

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde I
Arbeitsgruppe Experimentelle perinatale Neurowissenschaften

Die geschlechtsspezifische Rolle regulatorischer T-Zellen im
Mausmodell der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Lucia Berg (geborene Beckmann)
aus Oberhausen

2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78297

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230424-124309-8



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachterin: Frau Priv.-Doz. Dr. phil. J. Herz
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. R. Engler
3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Hermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Januar 2023

Publikationen:

Beckmann, L., Obst, S., Labusek, N., Abberger, H., Koster, C., Klein-Hitpass, L., Schumann, S., Kleinschnitz, C., Hermann, D. M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Hansen, W., Herz, J. (2022)

Regulatory T Cells Contribute to Sexual Dimorphism in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury

Stroke 2022; 53, 381–390

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|--|-------|
| 1 EINLEITUNG | 7 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 14 |
| 2.1 Material..... | 14 |
| 2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer..... | 14 |
| 2.1.2 Antikörper | 16 |
| 2.1.3 Kits..... | 17 |
| 2.1.4 Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 2.2 Tierexperimente..... | 19 |
| 2.2.1 DEREK-Mausstamm | 19 |
| 2.2.2 Hypoxie-Ischämie Modell..... | 19 |
| 2.2.3 Experimentelles Design..... | 20 |
| 2.2.4 Perfusion und Gewebepreparation | 23 |
| 2.3 Histologie und Immunhistochemie..... | 24 |
| 2.3.1 Erstellung von Gewebeschnitten | 24 |
| 2.3.2 Histopathologische Evaluation peripherer Organe | 24 |
| 2.3.3 Neuropathologische Schadensevaluation und Ödem/Atrophie-Bestimmung 25 | |
| 2.3.4 Immunhistochemische Analyse der Infiltration regulatorischer T-Zellen ... | 27 |
| 2.3.5 Immunhistochemische Analyse der Neuronen- und Oligodendrozytendichte 29 | |
| 2.3.6 Immunhistochemische Analyse der Mikroglia- und Astrogliaaktivierung sowie der Gefäßschädigung | 30 |
| 2.4 Durchflusszytometrische Analysen..... | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4.1 | Ermittlung der Depletionseffizienz | 32 |
| 2.4.2 | Analyse der suppressiven Aktivität regulatorischer T-Zellen | 34 |
| 2.5 | Bestimmung der Estradiolkonzentration im Serum | 36 |
| 2.6 | Statistik | 37 |
| 3 | ERGEBNISSE | 38 |
| 3.1 | Räumlich zeitliche Regulation der Infiltration regulatorischer T-Zellen in das neonatale hypoxisch-ischämische Gehirn | 38 |
| 3.1.1 | Hypoxie-Ischämie resultiert in einer biphasischen selektiven Infiltration regulatorischer T-Zellen in das geschädigte Gehirn | 38 |
| 3.1.2 | Regulatorische T-Zellen infiltrieren insbesondere in stark geschädigte Regionen des neonatalen hypoxisch-ischämischen Gehirns..... | 40 |
| 3.1.3 | Weibliche Tregs infiltrieren stärker in das HI-geschädigte Hirngewebe vor allem in Bereichen starker Hirnschädigung..... | 42 |
| 3.2 | Validierung des DEREK-Mausmodells zur Depletion regulatorischer T-Zellen in neonatalen Mäusen | 43 |
| 3.2.1 | Die intraperitoneale Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin resultiert in einer effizienten Depletion regulatorischer T-Zellen unabhängig vom Geschlecht | 43 |
| 3.2.2 | Die zweimalige Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin in neonatalen Mäusen führt nicht zu langfristigen Autoimmunitätsreaktionen..... | 44 |
| 3.3 | Einfluss der akuten Depletion regulatorischer T-Zellen auf die strukturelle und zelluläre Hirnschädigung nach neonataler Hypoxie-Ischämie..... | 46 |
| 3.3.1 | Die Auswirkung der regulatorischen T-Zell-Depletion auf HI-induzierte neuropathologische Veränderungen ist geschlechtsabhängig..... | 46 |
| 3.3.2 | Eine Treg-Depletion hat eine gegenteilige Wirkung auf den HI-induzierten neuronalen Zellverlust in Männchen und Weibchen | 47 |
| 3.4 | Auswirkungen einer Treg-Depletion auf HI-induzierte neuroinflammatorische Reaktionen und vaskuläre Schädigung | 50 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.4.1 | Eine Treg-Depletion erhöht die Mikrogliaaktivierung im weiblichen Geschlecht und führt zu einer geschlechtsunabhängigen verstärkten Astrogliose | 51 |
| 3.4.2 | Die Wirkung einer Treg-Depletion auf die Gefäßintegrität ist geschlechtsabhängig | 52 |
| 3.5 | Vergleich zirkulierender Hormonlevel und der suppressiven Funktion regulatorischer T-Zellen in männlichen und weiblichen neonatalen Mäusen | 54 |
| 3.5.1 | Die Serumkonzentration des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol unterscheidet sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Jungtieren | 54 |
| 3.5.2 | Weibliche regulatorische T-Zellen besitzen eine stärkere suppressive Aktivität als männliche Tregs | 54 |
| 4 | DISKUSSION | 56 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 65 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 66 |
| 7 | ANHANG | 74 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 74 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis | 75 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis | 76 |
| 8 | DANKSAGUNG | 77 |
| 9 | LEBENS LAUF | 78 |

1 EINLEITUNG

Die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) des reifen Neugeborenen ist eine Hirnschädigung, die aus einer unzureichenden Versorgung des Hirngewebes mit Sauerstoff (Hypoxie) und Blut (Ischämie) im Rahmen einer perinatalen Asphyxie entstehen kann (A. Hill & Volpe, 1989; Volpe, 1976). Die perinatale Asphyxie beschreibt einen Sauerstoffmangel im Blut bei gleichzeitiger Hyperkapnie und Azidose in Folge eines unzureichenden Gasaustausches und stellt mit einem Anteil von etwa 25% eine der häufigsten Todesursachen in der Neonatalperiode dar (Lawn et al., 2005; World Health Organization, 2018). Ein asphyktischer Zustand kann vor, während oder kurz nach der Geburt auftreten. Beispielsweise können eine Plazentainsuffizienz oder eine Verlegung der kindlichen Atemwege durch Mekonium oder Fruchtwasser mögliche Ursachen sein (Finer et al., 1981; A. Hill & Volpe, 1989). In Folge des Sauerstoffmangels kann es zu verschiedenen Organfunktionsstörungen kommen. Insbesondere das neonatale Gehirn reagiert vulnerabel auf eine Hypoxie, so dass eine anhaltende Asphyxie in einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie resultieren kann (A. Hill & Volpe, 1989). Mit einer Inzidenz von etwa drei von 1000 Neugeborenen pro Jahr ist die HIE ein häufiger Grund für Morbidität und Mortalität bei Neugeborenen (Eunson, 2015; Kurinczuk et al., 2010). Bei überlebenden Betroffenen kommt es im Verlauf häufig zu schweren permanenten neurologischen Defiziten, die sich unter anderem durch kognitive und psychosoziale Entwicklungsverzögerung, spastische Paresen oder Epilepsien äußern können (de Vries & Jongmans, 2010; Finer et al., 1981). Klinische und experimentelle Erhebungen weisen zunehmend darauf hin, dass das männliche Geschlecht dabei einen wesentlichen Risikofaktor darstellt (C. A. Hill & Fitch, 2012). Neben einer höheren Inzidenz von pränataler Anoxie, ist das männliche Geschlecht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von neurologischen Langzeitdefiziten assoziiert (Golomb et al., 2009; Murden et al., 2019). Experimentelle Studien stützen diese Beobachtungen. In mehreren Arbeiten wurde eine stärkere histologische Schadensausprägung und eine schlechtere neurologische Entwicklung nach Hypoxie-Ischämie (HI) in männlichen Jungtieren festgestellt (Charriaut-Marlangue et al., 2017).

Die bisher einzig zugelassene und nachweislich neuroprotektive Therapiemöglichkeit bei HIE ist die Hypothermie des Neugeborenen, bei der Betroffene für 72 Stunden auf eine systemische Temperatur von 33-34 °C gekühlt werden (Jacobs et al., 2013; Shankaran et al., 2005). Die Hypothermie ist durch ein kurzes therapeutisches Zeitfenster von sechs Stunden limitiert (Wassink et al., 2014). Zudem müssen sieben bis acht Kinder behandelt werden, damit ein betroffenes Kind von der Hypothermie profitiert (Azzopardi et al., 2014;

Jacobs et al., 2013). Präklinische Studien deuten darüber hinaus darauf hin, dass Männchen und Weibchen unterschiedlich auf Hypothermie ansprechen. Eine Meta-Analyse zur Hypothermie im meist verwendeten Tiermodell der HIE, dem Rice-Vannucci-Modell, zeigte, dass männliche Tiere deutlich weniger von der Therapie profitieren als weibliche. Als Ursache werden unterschiedliche Pathomechanismen im männlichen und weiblichen Geschlecht diskutiert (Wood et al., 2020). Auch in Bezug auf alternative Behandlungsschemata, die derzeit noch Gegenstand der Forschung sind, scheint das Geschlecht Einfluss auf den Therapieerfolg zu haben: Beispielsweise bewirkte eine Kombination der Hypothermie-Behandlung mit dem pharmakologischen Adjuvans Allopurinol in weiblichen Tieren eine Steigerung des neuroprotektiven Therapieeffektes, wohingegen bei Männchen kein Effekt nachweisbar war (Rodriguez-Fanjul et al., 2017). Auf Grund der bisher eingeschränkten Therapiemöglichkeiten und der hohen Relevanz der Erkrankung ist es wichtig, neue alternative Behandlungsansätze zu finden. Dies setzt jedoch ein tiefgreifendes Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen der HIE, insbesondere auch in Hinblick auf Geschlechtsunterschiede, voraus.

Im Rahmen einer schweren Asphyxie führt der Sauerstoffmangel auf Grund peripherer Vasokonstriktion zunächst zu einem Anstieg des systemischen Blutdruckes mit Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses. Bei Anhalten der Asphyxie kommt es jedoch im Verlauf zu einer Hypotonie und konsekutiv zu einer Ischämie des Gehirns und HIE-typischer Schadensausbildung (Gunn & Thoresen, 2019; Perlman, 2007). Während der akuten Phase der Hypoxie-Ischämie führt der Sauerstoffmangel im Gehirn über Versagen des physiologischen aeroben Stoffwechsels und raschen Verbrauch energiereicher Phosphatverbindungen zu einem primären Energieversagen, das eine Kaskade verschiedener pathophysiologischer Mechanismen auslöst (Azzopardi et al., 1989; Rocha-Ferreira & Hristova, 2016). Unter anderem verursachen metabolische Azidose, zytotoxische Zellschwellung, Exzitotoxizität und oxidativer Stress einen primären Zelluntergang sowie die Degradation der Blut-Hirn-Schranke (Fatemi et al., 2009; Kumar et al., 2008; Leonardo & Pennypacker, 2009). Nach der akuten Sauerstoffunterversorgung kommt es durch Reperfusion und Reoxygenierung des Gewebes während der Latenzphase zu einer Normalisierung des Energiehaushaltes und vorübergehender Regeneration des Gewebes (Gunn & Bennet, 2009; Hagberg et al., 2016). Die darauffolgende Phase des sekundären Energieversagen mit erneutem Zelluntergang ist insbesondere durch eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion gekennzeichnet, die noch Wochen bis Monate nach dem Insult anhalten kann (Fleiss & Gressens, 2012; Winerdal et al., 2012). Ein wesentlicher Faktor, der das Verständnis der genauen Pathophysiologie und dementsprechend die Entwicklung neuer Therapieansätze er-

schwert, ist das Geschlecht. In diesem Zusammenhang wurden Unterschiede in Zelltodmechanismen und der Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress in präklinischen Studien beobachtet (C. A. Hill & Fitch, 2012; Murden et al., 2019). Neben Unterschieden in akuten Schädigungsmechanismen werden jedoch auch zunehmend geschlechtsabhängige Unterschiede in der neuroinflammatorischen Reaktion infolge der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung diskutiert (Charriaut-Marlangue et al., 2017).

