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*. 2000;95(1):231–240.
81. Vukmanovic-Stejic M, Thomas MJ, Noble A.; et al. Specificity, restriction and effector mechanisms of immunoregulatory CD8 T cells. *Immunology*. 2001;102 (2):115–122
82. Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 2003;112(9):1437–1443. doi:10.1172/JCI200319441.
83. Wan YY, Flavell R a. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated FoxP3 expression. *Nature*. 2007;445(February):766–770. doi:10.1038/nature05479.
84. Wang XK, Yue T-L, Barone FC, et al. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol*. 1994;23(2–3):103–114.
85. Wang XK, Yue T-L, Barone FC, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke*. 1995;26:661–666.

86. Wang J, Xie L, Yang C, et al. Activated regulatory T cell regulates neural stem cell proliferation in the subventricular zone of normal and ischemic mouse brain through interleukin 10. *Front Cell Neurosci.* 2015 a;9:361. doi:10.3389/fncel.2015.00361.
87. Wang J, Yu L, Jiang C, et al. Cerebral ischemia increases bone marrow CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in mice via signals from sympathetic nervous system. *Brain Behav Immun.* 2015 b;43:172–183. doi:10.1016/j.bbi.2014.07.022.
88. Wang B, Jin K. Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis. *Metab Brain Dis.* 2015 Apr;30(2):355–65. doi: 10.1007/s11011-014-9523-6.
89. Wilckens T, De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today.* 1997;18(9):418–424. doi:10.1016/S0167-5699(97)01111-0.
90. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the FoxP3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of FoxP3. *Nat Immunol.* 2007;8(3):277–284. doi:10.1038/ni1437.
91. Winklewski PJ, Radkowski M, Demkow U. Cross-talk between the inflammatory response, sympathetic activation and pulmonary infection in the ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):2. doi:10.1186/s12974-014-0213-4.
92. Witsch E. Vergleich der Funktion von ICOS / ICOS-L und CD28 / CD80-CD86 in der Kooperation von T-Zellen mit dendritischen Zellen. 2002.
93. Xu X, Li M, Jiang Y. The paradox role of regulatory T cells in ischemic stroke. *Scientific-WorldJournal.* 2013;2013:174373. doi:10.1155/2013/174373.
94. Yan J, Read SJ, Henderson RD, et al. Frequency and function of regulatory T cells after ischaemic stroke in humans. *J Neuroimmunol.* 2012;243(1–2):89–94. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.12.019.
95. Yang J, Jiang Z, Fitzgerald DC, et al. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3678–3691. doi:10.1172/JCI37914.
96. Zierath D, Schulze J, Kunze A, et al. The immunologic profile of adoptively transferred lymphocytes influences stroke outcome of recipients. *J Neuroimmunol.* 2013;263(1–2):28–34. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.07.014.

9 Anhang

Anhang

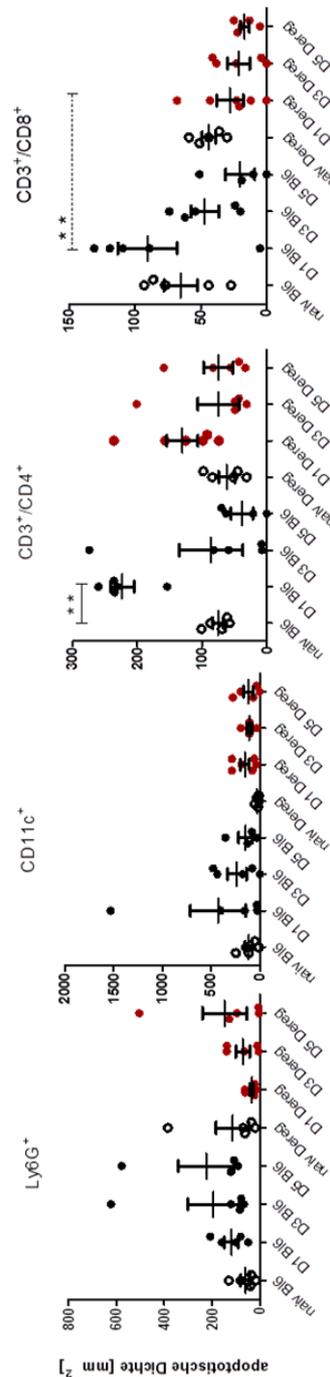


Abbildung A1: Apoptotische Dichte: Dereg- vs. BL6-Tiere (naiv, D1, D3, D5)