Inflammation ist ein wesentlicher Bestandteil der HIE-Pathophysiologie, wobei dabei sowohl lokale Entzündungsreaktionen als auch die Infiltration peripherer Immunzellen eine Rolle spielen. Nach einer initial vor allem pro-inflammatorischen Phase werden im Verlauf vermehrt anti-inflammatorische und pro-regenerative Prozesse initiiert (Rocha-Ferreira & Hristova, 2016). Durch neuronalen Zelluntergang werden zunächst residente Astrozyten und Mikrogliazellen über die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren aktiviert, um intaktes Gewebe durch Ausbildung einer gliösen Narbe und Phagozytose von geschädigtem Gewebe zu schützen (Hagberg et al., 2015; Silver & Miller, 2004). Gleichzeitig tragen Mikro- und Astroglia jedoch auch unter anderem über die Produktion pro-inflammatorischer neurotoxischer Mediatoren wie z.B. pro-inflammatorischer Zytokine zu einer Exazerbation des Zelluntergangs und endothelialer Aktivierung mit Degradation der Blut-Hirn-Schranke bei (Lai et al., 2017; Liu & McCullough, 2013). Zusätzlich zur Aktivierung von Astro- und Mikroglia kommt es zu einer Stimulation des peripheren Immunsystems, die in Kombination mit der HI-induzierten endothelialen Schädigung in einer mitunter langanhaltenden Infiltration von Leukozyten in das geschädigte Gehirn resultiert (Bona et al., 1999; Shrivastava et al., 2012; Winerdal et al., 2012). Neben der Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen und Granulozyten) akkumuliert auch eine nicht unerhebliche Anzahl von Lymphozyten im Gehirn (Winerdal et al., 2012). Die Migration der Zellen wird einerseits über die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, die mit einer Zerstörung der Integrität der Basalmembranen assoziiert ist, begünstigt (Alvarez-Diaz et al., 2007). Andererseits aktivieren pro-inflammatorische Zytokine endotheliale Zellen, wodurch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) stimuliert wird. Die Interaktion der Adhäsionsmoleküle mit leukozytären Liganden wie *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) oder *very late antigen 1* (VLA-1) ermöglicht so eine weitere Infiltration von Immunzellen (Lai et al., 2017; Liu & McCullough, 2013).

Über die funktionelle Rolle infiltrierender peripherer Immunzellen in der Ausprägung der neonatalen HI-induzierten Hirnschädigung ist bislang wenig bekannt. Eine operative Entfernung der Milz, dem größten Reservoir an peripheren Immunzellen, drei Tage vor Induktion der HI in sieben Tage alten Ratten resultierte in signifikant reduzierten Infarkt-Volumina

72 Stunden nach dem Insult und einer verbesserten neurologischen Funktion nach drei Wochen (Fathali et al., 2013). Diese Ergebnisse deuten auf einen neurodegenerativen Einfluss peripherer Immunzellen nach HI hin, wobei in diesem Experimentalansatz nicht zwischen verschiedenen Immunzellsubtypen differenziert werden kann. Spezifischere Untersuchungen mit Fokus auf Lymphozyten zeigten, dass fünf Tage alte Rag1 (*Recombination activating gene 1*)^{-/-}-Mäuse ohne funktionsfähige T- und B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen signifikant reduzierten Gewebeschaden sieben Tage nach HI aufweisen (Nazmi et al., 2018). Im Gegensatz dazu bewirkte die spezifische Depletion von T-Lymphozyten über die Gabe eines depletierenden Antikörpers in neun Tage alten Mäusen eine verstärkte Schadensausprägung und erhöhte Infarkt volumina eine Woche nach HI, was auf eine neuroprotektive Wirkung von T-Zellen hinweist (Herz et al., 2018a). Albertsson et al. haben speziell $\gamma\delta$ -T-Zellen in fünf Tage alten Mäusen untersucht und zeigten, dass eine Depletion dieser Zellen in der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung neuroprotektiv wirkt (Albertsson et al., 2018). Diese Arbeiten verdeutlichen, dass Lymphozyten, und vor allem T-Zellen, eine wichtige Rolle in der HI-Pathophysiologie spielen, wenngleich zum Teil diskrepante Studienergebnisse vorliegen. Zudem ist die funktionelle Relevanz potenziell protektiver T-Zellsubtypen, wie zum Beispiel regulatorischer T-Zellen, in der neonatalen Hirnschädigung bislang nicht untersucht. Demgegenüber steht eine Vielzahl klinischer und experimenteller Untersuchungen in der adulten ischämischen Hirnschädigung (Chamorro et al., 2012). Wenngleich aufgrund ähnlicher pathophysiologischer Charakteristika Erkenntnisse aus der adulten Schlaganfallforschung Hinweise auf mögliche Mechanismen und den Einfluss einzelner Immunzellen im Neugeborenen liefern könnten, so bleibt zu berücksichtigen, dass sich sowohl das Nerven- als auch das Immunsystem beim Neugeborenen noch in der Entwicklung befindet (Vexler & Yenari, 2009). Hinzu kommt, dass in der adulten Schlaganfallforschung aufgrund des neuroprotektiven Geschlechtshormons Estradiol vornehmlich männliche Tiere verwendet werden, sodass bislang keine Aussagen zu möglichen geschlechtsspezifischen Unterschieden hinsichtlich der Rolle peripherer Immunzellen in der ischämischen Hirnschädigung gemacht werden können.

Trotz zunehmender klinischer Evidenz für Geschlechtsunterschiede nach neonataler Hirnschädigung wurde dieser Aspekt hinsichtlich neuroinflammatorischer Reaktionen bislang nur selten stratifiziert untersucht (Charriaut-Marlangue et al., 2017). Lediglich zwei Studien widmeten sich diesem Thema, hier jedoch mit starkem Fokus auf myeloide Zellen. Bezüglich der Aktivierung residenter Immunzellen nach HI wurde gezeigt, dass männliche Jungtiere eine signifikant erhöhte Anzahl an Mikroglia im Vergleich zu weiblichen Jungtieren aufweisen (Mirza et al., 2015; Villapol et al., 2019). Die beobachtete stärkere inflammatorische Reaktion auf HI in Männchen zeigte sich auch in einer erhöhten Konzentration von

pro-inflammatorischen Zytokinen im Serum männlicher Jungtiere (Mirza et al., 2015). Zudem haben Smith et al. gezeigt, dass eine Depletion myeloider Zellen in männlichen Jungtieren in einer Verbesserung der Gehirnschädigung resultierte, während bei weiblichen Jungtieren kein Effekt zu beobachten war (Smith et al., 2018). Diese Studien deuten darauf hin, dass HI im männlichen Geschlecht mit einer stärkeren Neuroinflammation assoziiert ist, was eine mögliche Ursache für die stärkere Schadensausprägung darstellen könnte (Charriaut-Marlangue et al., 2017). Bislang gibt es jedoch keine Erkenntnisse zu einer geschlechtsabhängigen Rolle spezifischer Lymphozytenpopulationen, wie z.B. einzelner Gruppen von T-Lymphozyten.

Eine vielversprechende Gruppe von T-Lymphozyten, die auf Grund ihrer typischen Charakteristika eine potenzielle Relevanz für die HI-Pathophysiologie vermuten lässt, sind regulatorische T-Zellen (Tregs). Tregs, die etwa 10% der CD4⁺-T-Lymphozyten ausmachen, regulieren die körpereigene Selbsttoleranz und inhibieren überschießende Immunantworten (Sakaguchi et al., 1995). Ein wesentlicher Oberflächenmarker regulatorischer T-Zellen ist *Cluster of differentiation 25* (CD25), der Rezeptor für Interleukin-2 (IL-2) (Sakaguchi et al., 1995). Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Tregs ist die Expression des x-chromosomalen Transkriptionsfaktors *forkhead box protein 3* (Foxp3) (Hori et al., 2003), der für die Bildung und die immunmodulatorische Funktion der Zellen essenziell ist (Fontenot et al., 2003). Die Bedeutsamkeit von Foxp3 zeigt sich im *Scurfy*-Mausmodell, in dem eine Mutation im Foxp3-Gen in einem Mangel an Tregs und der Ausbildung einer schweren lymphoproliferativen Störung resultiert (Brunkow et al., 2001). Ein wesentlicher Wirkmechanismus regulatorischer T-Zellen ist die Suppression anderer Immunzellen, zum Beispiel über die Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-10 (IL-10) oder *transforming growth factor beta* (TGF- β) (Nakamura et al., 2001; Rubtsov et al., 2008; Xie et al., 2015). Alternativ können regulatorische T-Zellen über die Produktion zytolytisch wirksamer Proteine oder durch die Konkurrenz um essenzielle Wachstumsfaktoren wie Interleukin-2 die Apoptose ihrer Zielzellen induzieren (Grossman et al., 2004; Pandiyan et al., 2007). Zudem kann eine Suppression auch über direkten Zell-Zell-Kontakt erfolgen, z.B. durch Bindung des *cytotoxic t lymphocyte associated antigen 4* (CTLA 4) Rezeptors auf Tregs an die ko-stimulierenden Moleküle CD80 und CD86, die unter anderem auf Antigen-präsentierenden Zellen und Mikroglia exprimiert werden (Wing et al., 2008). Neben der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und Inhibition überschießender Immunreaktionen in peripheren immunologischen Erkrankungen wurde auch in unterschiedlichen neurologischen Krankheitsbildern ein wesentlicher Einfluss der Tregs beschrieben (He & Balling, 2013). Beispielsweise wurde in einer klinischen Studie nachgewiesen, dass die Anzahl an Tregs

positiv mit der Genesung nach schwerem Schädelhirntrauma korreliert, was auf eine neuroprotektive Wirkung von Tregs hinweist (M. Li et al., 2015). Im Tiermodell zum Schädel-Hirn-Trauma wurde unter anderem die Inhibition reaktiver Astroglie und Suppression der Infiltration von T-Zellen durch Tregs als ein möglicher Mechanismus identifiziert (Kramer et al., 2019). Auch für neurodegenerative Erkrankungen wie beispielweise die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) gibt es Hinweise auf eine neuroprotektive Rolle regulatorischer T-Zellen (He & Balling, 2013). So wurde in ALS-Patienten eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Tregs und dem Krankheitsverlauf dokumentiert (Henkel et al., 2013). Analysen im ALS-Tiermodell deuten darauf hin, dass Tregs ihre neuroprotektive Rolle unter anderem über Inhibierung der Mikroglia-Aktivierung vermitteln (Zhao et al., 2012).

Hinsichtlich der Rolle der Tregs in der ischämischen Hirnschädigung stammen sämtliche Erkenntnisse bislang aus adulten Schlaganfallmodellen. Liesz et al. wiesen zunächst einen neuroprotektiven Effekt der Tregs nach (Liesz et al., 2009). So führte die Depletion der Tregs mittels Injektion eines anti-CD25-Antikörpers zu signifikant erhöhten Infarkt volumina im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren wurde eine vermehrte Infiltration von T-Zellen und Aktivierung von Mikroglia-Zellen mit einem Anstieg von TNF- α und IL-1 β als Folge der Depletion festgestellt. Als möglicher Effektormechanismus der Tregs wurde die Sekretion von IL-10 identifiziert (Liesz et al., 2009). Die neuroprotektive Rolle von Tregs wurde in einer weiteren Arbeit durch adoptiven Zell-Transfer, der zu einer verminderten zerebralen und peripheren Inflammation sowie Reduktion des Schadens führte, bestätigt (P. Li et al., 2013). In einer aktuelleren Arbeit wurde zudem eine neuroprotektive Wirksamkeit von Tregs in der chronischen Phase nach HI belegt. Die Depletion von Tregs 14 Tage nach Ischämie resultierte in einer stärkeren Ausprägung neurologischer Defizite, wobei Tregs offenbar durch die Produktion von Amphiregulin die reaktive, neurotoxische Astroglie nach Ischämie inhibieren (Ito et al., 2019). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten haben Kleinschnitz et al. einen schädigenden Einfluss regulatorischer T-Zellen festgestellt (Kleinschnitz et al., 2013). Um die Rolle von Tregs zu analysieren, wurde hier das DREG (*depletion of regulatory t cells*)-Mausmodell verwendet, das eine selektive Depletion von Foxp3⁺-T-Zellen ermöglicht (Lahl et al., 2007). In Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen zeigten Mäuse bereits 24 Stunden nach Ischämie deutlich geringere Infarktausmaße im Vergleich zu Kontrolltieren. Als Wirkmechanismus wurde eine Interaktion zwischen Tregs und Endothelzellen diskutiert, die eine Thrombusformation begünstigt, was einerseits die postischämische Reperfusion behindert und andererseits eine mikrovaskuläre Dysfunktion bewirkt (Kleinschnitz et al., 2013). Diese Beobachtung konnte in der Arbeit von Schuhmann et al. bestätigt werden, in

der eine anti-CD28-Antikörper vermittelte Treg-Expansion ebenfalls in einer stärker ausgeprägten Thrombusbildung resultierte (Schuhmann et al., 2015). Die Interaktion zwischen Immunzellen, Endothelzellen und Thrombozyten wird als Thromboinflammation bezeichnet und zunehmend als ein wesentlicher Schadensmechanismus im Schlaganfall diskutiert (De Meyer et al., 2016; Stoll & Nieswandt, 2019). Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien haben Ren et al. weder einen neuroprotektiven noch einen neurodegenerativen Einfluss von Tregs im adulten Modell festgestellt (Ren et al., 2011). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte Tregs im adulten Schlaganfall somit keine eindeutige Rolle zugeschrieben werden (Liesz & Kleinschnitz, 2016). Darüber hinaus ist unbekannt, inwiefern die Funktion der Tregs sich zwischen den Geschlechtern nach ischämischer Hirnschädigung unterscheidet. Dabei könnte das Geschlecht insbesondere in Hinblick auf Tregs relevant sein, da sich der Genlocus für den essenziellen Transkriptionsfaktor Foxp3 auf dem X-Chromosom befindet, was in einer unterschiedlichen Funktionalität der Zellen resultieren könnte. Dies zeigte sich zum Beispiel im Modell der pulmonalen Hypertonie, die in Abwesenheit von Tregs in weiblichen Tieren deutlich schwerer ausgefallen war als in männlichen Tieren (Tamosiuniene et al., 2018).

Vor dem Hintergrund aktueller Hinweise auf eine potenziell neuroprotektive Funktion von regulatorischen T-Zellen in neuroinflammatorischen Krankheitsmodellen und auf Grund der bislang mangelnden Kenntnis über die Beteiligung dieser Zellen in der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung war Ziel der vorliegenden Arbeit, die Infiltration regulatorischer T-Zellen in das geschädigte Gehirn und ihre funktionelle Relevanz in der HI-induzierten Gewebeschädigung zu untersuchen. Da das Geschlecht zunehmend als Einflussfaktor für neuroinflammatorische Mechanismen nach HI diskutiert wird, lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Jungtieren. Für diese Analysen wurde das DEREK-Mausmodell verwendet, das einerseits die spezifische Detektion der Foxp3⁺-Tregs im Gewebe und andererseits eine spezifische Depletion dieser Zellen ermöglicht. Neben einer detaillierten Charakterisierung der Treg-Infiltration in das geschädigte Gewebe in Abhängigkeit von Zeit und Lokalisation der Einwanderung wurde der Einfluss von Tregs auf die histologische Schadensausprägung über Depletion der Zellen analysiert. Um potenziell zugrundeliegende Effektormechanismen der Tregs zu identifizieren, wurde darüber hinaus die HI-induzierte Mikro- und Astroglia-Aktivierung und Gefäßschädigung nach Treg-Depletion untersucht. Die Funktionalität der Tregs wurde *ex vivo* in Suppressionsassays analysiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

Sämtliche verwendete Materialien mit Herstellerangaben sowie Puffer- und Medienzusammensetzung sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet. Im Text ist darauf entsprechend verwiesen.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 2-1 Chemikalien

| Substanz | Firma |
|---|----------------------------|
| Aceton | Otto Fischar |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | Sigma-Aldrich |
| AutoMACS Pro Washing Solution | Miltenyi Biotec |
| AutoMACS Running Buffer | Miltenyi Biotec |
| <i>Bovine serum albumin Fraction V</i> (BSA) | Roth |
| Buprenorphin | Indivior |
| Chloralhydrat | Sigma-Aldrich |
| Chlorwasserstoff (HCl) | Sigma-Aldrich |
| Kresylviolett | Sigma-Aldrich |
| Dako Fluorescent Mounting Medium | DAKO |
| <i>4'6-Diamidin-2-phenylindol</i> (Dapi) | Invitrogen |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | AppliChem |
| Diphtherietoxin | Merck |
| <i>Donkey serum</i> (DS) | Sigma-Aldrich |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich |
| Entellan | Merck |
| Eosin | Merck |
| Ethanol | VWR International |
| <i>Fetal calf serum</i> (FCS) | PAA Laboratories |
| <i>Cold fish skin gelatine</i> (FSG) | Sigma-Aldrich |
| Hämatoxylin | Merck |
| Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure HEPES | Gibco by life technologies |
| IMDM + GlutaMAX™ + 25mM HEPES | Gibco by life technologies |
| Isofluran | Abbvie |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) | Sigma-Aldrich |

| | |
|---|----------------------------|
| Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Sigma-Aldrich |
| Kresylviolett-Acetat | Sigma-Aldrich |
| Methanol | AppliChem |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck |
| <i>Normal goat serum</i> (NGS) | Sigma-Aldrich |
| <i>Optimum cutting temperature</i> Klebstoff (OCT) | Tissue-Tek |
| Penicillin und Streptomycin | Gibco Thermo Fisher |
| Percoll | Sigma-Aldrich |
| <i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) | PAN Biotec |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich |
| RPMI1640-Medium | Gibco |
| Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl) | AppliChem |
| Triton-X-100 | Sigma-Aldrich |
| Truecount-Beads | BD Bioscience |
| Tween20 | SERVA Electrophoresis |
| U/MINI 1640 | Gibco by life technologies |
| Xylol | AppliChem |

Tabelle 2-2 Lösungen und Puffer

| Lösung, Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------------|--|
| 4% PFA | 40 g PFA, 5-10 NaOH Tabletten in 1 L 1x PBS (pH 7,4) |
| FACS-Puffer | 20 ml FCS, 4 ml EDTA (0,5 M) in 1 L 1x PBS |
| IHC-Blocklösung I | 5% NGS in 0,2% Tween 20 in PBS |
| IHC-Blocklösung II | 1% BSA, 0,3% FSG in 0,2% Tween20 PBS |
| Lysepuffer | 155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ und 2 mM EDTA in 1 L H ₂ O (pH 7,2-7,4) |
| PBS | 80 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ in 1 L H ₂ O (pH 7,4) |
| PBS-DAPI | 1 µg Dapi/ml PBS |
| TBS | 0,01 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl in 1 L 1x PBS (pH 7,4) |
| Zitratpuffer | 10 mM Tri-Natrium-Zitrat 0,05% Tween20 ad 1 L Aqua dest. pH 6,0 |

Tabelle 2-3 Medien

| Medien | Zusammensetzung |
|---------------|--|
| IMDMc-Medium | IMDM + GlutaMAX™ + 25 mM HEPES + 10% FCS + 1% Penicillin / Streptavidin + 25µM 2-Mercaptoethanol |
| Waschmedium | 1 M HEPES in RPMI 1640 Medium |

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Immunhistochemie

Tabelle 2-4 Primäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Firma |
|-----------------------------|------------|-------------------|
| Kaninchen-anti-Maus GFP | 1:1000 | Abcam |
| Ratte-anti-Maus CD45 | 1:100 | BD Biosciences |
| Maus-anti-Maus NeuN | 1:500 | Milipore |
| Kaninchen-anti-Maus NeuN | 1:500 | Milipore |
| Kaninchen-anti-Maus Olig2 | 1:100 | Milipore |
| Kaninchen-anti-Maus Iba1 | 1:500 | Wako |
| Ratte-anti-Maus GFAP | 1:500 | Invitrogen |
| Ratte-anti-Maus CD31 | 1:200 | BD Biosciences |
| Kaninchen-anti-Maus Laminin | 1:250 | Novus Biologicals |

Tabelle 2-5 Sekundäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Firma | Konjugat |
|----------------------|------------|-------------------|-----------------|
| Ziege-anti-Kaninchen | 1:500 | Thermo Scientific | Alexa Fluor 488 |
| Ziege-anti-Ratte | 1:500 | Thermo Scientific | Alexa Fluor 488 |
| Ziege-anti-Ratte | 1:500 | Thermo Scientific | Alexa Fluor 555 |
| Ziege-anti-Maus | 1:500 | Thermo Scientific | Alexa Fluor 555 |
| Ziege-anti-Kaninchen | 1:500 | Thermo Scientific | Alexa Fluor 594 |

2.1.2.2 Durchflusszytometrische Analysen

Tabelle 2-6 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen zur Ermittlung der Depletionseffizienz

| Antigen | Fluorchrom | Verdünnung | Firma |
|-----------------------|--------------|------------|----------------|
| Ratte-anti-Maus CD45 | Pacific Blue | 1:2000 | BioLegend |
| Ratte-anti-Maus CD3 | PerCP | 1:100 | BD Biosciences |
| Ratte-anti-Maus CD4 | PE-Cy7 | 1:400 | BD Biosciences |
| Ratte-anti-Maus Foxp3 | PE | 1:100 | eBioscience |
| FvD | APC-Cy7 | 1:3000 | eBioscience |

2.1.2.3 Suppressionsassays

Tabelle 2-7 Antikörper für die Zellsortierung mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

| Antigen | Fluorchrom | Verdünnung | Firma |
|---------------------|--------------|------------|----------------|
| Ratte-anti-Maus CD4 | Pacific Blue | 1:1000 | BD Biosciences |

| | | | |
|---------------------|-----|-------|----------------|
| Ratte-anti-Maus CD8 | APC | 1:800 | BD Biosciences |
|---------------------|-----|-------|----------------|

Tabelle 2-8 Antikörper und Farbstoffe für Isolation, Färbung und Stimulation von Responderzellen

| Antigen | Fluorchrom | Verdünnung | Firma |
|-----------------------------|------------|------------|----------------|
| Ratte-anti-Maus CD25 | Biotin | 1:100 | BD Biosciences |
| Zell-Proliferations-Färbung | eFluor 670 | 1:1000 | eBioscience |
| Hamster-anti-Maus CD3 | | 1:1000 | BD Biosciences |

Tabelle 2-9 Antikörper zur Messung der Proliferation von Responderzellen

| Antigen | Fluorchrom | Verdünnung | Firma |
|------------------------|--------------|------------|----------------|
| Ratte-anti-Maus CD4 | Pacific Blue | 1:800 | BD Biosciences |
| Ratte-anti-Maus CD45.1 | PE | 1:400 | BD Biosciences |

2.1.3 Kits

Tabelle 2-10 Kits

| Kit | Firma |
|--|-----------------|
| <i>CD4⁺-T-cell-Isolation-Kit Maus</i> | Miltenyi Biotec |
| <i>Foxp3 intracellular staining kit</i> | eBioscience |
| Parameter™ Estradiol Assay Kit | R&D Systems |

2.1.4 Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-11 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

| Gerät, Software, Verbrauchsmaterialien | Firma |
|---|------------------------------|
| Auto MACS pro | Miltenyi Biotec |
| AxioCam ICc1 Kamera | Zeiss |
| Axioplan Durchlicht- & Fluoreszenzmikroskop | Zeiss |
| Brutschrank HERAccl 150, Heraeus | Thermo Fisher Scientific Inc |
| Deckgläser | Engelbrecht GmbH |
| Digitalthermometer TH-5 | Physitemp Instruments |
| EDTA-beschichtete Sammelröhrchen | Greiner Bio One |
| Elektrokoagulator 1200 °C | Bovie Medical Corporation |
| FACS Aria II | BD Biosciences |
| FACS DIVA Software | BD Biosciences |
| FACS LSR II | BD Biosciences |
| FACS-Röhrchen | BD Biosciences |
| Feedback-kontrollierte Wärmematte | Harvard Apparatus |

| | |
|--|-----------------------------------|
| Fluoreszenzlampe Colibri 2 | Zeiss |
| Gewebescanner OpticLab H850 | Plustec Technology |
| Gewebescanner Software SilverFast | Lasersoft Imaging |
| GraphPad Prism Software 6.0 | GraphPad Software |
| ImageJ Software | NIH |
| Kleintiernarkosegerät | Dräger AG & Co. KGaA |
| Konfokales Mikroskop A1 plus, Eclipse Ti | Nikon GmbH |
| Konfokales Mikroskop Software NIS | Nikon GmbH |
| Kryostat Mikrotom HM525 | Thermo Scientific |
| Magnetrührer RCT-basic | IKA-Labortechnik |
| Mikrotom HM 430 | Thermo Scientific |
| Multipipette | Eppendorf AG |
| Neubauer Zählkammer | Carl Roth GmbH |
| Objektträger | Engelbrecht |
| Petrischalen | Falcon |
| pH Meter pH 526 | WTV GmbH |
| Pipetus | Hirschmann Laborgeräte |
| Plattformschüttler, rotierend, Unimax 1010 | Heidolph Instruments Labortechnik |
| Präparationsbesteck | Fine Science Tools GmbH |
| Reaktionsgefäße bis 2 ml | Sarsted AG |
| Reaktionsgefäße safe-lock | Eppendorf Ag |
| Sauerstoffkammer (OxyCycler) | BioSpherix |
| Stereomikroskop SZ61 | Olympus K.K. |
| Sterilbank HeraSafe | Thermo Fisher Scientific Inc |
| Superfrost Plus Objektträger | R. Langenbrinck |
| Waage PCB | Kern & Sohn GmbH |
| Zellsiebe | BD Biosciences |
| Zentrifugen | Eppendorf AG |
| 15ml Reaktionsgefäße | Sigma-Aldrich |
| 50ml Reaktionsgefäße | Sigma-Aldrich |
| 37 °C Inkubator Heraeus | Thermo Fisher Scientific Inc |
| 96-Well Platten | Sigma-Aldrich |

2.2 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden gemäß den ARRIVE-Richtlinien und den Richtlinien der „National Institutes of Health“ (NIH) für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt. Die behördliche Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen.

2.2.1 DEREK-Mausstamm

Für sämtliche Experimentalansätze wurde der *depletion of regulatory t cell* (DEREG)-Mausstamm verwendet (Lahl et al., 2007). Diese Mauslinie wurde freundlicherweise von Frau Prof. W. Hansen (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Zur Generierung dieser transgenen Maus wurde ein neues Gen in den *forkhead box protein*-Genlocus (Foxp3) eingebracht. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 stimuliert die Expression von Proteinen, die für die Bildung und Funktion regulatorischer T-Zellen essenziell sind (Hori et al., 2003). Das implantierte Gen kodiert für ein Fusions-Protein aus dem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und dem grün fluoreszierenden Protein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Diese Modifikation ermöglicht die selektive Depletion regulatorischer T-Zellen über die Injektion von Diphtherietoxin (DTX), ohne dass die Bildung anderer CD25⁺-Zellen beeinflusst wird (Lahl et al., 2007). Zusätzlich ermöglicht die eGFP-Expression die immunhistochemische Detektion der Tregs im Gewebe.