Erläuterung: Untersuchte Färbungen sind Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen für naive (weiß), Dereg- (rot) und BL6-Tiere (schwarz). Es wurden zu jedem Zeitpunkt und jeder Gruppe (Tag 1, 3 und 5) Färbungen von jeweils fünf Tieren (Ausnahme BL6, Tag 5: n=4) der histologischen Gruppe ausgewertet. Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet. Eine Normalverteilung wird angenommen. Angegeben ist außerdem der Durchschnitt (*mean*) mit Standardfehler (*Standard error of the mean* = SEM). Die Darstellung veranschaulicht den Vergleich zwischen BL6- und Dereg-Tieren im zeitlichen Verlauf. Mittels *One-Way-ANOVA* ergeben sich hochsignifikante Unterschiede zwischen naiven und BL6-Tieren an Tag 1 bei der CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbung mit einem *p-Value* von 0,001 sowie zwischen Dereg- und BL6-Tieren an Tag 1 bei der CD3⁺/CD8⁺/TUNEL-Färbung mit einem *p-Value* von 0,015.

Anhang

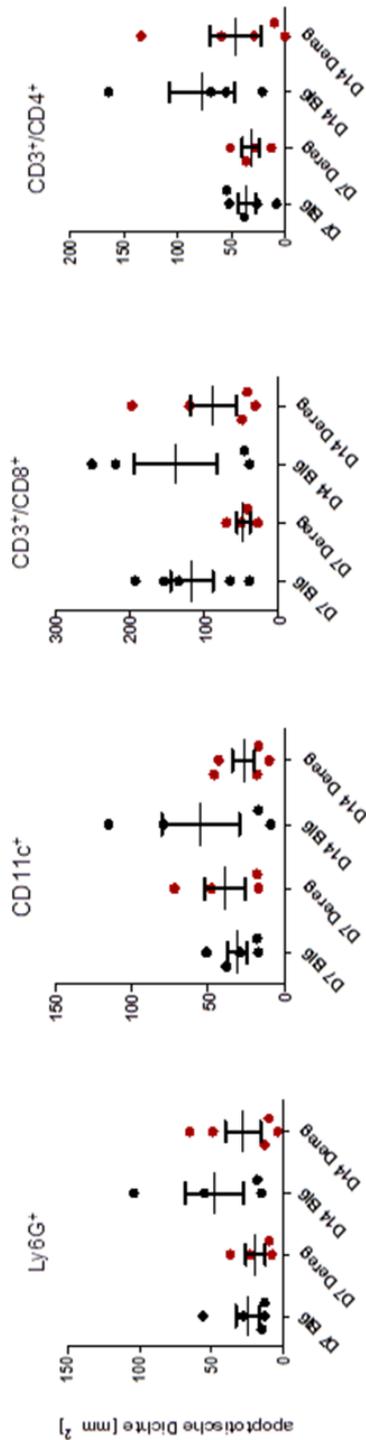


Abbildung A2: Korrelation von apoptotischer Dichte und Schlaganfallvolumen: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ Tiere, D7, D14)

Erläuterung: Werte der apoptotischen Dichte der Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen für Dereg- (rot) und BL6-Tiere (schwarz) sieben Tage nach Infarkt. Für D7, BL6 & D14, Dereg gilt n = 5; für D7, Dereg & D14, BL6: n = 4. Es kamen fünf BL6- und vier Dereg-Tiere zur Auswertung. Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet. Eine Normalverteilung wird angenommen. Angegeben ist außerdem der Durchschnitt (*mean*) mit dem Standardfehler (*Standard error of the mean* = SEM). Die Untersuchung mittels *One-Way-ANOVA* ergab keine signifikanten Unterschiede.