2.2.2 Hypoxie-Ischämie Modell

Zur experimentellen Simulation der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung beim Neugeborenen werden verschiedene etablierte Tiermodelle verwendet. Für die Untersuchung der grundsätzlichen Pathophysiologie eignen sich insbesondere Versuche mit Nagetieren, wobei das Rice-Vannucci-Modell am häufigsten verwendet wird. Zur Modellierung der HIE an neugeborenen Ratten oder Mäusen erfolgt zunächst eine unilaterale Ligatur der *Arteria carotis communis* (ACC) mit anschließender systemischer Hypoxie, wobei Zeitpunkt des Eingriffes sowie Dauer der Hypoxie abhängig von der Fragestellung variieren können (Rice et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde ein von der Arbeitsgruppe an neun Tage alte Mäuse adaptiertes HI-Modell verwendet (Reinboth et al., 2016). Neun Tage alte Mäuse entsprechen hinsichtlich der Gehirnentwicklung weitestgehend der Entwicklung eines menschlichen reifen Neugeborenen (Semple et al., 2013). Der operative Eingriff wurde von PD Dr. Josephine Herz durchgeführt. Es wurden weibliche und männliche Tiere verwendet, die Aufteilung der Versuchstiere erfolgte randomisiert. Zunächst wurden Mäuse mit inhalativem Isofluran (erst 4%, dann 1,5%) narkotisiert und unter einem Mikroskop platziert. Es

folgte eine Hautinzision am Hals, um die rechte ACC freizupräparieren und mittels Elektrokoagulation irreversibel zu verschließen. Perioperativ erfolgte eine Analgesie über subkutane Verabreichung von 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Tabelle 2-1). Nach dem Verschluss der Wunde und Beendigung des operativen Eingriffes wurden die Mäuse für eine Stunde zu ihren Müttern zurückgegeben und anschließend einer einstündigen systemischen Hypoxie bei 10% Sauerstoff in einer luftdicht verschlossenen Kammer (Oxycycler, Tabelle 2-11) ausgesetzt. Die physiologische Körpertemperatur der Mäuse wurde über eine Wärmematte aufrechterhalten. Scheinoperierte Kontrolltiere erhielten lediglich eine Narkose und eine Hautinzision mit Freipräparation der ACC ohne Verschluss und ohne folgende Hypoxie. Während der Hypoxie-Zeit der HI-Tiere verblieben scheinoperierte Tiere bei ihren Muttertieren.

2.2.3 Experimentelles Design

Zur Charakterisierung der Infiltration regulatorischer T-Zellen in das hypoxisch-ischämische Gehirn wurden neun Tage (postnataler Tag 9, P9) alte DEREK-Mäuse einer HI-Behandlung ausgesetzt (Abbildung 2-1 A). Am ersten (d1, P10), dritten (d3, P12) und siebten Tag (d7, P16) nach HI wurden die Gehirne entnommen und Kryostatschnitte erstellt. Die Verwendung der DEREK-Mauslinie ermöglichte anhand der Treg-spezifischen eGFP-Expression eine immunhistochemische Detektion von regulatorischen T-Zellen durch eine gegen eGFP-gerichtete Antikörperfärbung. Diese wurde jeweils mit einer Färbung gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 und den neuronalen Marker NeuN (*neuronal nuclei*) kombiniert, um die Einwanderung der Tregs im Verhältnis zur Einwanderung aller Leukozyten und im Verhältnis zur lokalen neuronalen Schädigung zu beurteilen. Zusätzlich wurde mittels Kresylviolett-Färbung der prozentuale Gewebeverlust bzw. die Ödembildung der geschädigten Seite ermittelt. Inwiefern sich die suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen zwischen neonatalen männlichen und weiblichen Jungtieren unterscheidet, wurde 24 Stunden nach HI analysiert. Dazu wurden Milzen und Thymi entnommen, regulatorische T-Zellen mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) isoliert und anschließend die suppressive Aktivität der Tregs auf die Effektor-T-Zellproliferation durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 2-1 A).

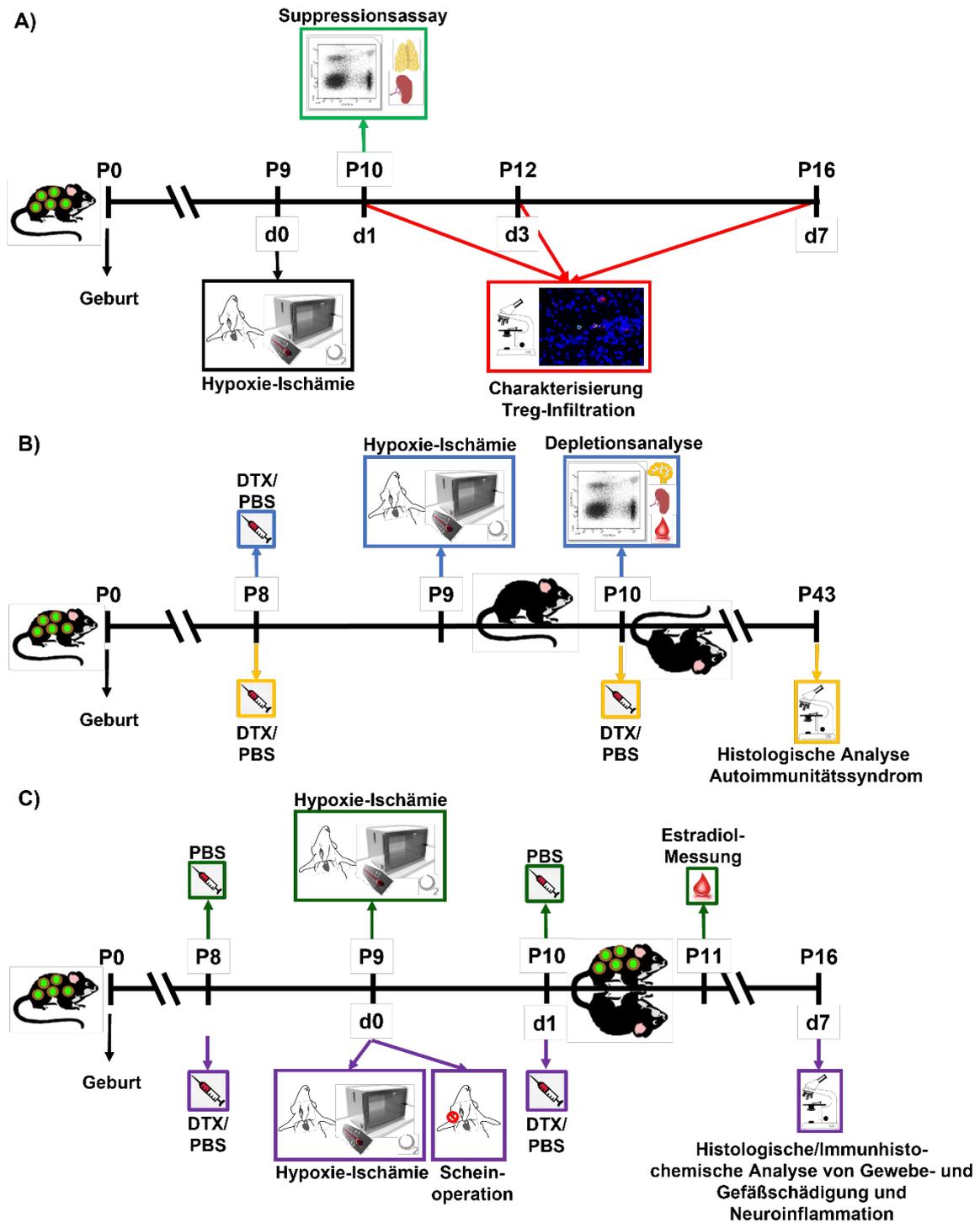


Abbildung 2-1 Experimentelles Design

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der verschiedenen Experimentalansätze. Sofern die Versuchstiere einer Hypoxie-Ischämie ausgesetzt wurden, erfolgte dies immer am neunten postnatalen Tag (P9). Für alle Versuche wurden DEREK-Mäuse verwendet. Zunächst wurde die Infiltration regulatorischer T-Zellen einen, drei und sieben Tage nach HI immunhistochemisch charakterisiert und das Schadensausmaß an diesen drei Zeitpunkten ermittelt (A, rot hinterlegt). Inwiefern sich die suppressive Aktivität regulatorischer T-Zellen männlicher und weiblicher neonataler Mäuse unterscheidet, wurde 24 Stunden nach HI analysiert. Dazu wurden Tregs aus Milz- und

Thymusgewebe isoliert und in einem Suppressionsassay die anti-proliferative Wirkung auf die Effektor-T-Zellproliferation durchflusszytometrisch untersucht (**A**, grün hinterlegt). Zur Überprüfung des DEREK-Mausmodells wurde den Tieren an P8 30 ng/g Körpergewicht DTX (bzw. PBS) injiziert und 24 Stunden nach HI an P10 das Ausmaß der Treg-Depletion durchflusszytometrisch in Blut, Milz und Gehirngeweben bestimmt (**B**, blau hinterlegt). Außerdem erfolgte eine histologische Untersuchung verschiedener Organe fünf Wochen nach zweimaliger DTX-Applikation an P8 und P10 im Hinblick auf Zeichen von Autoimmunitätsreaktionen und Gewichtsverlust (**B**, gelb hinterlegt). Sieben Tage nach HI und zweimaliger DTX- bzw. PBS-Injektion an P8 und P10 wurden zerebrale Gewebeschnitte histologisch und immunhistochemisch analysiert, um die Auswirkung der Treg-Depletion auf den hypoxisch-ischämischen Gewebeschaden, neuroinflammatorische Reaktionen und die Gefäßintegrität im Gehirn zu untersuchen (**C**, lila hinterlegt). Zudem wurde 48 Stunden nach HI im Serum PBS-behandelter Tiere die Estradiollevel mittels ELISA analysiert (**C**, grün hinterlegt). P = postnataler Tag, d = Tag nach Hypoxie-Ischämie, DTX = intraperitoneale Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin.

Um im weiteren Verlauf das Ausmaß des Schadens nach HI in An- und Abwesenheit von Tregs zu analysieren, wurde zunächst das zu verwendende Mausmodell überprüft (Abbildung 2-1 B). Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. W. Hansen, die diese Mauslinie zur Verfügung gestellt hat (Abel et al., 2012), erfolgte die Depletion der Tregs über zweimalige intraperitoneale (i.p.) Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin in 10 µl/g Körpergewicht PBS (*phosphate buffered saline*) am achten und nochmals am zehnten postnatalen Tag. Kontrolltiere erhielten zu gleichen Zeitpunkten i.p. Injektionen des gleichen Volumens PBS. Um ein lymphoproliferatives Autoimmunsyndrom als Langzeitfolge auszuschließen, wurden verschiedene periphere Organe (Leber, Lunge, Haut, Pankreas) fünf Wochen nach zweimaliger DTX-Injektion (P43) histologisch anhand Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Gewebeschnitte untersucht. Die Depletionseffizienz wurde in einem weiteren Experimentalansatz 24 Stunden nach HI, das heißt 48 Stunden nach einmaliger DTX-Injektion an P8, in Blut, Milz- und Hirngeweben durchflusszytometrisch ermittelt (Abbildung 2-1 B).

In einem weiteren Experimentalansatz wurde die Auswirkung einer Treg-Depletion auf den hypoxisch-ischämischen Gewebeschaden untersucht (Abbildung 2-1 C). Den Tieren wurde einen Tag vor und nach HI (P8 und P10) entweder DTX oder PBS injiziert. Am siebten Tag nach HI (P16, d7) wurden die Gehirne entnommen, Kryostatschnitte erstellt und diese histologisch und immunhistochemisch analysiert. Kresylviolett-Färbungen dienten zur Analyse neuropathologischer Veränderungen. Daneben wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt, um die neuronale Schädigung und Effekte auf Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Gefäße zu untersuchen. Um einen möglichen Effekt einer Treg-Depletion auf diese Zellen und deren Entwicklung bzw. Aktivierung unabhängig von einer HI-Schädigung zu untersuchen, wurden zusätzlich scheinoperierte Tiere eingeschlossen, die in gleicher Weise wie HI Tiere jeweils PBS- und DTX-Injektionen erhielten. Inwiefern sich Estradiollevel

möglicherweise zwischen männlichen und weiblichen Tieren nach HI-Schädigung unterscheiden, wurde 48 Stunden nach HI im Serum PBS-behandelter Tiere mittels ELISA analysiert (Abbildung 2-1 C). Gehirngewebe dieser Tiere wurden im Rahmen einer weiteren Substudie zu diesem Projekt, in der die Auswirkung einer Treg-Depletion zum akuten Zeitpunkt nach HI untersucht wurde (Beckmann et al., 2022), weiter analysiert. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht Teil dieser Dissertation.

Insgesamt wurden 95 weibliche und 94 männliche Tiere in die hier dargelegten Untersuchungen eingeschlossen. Die Zuteilung der Versuchstiere zu den verschiedenen Gruppen erfolgte randomisiert. Elf Jungtiere (5 Weibchen, 6 Männchen) erhielten weder eine Scheinoperation noch eine HI. Weitere 32 Jungtiere (16 Weibchen, 16 Männchen) wurden einer Scheinoperation unterzogen. Von den insgesamt 146 verbleibenden Jungtieren (74 Weibchen, 72 Männchen) sind 15 Jungtiere (6 Weibchen, 9 Männchen) verstorben, was mit 10,3% im Bereich der zuvor beschriebenen Mortalitätsrate für das hier untersuchte Tiermodell liegt (Reinboth et al., 2016). In sämtlichen Experimentalansätzen erfolgte die Aufarbeitung der Proben und die Auswertung verblindet.

2.2.4 Perfusion und Gewebepräparation

Die Perfusion der Versuchstiere und anschließende Gewebeiisolation erfolgte am neunten, zehnten, elften, zwölften, sechzehnten oder dreiundvierzigsten postnatalen Tag (Abbildung 2-1). Nach Anästhesieren der Tiere durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Chlorthalhydrat und Ausbleiben von Schmerzreflexreaktionen wurden die Mäuse an ihren Extremitäten fixiert und Thorax und Abdomen eröffnet. Zur Perfusion wurde das rechte Atrium eingeschnitten, darüber der linke Ventrikel kanüliert und eiskaltes PBS in den Kreislauf perfundiert. Die Entnahme von Blutproben für durchflusszytometrische Analysen erfolgte mittels EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-beschichteter Kapillaren (Tabelle 2-11) direkt vor Perfusion und nach Inzision des rechten Atriums. Die Gehirne wurden für die histologischen Untersuchungen vorsichtig freipräpariert, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Für durchflusszytometrische Analysen bzw. Suppressionsassays wurden Milzen, Thymi und Gehirngewebe präpariert und in 15 ml Reaktionsgefäße mit 5 ml HEPES (Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure)-gepuffertem RPMI 1640 Medium (Tabelle 2-1) überführt. Für die histologische Untersuchung verschiedener Organe auf Anzeichen von langfristigen Autoimmunreaktionen nach zweimaliger neonataler DTX-Applikation erfolgte nach der PBS-Perfusion eine weitere Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA, Tabelle 2-1). Die entnommenen Organe wurden in Röhrchen mit 4% PFA überführt, über Nacht nachfixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

2.3 Histologie und Immunhistochemie

2.3.1 Erstellung von Gewebeschnitten

Zur Erstellung von Paraffinschnitten wurden die entnommenen Gewebe zunächst über Nacht in 4% PFA nachfixiert. Die Dehydrierung der Präparate erfolgte durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen, am nächsten Tag wurden die Organe einzeln in Paraffin eingebettet. Die ausgekühlten Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Schlitten-Mikrotoms (Tabelle 2-11) in 10 µm dicke Scheiben geschnitten und jeweils vier Schnitte aus dem 55 °C warmen Wasserbad auf einen Objektträger aufgenommen (Tabelle 2-11). Die Objektträger wurden anschließend zwei Stunden bei 37 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Erstellung von Kryostatschnitten unter Verwendung eines Kryostat Mikrotoms (Tabelle 2-11) wurden die zuvor bei -80 °C gelagerten Gehirne bei -20 °C über Nacht an die Temperatur des Kryostaten angeglichen. Mit Hilfe von OCT-Medium (Tabelle 2-1) wurden die Präparate auf der Stempel-Vorrichtung fixiert und anschließend 20 µm dicke Koronarschnitte im Bereich zwischen 1,05 mm und -2,7 mm von Bregma erstellt. Es wurden jeweils vier Schnitte auf einem Objektträger aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Histopathologische Evaluation peripherer Organe

Zur Untersuchung verschiedener Organgewebe auf Zeichen einer Autoimmunität nach neonataler Treg-Depletion wurden Leber, Lunge, Haut und Pankreas aus 43 Tage alten Tieren, die eine zweimalige DTX-Injektion an P8 und P10 erhielten, präpariert. Die histopathologische Analyse erfolgte in Paraffinschnitten, die mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurden, um aussagekräftige Übersichtsbilder zur Untersuchung möglicher Autoimmunreaktionen zu erhalten. Diese Färbung ist eine gängige Übersichtsfärbung zur Beurteilung krankhafter Veränderungen. Der basische Farbstoff Hämatoxylin dient zur Markierung des Zellkernes, Eosin hingegen färbt als saurer Farbstoff Bestandteile des Zytoplasmas an. Zunächst wurden die Schnitte unter Verwendung von Xylol (2x 10 Minuten) entparaffinisiert. Anschließend folgte eine Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe (je 3 Minuten in 100%, 100%, 96%, 96%, 70% Ethanol). Die Schnitte wurden unter fließendem Leitungswasser gründlich gespült und im Anschluss zunächst für die Kernfärbung drei Minuten lang in Hämalun nach Mayer (Tabelle 2-1) eingefärbt, gefolgt von Waschen unter fließendem Leitungswasser, bis durch eine pH-Wert-Änderung ein Farbumschlag von rot zu blau festzustellen war. Es folgte eine dreiminütige Färbung mit Eosin (Tabelle 2-1) zur Zytoplasma-

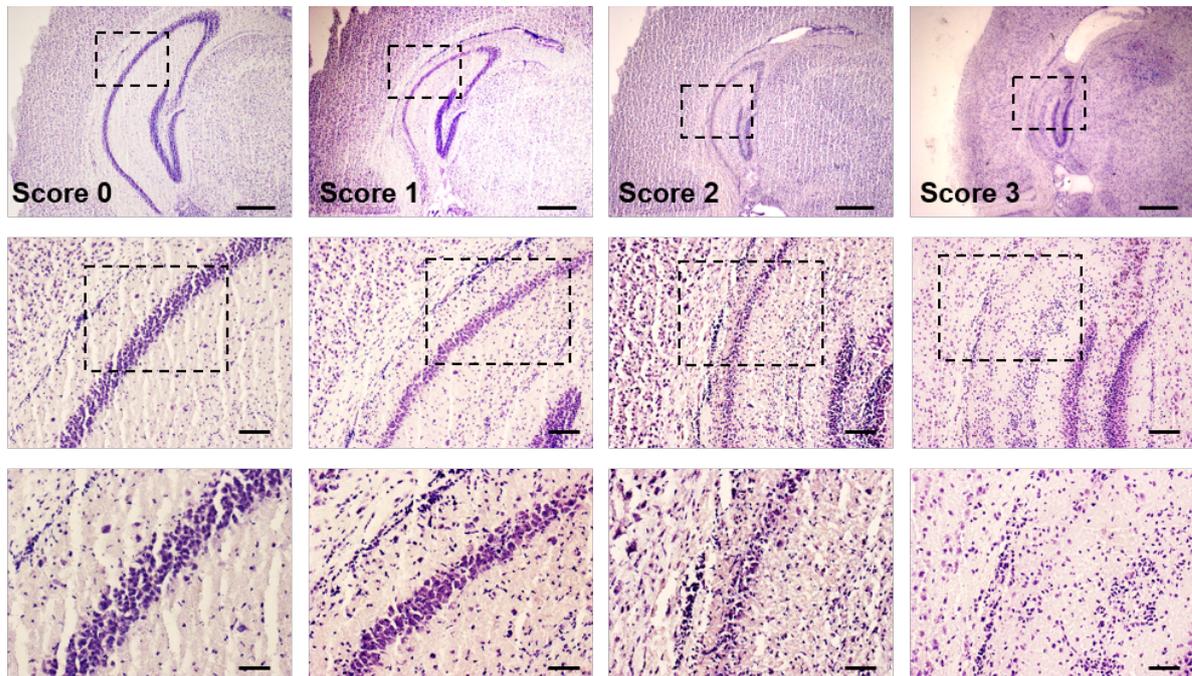
Färbung. Die Dehydrierung erfolgte in einer ansteigenden Alkoholreihe (2x 1 Minute in 96%, 2x 3 Minuten in 100% Ethanol). Nach insgesamt zehnminütigem Aufhellen der Schnitte in Xylol wurden die Objektträger mit Entellan (Tabelle 2-1) eingedeckt und im Anschluss trocken bei Raumtemperatur gelagert. Die morphologische Auswertung der Schnitte am Durchlichtmikroskop, bei der insbesondere auf eine Infiltration des Gewebes durch Immunzellen geachtet wurde, erfolgte in Zusammenarbeit mit Jun.-Prof. Dr. Sven Schumann aus dem Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

2.3.3 Neuropathologische Schadensevaluation und Ödem/Atrophie-Bestimmung

Um das Ausmaß der Schädigung der Gehirne nach Hypoxie-Ischämie zu bestimmen, wurde eine Kresylviolett-Färbung von jedem fünften Objektträger erstellt. Kresylviolett eignet sich insbesondere zur Darstellung und Beurteilung von Nervengewebe, indem es basophile Verbindungen wie RNA und DNA bindet, sodass vor allem Zellkerne und Ribosomen violett angefärbt werden. Vor Beginn der Färbung wurden die Kryostatschnitte zunächst 30 Minuten lang bei 37 °C aufgetaut und anschließend für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden zwei Minuten lang in 1% Kresylviolett-Lösung (Tabelle 2-1) eingefärbt und anschließend durch mehrmaliges Eintauchen in destilliertes Wasser gewaschen. Es folgte eine Differenzierung und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils mehrmaliges kurzes Eintauchen in 70%, 96%, 96%, 100% Ethanol). Danach wurden die Schnitte für mindestens zwei Minuten in Xylol belassen, bevor sie mit Entellan eingedeckt wurden. Die gefärbten Objektträger wurden im Anschluss bei Raumtemperatur gelagert.

Die Beurteilung des Gewebeschadens anhand Kresylviolett-gefärbter Schnitte erfolgte, wie zuvor von der Arbeitsgruppe beschrieben, unter Anwendung eines neuropathologischen Punktesystems (Reinboth et al., 2016; Sheldon et al., 1998). Der zelluläre und strukturelle Schaden des Gewebes der ipsilateralen Seite wurde dazu in spezifischen Regionen durchlichtmikroskopisch im Vergleich zur contralateralen, nicht geschädigten Seite untersucht und anhand von definierten Kriterien (Abbildung 2-2) mit einem Punktwert (Score) von 0-3 bewertet. Es wurde je ein Schnitt auf Höhe des Striatum (0,25 mm von Bregma) und des Hippocampus (-2,0 mm von Bregma), sowie ein Schnitt aus einem weiter kaudal gelegenen Level (-2,7 mm von Bregma) untersucht. Die neuropathologische Beurteilung erfolgte im Cortex (auf allen drei Ebenen: C1, C2, C3), Striatum, Thalamus und Hippocampus (Cornu ammonis 1 (CA1), Cornu ammonis 2 (CA2), Cornu ammonis 3 (CA3), Gyrus Dentatus). Für quantitative Gruppenvergleiche wurden sowohl die berechneten Gesamtpunktzahlen aller Regionen (Maximalwert 27) als auch die regionalen Gesamtpunktzahlen für den Cortex

(Maximalwert 9), den Hippocampus (Maximalwert 12), das Striatum (Maximalwert 3) und den Thalamus (Maximalwert 3) ermittelt.



| Score | Bewertungskriterien |
|-------|--|
| 0 | kein detektierbarer Zellverlust |
| 1 | geringer, herdförmiger Zellverlust; wenige, kleine geschädigte Regionen |
| 2 | säulenförmiger, lokal begrenzter Schaden im Cortex oder moderater bis schwerer Zellverlust in anderen Regionen |
| 3 | Gliose und zystischer Infarkt |

Abbildung 2-2 Bewertungskriterien zur neuropathologischen Schadensevaluation

Dargestellt sind exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen Kresylviolett-gefärbter Schnitte auf Höhe der Hippocampus-Region in drei verschiedenen Vergrößerungen (von oben nach unten: 2,5x, 10x, 20x; die 10x und 20x Aufnahmen entsprechen jeweils dem in der nächst kleineren Vergrößerung eingezeichneten Rechteck; Maßstabsbalken in 2,5x-Vergrößerung 500 µm, 10x-Vergrößerung 100 µm, 20x-Vergrößerung 50 µm). Es sind Beispielaufnahmen unterschiedlicher Schweregrade der Gewebeschädigung abgebildet, die zur Quantifizierung von neuropathologischen Veränderungen herangezogen wurden. Die Einordnung des Gewebeschadens zu den unterschiedlichen Schweregraden erfolgte anhand der in der Tabelle dargestellten Bewertungskriterien.