Anhang

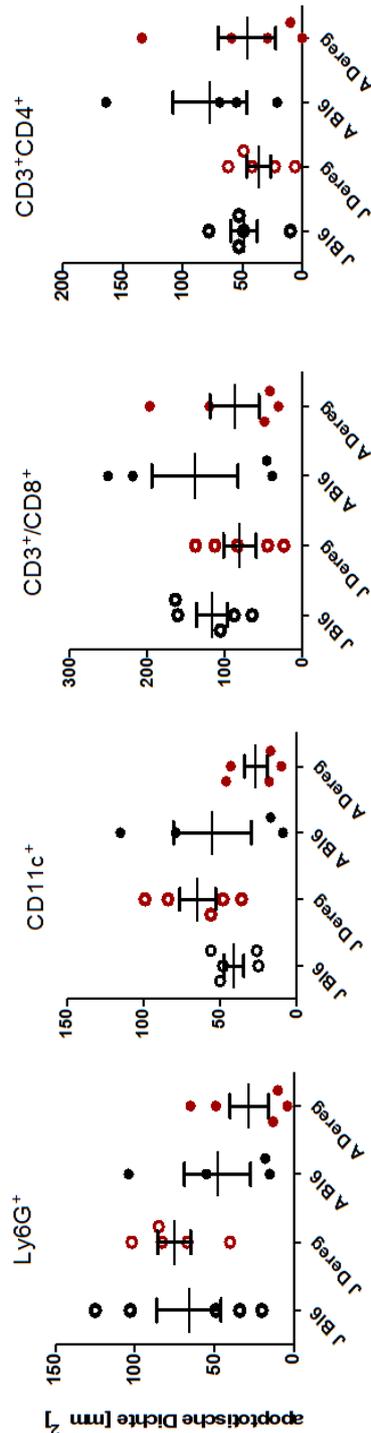


Abbildung A3: Apoptische Dichte: Dereg- vs. BL6-Tiere („alte“ und „junge“ Tiere, D14)

Erläuterung: Untersucht wurden Ly6G⁺/TUNEL-, CD11c⁺/TUNEL-, CD3⁺/CD8⁺/TUNEL- und CD3⁺/CD4⁺/TUNEL-Färbungen für Dereg- (rot) und BL6-Tiere (schwarz) 14 Tage nach Infarkt. Unterschieden wurden „junge“ (J: weiße Punkte mit farbiger Umrandung) von „alten“ Tieren (A: gefüllte Punkte). Es kamen je fünf Tiere zur Auswertung (Ausnahme „alte“ D14 BL6: n=4). Für die unterschiedlichen Färbungen wurden Milzschnitte derselben Tiere verwendet. Eine Normalverteilung wird angenommen. Ein Datenpunkt bildet die durchschnittliche apoptotische Dichte ab, die für zwei Milzschnitte eines Tieres und deren Mittel aus je acht Clustern ermittelt wurde. Angegeben ist außerdem der Durchschnitt (*mean*) mit dem Standardfehler (*Standard error of the mean* = *SEM*). Die Untersuchung mittels *One-Way-ANOVA* ergab keine signifikanten Unterschiede.

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Alexander Dressel für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Abteilung für Neuroimmunologie schon zu einem so frühen Zeitpunkt meiner medizinischen Ausbildung anfertigen zu dürfen.

Bei Frau Dr. Antje Vogelgesang möchte ich mich für die dauerhafte Betreuung und sowohl für die fachliche als auch für die organisatorische Beratung bedanken.

Mein Dank gilt des Weiteren Juliane Schulze für die Durchführung der tMCAO, die Generierung der Milzschnitte, die Messung der Schlaganfallvolumina und die stetige Erreichbarkeit für die Beantwortung meiner Fragen. Für die praktische Unterstützung im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich herzlich bei Monika Hoyer.

Christine Hackbarth und Antje Janetzko ermöglichten mir durch die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops die Auswertung der Färbungen, auch hierfür mein herzlichster Dank.

Besonderer Dank gilt Julia Ickler – ihre Vorarbeit stellt die Grundlage meiner Arbeit dar. Bei Fragen stand sie mir stets beratend zur Seite. Die gründliche Einarbeitung durch Ulrike Meyer ermöglichte die nahtlose Fortsetzung der Untersuchungen, wofür ich sehr dankbar bin.