Das Ausmaß an Ödem oder Atrophie des geschädigten Gewebes wurde mittels volumetrischer Analyse bestimmt. Zunächst wurden die Kresylviolett-gefärbten Schnitte mit einem Gewebescanner (Tabelle 2-11) digitalisiert. Unter Verwendung der Software ImageJ wurden die ipsi- und contralateralen Flächen von Cortex, Striatum, Hippocampus, Thalamus und der gesamten Hemisphären jeweils anhand von acht Kresylviolett-gefärbten Hirnschnitten im Abstand von 0,4 mm gemessen (Abbildung 2-3).

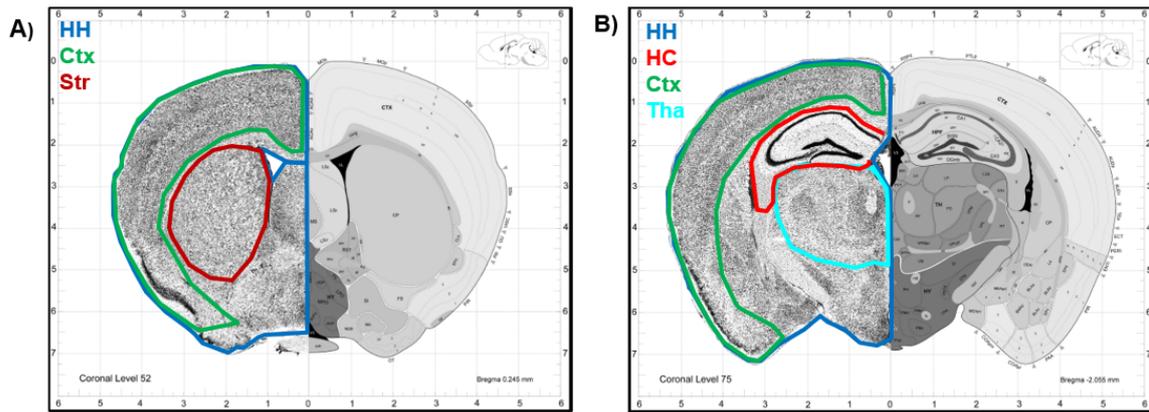


Abbildung 2-3 Atrophie/Ödem-Messung verschiedener Regionen auf Höhe des Striatum und des Hippocampus

Beispielhaft sind die verschiedenen Strukturen in der **(A)** Striatum- (0,25 mm von Bregma) und **(B)** Hippocampus-Ebene (-2,0 mm von Bregma), die zur Atrophie-Messung verwendet wurden, markiert. Die Strukturen wurden jeweils für die ipsi- und contralaterale Hemisphäre gemessen. Dunkelblau: gesamte Hemisphäre, grün: Cortex, rot: Striatum **(A)** bzw. Hippocampus **(B)**, hellblau: Thalamus.

Um die Volumina der Hemisphären bzw. der einzelnen Regionen zu ermitteln, wurden die errechneten Flächen in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Volumen Hemisphäre bzw. Region} = \sum_{\text{Level } 1}^{\text{Level } 8} \frac{\text{Fläche Level } n + \text{Fläche Level } n + 1}{2} \times 0,4 \text{ mm}$$

Zur Berechnung des Volumenverlustes bzw. der Volumenzunahme (Ödem) der ipsilateralen gegenüber der contralateralen Seite wurde der Atrophie/Ödem-Index nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Volumenverlust bzw. -zunahme} = \left(\frac{\text{Volumen ipsilateral}}{\text{Volumen contralateral}} \right) - 1$$

Werte kleiner 0 entsprechen einer Atrophie und Werte größer 0 einer Volumenzunahme.

2.3.4 Immunhistochemische Analyse der Infiltration regulatorischer T-Zellen

Zur Charakterisierung der zeitlichen Infiltration regulatorischer T-Zellen sowie aller CD45⁺-Leukozyten in das hypoxisch-ischämische Gehirn wurde eine eGFP/CD45 Ko-Färbung angefertigt. Dazu wurden jeweils 16 Schnitte der Striatum- (0,25 mm von Bregma) und der Hippocampus-Ebene (-2,0 mm von Bregma) von zehn, zwölf und sechzehn Tage alten Tieren (d1, d3, d7 nach HI) gefärbt. Des Weiteren wurden für je zwei Schnitte pro Ebene anti-NeuN- und anti-eGFP-Antikörper kombiniert, um die Lokalisation von Tregs mit der Ausprägung des neuronalen Schadens nach HI zu assoziieren. Zunächst wurden die Kryostat-schnitte jeweils 15 Minuten bei 37 °C und bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend drei Minuten in 1:1 Aceton/Methanol-Lösung (Tabelle 2-1) fixiert. Nach dreimaligem

Waschen für je fünf Minuten in PBS erfolgte die Blockierung mit verdünnter IHC-Blocklösung I (Tabelle 2-2) für 60 Minuten, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden die Schnitte für die eGFP/CD45 Ko-Färbung mit den primären Antikörpern Kaninchen-anti-Maus eGFP und Ratte-anti-Maus CD45 in Blocklösung über Nacht bei +4 °C inkubiert, für die eGFP/NeuN Färbung erfolgte die Inkubation mit den Primär-Antikörpern Kaninchen-anti-Maus eGFP und Maus-anti-Maus NeuN (Tabelle 2-4). Nach drei Waschzyklen in PBS erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 und Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor 555 für eGFP/CD45 und Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 und Ziege-anti-Maus Alexa Fluor 555 für eGFP/NeuN, Tabelle 2-5) in PBS für 120 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen erfolgte die Kernfärbung mittels Dapi (4'6-Diamidin-2-phyllindol, Tabelle 2-1). Die Objektträger wurden ein weiteres Mal gewaschen und mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Tabelle 2-1) eingedeckt. Nach Trocknen bei Raumtemperatur über Nacht wurden die Objektträger bei +4 °C gelagert.

Für die quantitative Auswertung der Färbungen wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Kamera (Tabelle 2-11) durchgeführt. Zur repräsentativen Darstellung erfolgten zusätzlich Aufnahmen mit einem Konfokalmikroskop (Tabelle 2-11). Zur Bestimmung der Treg-Infiltration wurden alle eGFP⁺-regulatorischen T-Zellen in der gesamten ipsilateralen Hemisphäre bzw. in einzelnen Gehirnregionen (Cortex, Striatum, Hippocampus und Thalamus) ausgezählt. Außerdem wurden für beide Färbungen sechs Regionen (*regions of interest*, ROIs) in der Striatum- (Abbildung 2-4 A) sowie zehn ROIs in der Hippocampus-Ebene (Abbildung 2-4 B) in vierzigfacher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Aufgrund der teilweise starken Infiltration war eine manuelle Zählung von Leukozyten in der CD45-Färbung in der gesamten Hemisphäre nicht möglich. Daher wurde für die Bestimmung der Leukozyten die Anzahl an CD45⁺-Zellen in den zuvor genannten ROIs ermittelt und die Zellzahl pro mm² berechnet. Über Multiplikation dieser Werte mit zuvor anhand der Kresylviolett-Färbung ermittelten Flächen der Regionen wurde die Anzahl der Zellen in der gesamten Region ermittelt und anschließend aufsummiert, um die gesamte Zellzahl pro Hemisphäre pro Schnitt zu berechnen. Für die Quantifizierung der neuronalen Dichte wurden die Aufnahmen in binäre Bilder umgewandelt und anschließend die NeuN⁺-Fläche mittels ImageJ bestimmt, da eine Auszählung einzelner Neurone in dicht gepackten Regionen (z.B. Hippocampus) nicht möglich war.

2.3.5 Immunhistochemische Analyse der Neuronen- und Oligodendrozytendichte

Um das Ausmaß der Hirnschädigung nach Treg-Depletion im Detail zu beurteilen, wurden immunhistochemische Färbungen für den neuronalen Marker NeuN und den Oligodendrozyten-spezifischen Transkriptionsfaktor Olig2 angefertigt. Dazu wurden je zwei Kryostatschnitte für NeuN- und zwei Schnitte desselben Objektträgers für Olig2 auf Striatum- (0,25 mm von Bregma) und Hippocampus-Ebene (-0,2 mm von Bregma) angefärbt. Die Färbung wurde analog zum Protokoll in Abschnitt 2.3.4 durchgeführt. Zunächst wurden die Objektträger 15 Minuten bei 37 °C und bei Raumtemperatur getrocknet und für fünf Minuten in -20 °C kaltem 4% PFA fixiert. Die Blockierung erfolgte mit 1:10 verdünnter IHC-Blocklösung II (Tabelle 2-2) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern Kaninchen-anti-Maus NeuN und Kaninchen-anti-Maus Olig2 in Blocklösung über Nacht bei +4 °C inkubiert (Tabelle 2-4). Am nächsten Tag erfolgte die 120-minütige Inkubation mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488, Tabelle 2-5) in PBS und anschließender Kernfärbung mit Dapi.

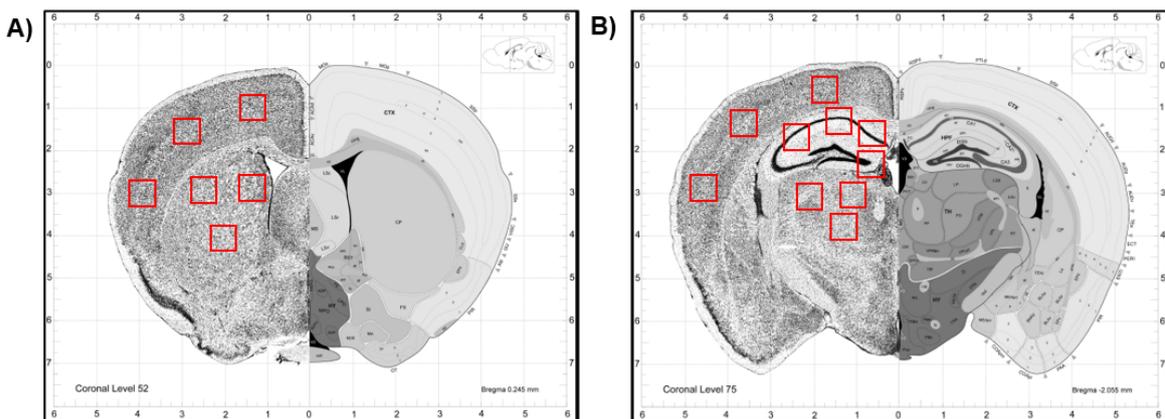


Abbildung 2-4 Untersuchte Regionen zur immunhistochemischen Analyse der leukozytären, neuronalen und oligodendrozytären Dichte in der Striatum- und Hippocampus-Ebene

Beispielhaft sind hier die ROIs als rote Quadrate im Level 0,25 mm (A) und -2,0 mm (B) von Bregma für die Auswertung der Menge an infiltrierten Leukozyten, der Neuronen-Dichte und der Anzahl an Oligodendrozyten dargestellt. Es wurden je drei ROIs im Cortex und Striatum (A) sowie je drei ROIs im Cortex, Hippocampus, Thalamus und ein ROI im Gyrus dentatus (B) auf der ipsi- und contralateralen Seite zur Auswertung herangezogen.

Die Anzahl der Oligodendrozyten wurde über die manuelle Zählung von Olig2⁺Dapi⁺-Zellen in entsprechenden Aufnahmen ermittelt bzw. die neuronale Dichte, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, anhand der NeuN⁺-Fläche bestimmt. Für jede Region wurde der Mittelwert aus allen ROIs (für den Cortex zusätzlich aus beiden Leveln) ermittelt.

2.3.6 Immunhistochemische Analyse der Mikroglia- und Astrogliaaktivierung sowie der Gefäßschädigung

Zur Analyse der lokalen neuroinflammatorischen Reaktionen im Gehirn wurden Kryostatschnitte gegen Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), ein Marker für Mikrogliaaktivierung, und astrozytäres GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) ko-gefärbt. Dazu wurden Gewebeschnitte ohne vorherige Trocknung für vier Stunden bei 4 °C in 4% PFA-Lösung fixiert und im Anschluss mit Zitratpuffer (Tabelle 2-2) in einem 100 °C heißen Wasserbad für zehn Minuten inkubiert. Nach 15-minütigem Abkühlen und drei Waschzyklen in PBS folgte eine 60-minütige Blockierung in IHC-Blocklösung I (Tabelle 2-2) und anschließend eine Inkubation der Schnitte mit den Primär-Antikörpern Kaninchen-anti-Maus Iba-1 und Ratte-anti-Maus GFAP in Blocklösung über Nacht (Tabelle 2-4). Am zweiten Tag wurden die Objektträger, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 und Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor 555, Tabelle 2-5) in PBS inkubiert und anschließend die Zellkerne für zehn Minuten mit Dapi gefärbt.

Um die Gefäßschädigung im Gehirn nach Hypoxie-Ischämie zu beurteilen, wurden CD31/Laminin Ko-Färbungen erstellt. CD31 ist ein Pan-Endothelzellmarker und Laminin ein Bestandteil von Basalmembranen. Analog zur eGFP/CD45 und eGFP/NeuN Ko-Färbung (Kapitel 2.3.4) wurden die Schnitte zunächst für drei Minuten in 4 °C kalter 1:1 Aceton/Methanol Lösung fixiert und im Anschluss für eine Stunde in IHC-Blocklösung II (Tabelle 2-2) inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit den Primär-Antikörpern Ratte-anti-Maus CD31 und Kaninchen-anti-Maus Laminin bei 4 °C über Nacht (Tabelle 2-4). Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte über Inkubation mit entsprechenden Sekundär-Antikörpern in PBS (Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor 488 und Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 594) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellkerne mit Dapi gefärbt.

Da sich hinsichtlich neuropathologischer Veränderungen und neuronaler Dichte die stärkste Schädigung und die deutlichsten Effekte nach Treg-Depletion im Hippocampus darstellten, beschränkte sich die Quantifizierung dieser Färbungen auf den Hippocampus. Die Auswertung der Mikroglia-Aktivierung und Astrogliose erfolgte mittels Konfokalmikroskopie (Tabelle 2-11) unter Verwendung des 10x Objektivs. Das verwendete Konfokalmikroskop ist mit drei Lasern (Diodenlaser 405 nm, Argonlaser 514 nm und G-Helium-Neon-Laser 542 nm) und drei Filtern (450/50-405 LP, 515/20-540 LP und 585/65-640 LP) ausgestattet. Es wurden 3-dimensionale Aufnahmen (Z-Stapel) in 20 µm dicken Schnitten erstellt und durch Verwendung der maximalen Intensitätsprojektion in 2-dimensionale Bilder für die Auswer-

tung konvertiert. Über die „*scan large image*“-Funktion wurden Aufnahmen für den gesamten Hippocampus erstellt. Dabei wurden automatisch mit dem 10x Objektiv 4 mal 3 Z-Stapel-Aufnahmen (gesamte Z-Stapel-Dicke: 15 µm, Ebenenabstand: 5 µm) mit einer Überlappung von 15% erstellt, die durch die NIS-Elements AR Software im Anschluss zu einem Bild zusammengefügt wurden. Die Quantifizierung erfolgte automatisch mit der NIS-Elements AR Analysesoftware über die Erstellung binärer Bilder. Da eine Abtrennung einzelner Mikroglia und Astrozyten vor allem in stark geschädigten Tieren nicht möglich war, wurde die Iba-1⁺- und GFAP⁺-Fläche ermittelt und auf die Fläche des zuvor umrandeten Hippocampus normiert. Die Gefäßschädigung wurde anhand der CD31/Laminin-Färbung untersucht. Zum einen wurde die Gefäßdichte über die Messung der CD31⁺-Fläche ermittelt und zum anderen die Laminin⁺-Fläche bestimmt. Dazu wurden für beide Färbungen drei ROIs in der Hippocampusregion (Abbildung 2-4) in vierzigfacher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Quantifizierung der CD31⁺- bzw. Laminin⁺-Fläche erfolgte an binären Bildern mittels ImageJ. Es wurde jeweils der prozentuale Anteil der angefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Aufnahme ermittelt und anschließend der Mittelwert aus allen ROIs errechnet. Laminin ist ein Marker für die normalerweise dicht an den Endothelzellen liegenden Basalmembranen, die jedoch infolge der HI ebenso geschädigt sind. Dies äußert sich, wie in Abbildung 2-5 dargestellt, in einer Auflockerung und Ablösung der Basalmembranen, was sich in einer erhöhten Laminin⁺-Fläche messen lässt (Abbildung 2-5).

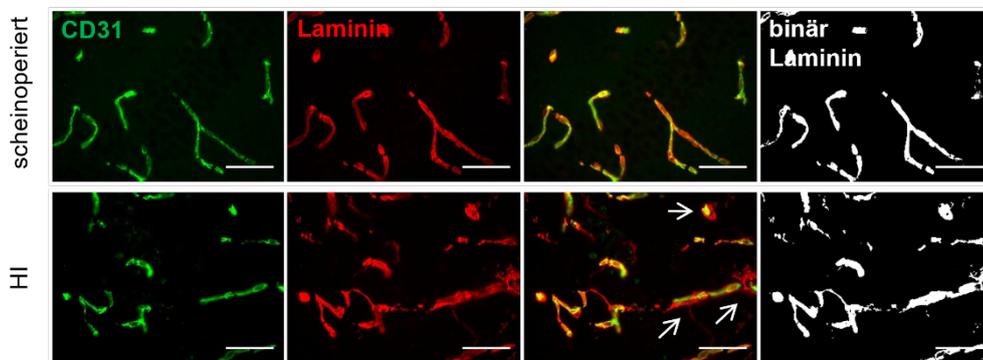


Abbildung 2-5 Neonatale HI verursacht eine Schädigung der Basalmembran

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Hippocampusregion sieben Tage nach Scheinoperation bzw. HI. Die Gewebeschnitte wurden gegen den endothelialen Marker CD31 sowie Laminin, einen Marker für Basalmembranen, gefärbt, was eine Ablösung und Auflockerung der Basalmembran in Folge der HI zeigte. Als Maß der Gefäßschädigung wurde die Laminin⁺-Fläche in binären Bildern gemessen (Maßstabsbalken 50 µm).

2.4 Durchflusszytometrische Analysen

2.4.1 Ermittlung der Depletionseffizienz

Die Dosierung und Auswahl der Zeitpunkte der DTX-Injektion zur Treg-Depletion erfolgte anhand der Vorerfahrungen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. W. Hansen, die die Dereg-Mauslinie zur Verfügung gestellt hat (Abel et al., 2012). Da diese jedoch auf der Behandlung von adulten Nagetieren basieren, wurde zunächst geprüft, ob die beschriebene Methodik auch auf neonatale Versuchstiere übertragbar ist. Die Depletionseffizienz wurde in verschiedenen Geweben 48 Stunden nach DTX-Injektion durchflusszytometrisch ermittelt. Dazu wurden ipsilaterale Gehirnhemisphären und Milzen präpariert und Blut aus dem rechten Atrium entnommen. Für den in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Suppressionsassay wurden Milzen und Thymi präpariert und zunächst gleichermaßen weiterverarbeitet. Die Organe wurden durch ein 70 µm Sieb mit 15 ml HEPES-gepuffertem RPMI 1640 Medium passiert und homogenisiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen der Milzen und Thymi bei 4 °C für zehn Minuten bei 550xg zentrifugiert. Zur Erythrozytenlyse wurden die Pellets des Milzgewebes zunächst in 5 ml Lysepuffer (Tabelle 2-2) resuspendiert und mit 2,5 ml HEPES-gepuffertem RPMI 1640 Medium versetzt, erneut zentrifugiert und abschließend mit PBS gewaschen. Thymuszellpellets für den Suppressionsassay wurden ohne Lyse-Zwischenschritt direkt mit PBS gewaschen. Die homogenisierten Gehirngewebeproben wurden zunächst für 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert und das Pellet anschließend in 37% Percoll in 0,01 N HCl/PBS resuspendiert, gefolgt von einer 20-minütigen Zentrifugation bei 2800xg ohne Bremse. Diese kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation ermöglichte die Entfernung von Myelin, das oben aufschwimmt. Das Zellpellet wurde anschließend in PBS gewaschen. Das gewonnene Blut wurde zunächst in EDTA-beschichtete Röhrchen überführt, in denen 100 µl 2 mM EDTA in PBS vorgelegt waren. Die Erythrozytenlyse erfolgte anschließend in 10 ml Lysepuffer, gefolgt von einem Waschgang in PBS. Für die Analyse der Milzzellen wurde $\frac{1}{4}$ der Zellen, für die Analyse der Thymuszellen $\frac{1}{20}$ der Zellen und für die Blut- und Gehirngewebeanalyse alle isolierten Zellen verwendet.

Die isolierten Zellen wurden für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln mit 100 µl Antikörper-Mix (anti-CD45 Pacific Blue, CD3 PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex) und CD4 PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7), Tabelle 2-6) inkubiert und anschließend mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde zusätzlich FvD (*fixable viability dye*, Tabelle 2-6) zum Antikörpermix hinzugefügt. Zur Detektion Foxp3-positiver-Zellen erfolgte eine Intrazellulärfärbung mit dem *Foxp3 intracellular staining kit* (Tabelle 2-10) entsprechend der Herstellerangaben. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Färbung mit anti-Foxp3 PE (Phycoerythrin, Tabelle 2-6) für 30 Minuten bei 4 °C.

Nach zwei Waschzyklen (mit Permeabilisierungspuffer und PBS) wurden die Zellen der Blut- und Gehirnproben in 30 µl PBS und die Milz- und Thymuspellets in je 200 µl PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden jeweils 30 µl PBS mit einer definierten Anzahl fluoreszierender Truecount Beads zu den Zellsuspensionen hinzugefügt. Die Messung und Analyse der Proben erfolgte unter Verwendung des BD FACS LSR II und der BD FACS DIVA Software (Tabelle 2-11) anhand der in Abbildung 2-6 beispielhaft dargestellten Gating-Strategie. Zum Errechnen der absoluten Zellzahlen wurde die folgende Formel angewendet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{positive Events} \times \text{Anzahl hinzugefügter Beads}}{\text{Anzahl gemessener Beads}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Entsprechend der pro Färbung eingesetzten Zellzahl ergaben sich folgende Verdünnungsfaktoren: Milz: 4, Thymus: 20, Blut/Gehirn: 1.

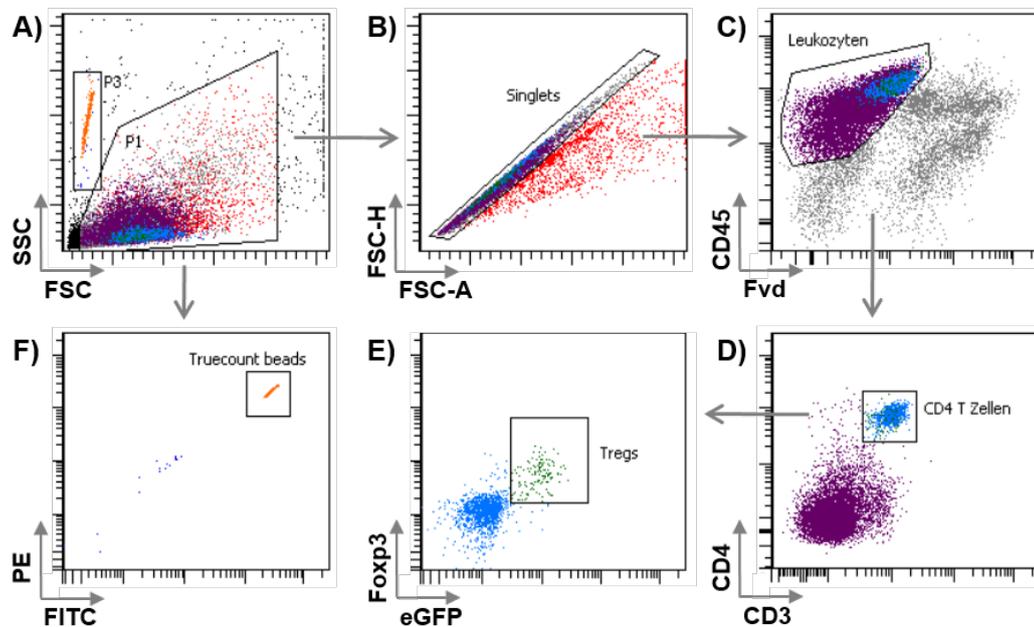


Abbildung 2-6 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der Anzahl an Tregs

Dargestellt ist die Gating-Strategie exemplarisch für Milzzellen. Anhand der Scattercharakteristik wurde zunächst Zelldebris ausgeschlossen (A) und Einzelzellen identifiziert (B). Innerhalb dieser Population wurden lebende Leukozyten als FvD⁻ und CD45⁺-Zellen identifiziert (C) und daraus auf CD3⁺CD4⁺-Zellen gated (D), um innerhalb dieser Zellpopulation Fxp3⁺-Tregs zu identifizieren, die einerseits mit einem anti-Fxp3 PE-Antikörper gefärbt waren und andererseits eGFP exprimieren (E). Die absolute Zellzahl wurde über die Messung von Truecount Beads (A, F) ermittelt, die zunächst anhand ihrer Scattercharakteristik (A) und danach anhand ihrer Multifluoreszenz identifiziert werden konnten (F).

2.4.2 Analyse der suppressiven Aktivität regulatorischer T-Zellen

Um die Funktionalität der Tregs zu analysieren, wurde ihre suppressive Funktion auf die Effektor-T-Zellproliferation untersucht. Tregs wurden aus Milzen und Thymi von Mäusen isoliert, die 24 Stunden zuvor an P9 einer Hypoxie-Ischämie unterzogen wurden. Zellsuspensionen der Milzen und Thymi wurden, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, hergestellt. Da das Thymusgewebe bei einer insgesamt sehr großen Zellzahl nur einen geringen Anteil an regulatorischen T-Zellen aufweist, wurden hier zunächst CD4⁺-Zellen mit Hilfe des *CD4⁺ T-cell Isolation Kit* (Tabelle 2-10) und magnetischer Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS) nach Herstellerangaben vorsortiert. Dazu wurden Thymuspellets in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und 100 µl CD4⁺-T-Zell Biotin-Antikörper-Mix hinzugegeben, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation bei 4 °C. Nach Zugabe von 200 µl Anti-Biotin MicroBead Mix und erneuter Inkubation für 15 Minuten erfolgte eine Zentrifugation bei 550xg. Die Biotin-Antikörper-Komplex-markierten CD4⁺-Zellen wurden dann mittels magnetischer Zellsortierung am Auto MACS pro (Tabelle 2-11) sortiert. Im Anschluss wurde mit den Thymuszellen wie mit den Zellsuspensionen des Milzgewebes verfahren: Zunächst wurden die Zellpellets in 1 ml Antikörper-Master-Mix (anti-CD8 Allophycocyanin und CD4 Pacific Blue, Tabelle 2-7) aufgenommen und für zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml FACS-Puffer (Tabelle 2-2) wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Unter Verwendung des FACS Aria II (Tabelle 2-11) wurden in Zusammenarbeit mit Witold Bartosik aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie alle Foxp3⁺CD4⁺CD8⁻GFP⁺-Zellen sortiert und in einem mit IMDMc-Medium (Tabelle 2-3) befüllten FACS-Röhrchen aufgefangen. Die Anzahl an Tregs in den Proben wurde im Anschluss unter Verwendung einer Neubauer Kammer bestimmt: Die Zellsuspensionen wurden 1:2 mit Trypan Blau verdünnt und auf die Zählkammer gegeben. Die Anzahl an Zellen pro Großquadrat wurde lichtmikroskopisch ausgezählt und die Gesamtzahl pro Probe anhand der folgenden Formel berechnet:

$$n_{gesamt} = \emptyset n_{Gro\beta quadrat} \times Verd\ddot{u}nnungsfaktor \times Volumen \times 10^4$$

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) wurden benötigt, um regulatorischen T-Zellen sowie Responderzellen als Überlebens- und Proliferations-Faktor zu dienen. Als APCs wurden Milzzellen aus einer C57BL/6 Maus isoliert (Kapitel 2.4.1). Die Milzzellen wurden anschließend bestrahlt, um eine Proliferation der APCs selbst zu verhindern. Analog zum oben beschriebenen Vorgehen bei Tregs wurde die Anzahl an APCs in der Probe mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden hier 1:100 mit Trypan Blau verdünnt.

Zur Unterscheidung zwischen Effektor T-Zellen und regulatorischen T-Zellen wurden die Responder- bzw. Effektorzellen aus der genetisch modifizierten CD45.1-Maus isoliert, was

eine Differenzierung anhand des CD45-Rezeptors ermöglichte. Dazu wurde aus der Milz der CD45.1-Maus, wie in Abschnitt 2.4.1 erläutert, eine Zellsuspension gewonnen. Die Isolation der CD4⁺-T-Zellen erfolgte analog zum Thymusgewebe mittels *CD4⁺ T-cell Isolation Kit* (Tabelle 2-10) und magnetischer Zellsortierung. Zusätzlich zu dem CD4⁺ T-Zell Biotin-Antikörper-Mix wurde 1 µl eines Biotin-gekoppelten Antikörpers gegen CD25 hinzugegeben, um regulatorischen T-Zellen sowie bereits aktivierte und proliferierende Zellen aus der CD4⁺ Responderzellpopulation auszusortieren. Nach einer weiteren fünfzehnminütigen Inkubation mit Anti-Biotin MicroBeads und einmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde das Pellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Biotin-Antikörper-Komplex-markierten CD4⁺-Zellen und CD25⁺-Zellen wurden anschließend mittels magnetischer Zellsortierung am Auto MACS pro (Tabelle 2-11) sortiert und unter Verwendung der Neubauer-Kammer, wie zuvor beschrieben, gezählt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Farbstoff eFluor 670 (Tabelle 2-8) für zehn Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Der rot fluoreszierende Farbstoff eFluor 670 wird bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf beide Tochterzellen aufgeteilt, was mit einem Halbieren der Fluoreszenz-Intensität einhergeht. Somit kann die Proliferationsrate der Zellen anhand der Abnahme der Fluoreszenz-Intensität gemessen werden (Abbildung 2-7). Zum Abstoppen der Färbung wurden 4 ml kaltes FCS (*fetal calf serum*, Tabelle 2-1) hinzugegeben und die Zellen fünf Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe zweimal gewaschen und in IMDMc-Medium aufgenommen.

Für den Suppressionsassay wurden die gewonnenen Zellen in eine 96-Well Platte gegeben. In jede Vertiefung wurden je 20.000 regulatorische T-Zellen, 20.000 eFluor 670-markierte Responderzellen und 60.000 bestrahlte APCs in einem Gesamtvolumen von 200 µl IMDMc-Medium (Tabelle 2-3) pipettiert. Zusätzlich wurde zu jeder Probe 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper hinzugefügt, um die T-Zellproliferation zu stimulieren. In Kontrollproben wurden die regulatorischen T-Zellen durch 100 µl IMDMc-Medium ersetzt, um die ungehemmte Proliferation der Responderzellen in Abwesenheit von Tregs zu ermitteln. Daneben wurden Responderzellen und Antigenpräsentierende Zellen mit 100 µl IMDMc-Medium ohne CD3-Antikörper pipettiert, um auszuschließen, dass die Responderzellen auch ohne Stimulation proliferieren.

Nach viertägiger Inkubation bei 37 °C wurden 80 µl FACS-Puffer zu jeder Probe gegeben und die Platte bei 300xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend in 100 µl Master-Mix (anti-CD4 Pacific Blue, anti-CD45.1 Phycoerythrin, Tabelle 2-9) resuspendiert und zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl FACS-Puffer wurde die Platte erneut zentrifugiert, die Proben in 120 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse des Suppressionsassays erfolgte am BD FACS LSR II mit Hilfe der BD FACS DIVA Software (Tabelle 2-11). Die Gating Strategie ist

in Abbildung 2-7 dargestellt. Das Gate für die eFluor 670 Fluoreszenz-Intensität wurde anhand der unstimulierten Kontrolle festgelegt (Abbildung 2-7 B oben). Für die Auswertung wurde zunächst in den stimulierten Proben mit und ohne Tregs der prozentuale Anteil der proliferierten $CD45.1^+CD4^+Foxp3^-$ -Zellen anhand der unstimulierten Kontrolle ermittelt. Danach wurde die prozentuale Inhibition berechnet, indem zum Mittelwert der stimulierten Proben ohne Tregs relativiert wurde.

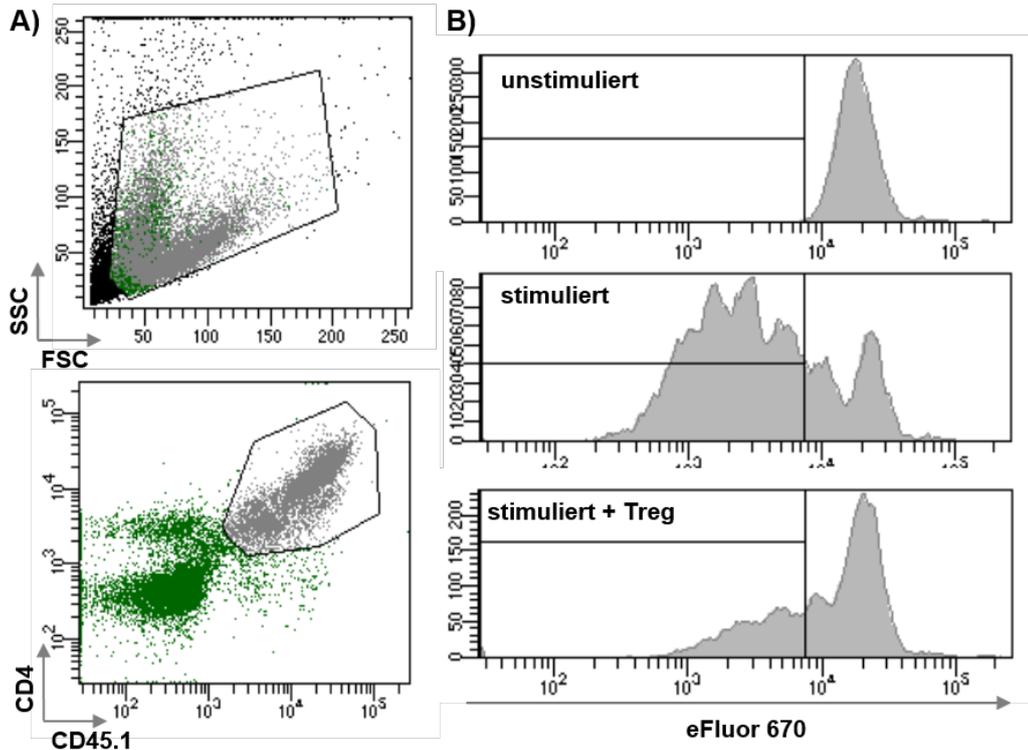


Abbildung 2-7 Gating-Strategie zur Auswertung des Suppressionsassays

Zur Analyse der suppressiven Aktivität der Tregs wurde die Proliferationsrate von Effektor-T-Zellen, die anhand ihrer CD4 und CD45.1 Expression identifiziert werden konnten, ermittelt (A). Die Proliferation der Zellen wurde anhand der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs eFluor 670, mit dem die Effektor-T-Zellen vor der Kultivierung gefärbt wurden, gemessen (B). Das Gate für die eFluor 670 Fluoreszenz-Intensität wurde anhand der unstimulierten Kontrolle festgelegt (B, oben). In proliferierenden Zellen kommt es zu einer Fluoreszenzabnahme, wie am Beispiel der stimulierten Zellen gezeigt (B, Mitte), während die Anwesenheit von Tregs die Proliferation der Effektor-T-Zellen inhibiert (B, unten).

2.5 Bestimmung der Estradiolkonzentration im Serum

Um zu überprüfen, ob sich der Gehalt des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol in männlichen und weiblichen Jungtieren unterscheidet, wurde der Serumspiegel von Estradiol 48 Stunden nach Hypoxie-Ischämie bestimmt. Zunächst wurde Blut über Punktion des Herzens entnommen, in Eppendorfgefäßen aufgefangen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um Gerinnung zu ermöglichen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation

für 15 Minuten bei 1000xg. Der Serumüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Estradiolkonzentration erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit (Tabelle 2-10) anhand der Herstellerangaben. Dazu wurde zunächst eine 96-Well-Platte mit Estradiol Primär-Antikörper beschichtet, gefolgt von der Inkubation mit den Serumproben bzw. einer standardisierten Menge an Estradiol (1:3 Verdünnungen zwischen 4,1 pg/ml - 1000 pg/ml) oder einer Kontrolllösung. Um störende Einflüsse durch Enzym-gebundenes Estradiol zu reduzieren, wurden die Serumproben zuvor mit Trichloressigsäure entsprechend den Herstellerangaben vorbehandelt, bevor sie auf die Platte gegeben wurden. Die Bestimmung der Estradiolkonzentration erfolgte über die Zugabe von mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiertem Estradiol, das mit dem Estradiol aus den Proben um die Bindungsstellen des auf der Platte gebundenen Estradiolantikörpers konkurriert. Die Menge des gebundenen HRP-markierten Estradiols wurde über die Messung der Enzymaktivität der HRP bestimmt, deren Substratverbrauch anhand eines Farbumschlags photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden konnte.

2.6 Statistik

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 6.0 durchgeführt. Kontinuierliche Daten wurden zunächst mit dem D'Agostino and Pearson omnibus normality test auf Gaußsche Normalverteilung geprüft, bei kleinen Stichprobengrößen wurde der Shapiro-Wilk normality test verwendet. Bei Normalverteilung wurde entweder der ungepaarte Student's t-test für Zwei-Gruppenvergleiche oder eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) mit Sidak's post hoc Test für multiple Gruppenvergleiche verwendet. Für nicht normalverteilte kontinuierliche Daten und nicht kontinuierliche Daten (neuropathologische Schädensevaluierung, Abbildung 3-6) wurden der Mann-Whitney-Test (2 Gruppenvergleich) oder der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test (multiple Gruppenvergleiche) angewandt. Für ausgewählte Datensätze wurden Korrelationsanalysen nach Pearson (für normalverteilte Daten) oder Spearman (für nicht normalverteilte Daten) durchgeführt und der entsprechende Korrelationsquotient ermittelt. Bei allen Analysen wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Die Werte sind, soweit nicht anders beschrieben, als Box-Plot-Diagramme mit individuellen Datenpunkten, Median und 25% und 75% Perzentilen dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Räumlich zeitliche Regulation der Infiltration regulatorischer T-Zellen in das neonatale hypoxisch-ischämische Gehirn

3.1.1 Hypoxie-Ischämie resultiert in einer biphasischen selektiven Infiltration regulatorischer T-Zellen in das geschädigte Gehirn

Trotz zahlreicher Belege für eine zerebrale Treg-Infiltration infolge einer ischämischen Hirnschädigung in adulten Modellen (Liesz & Kleinschnitz, 2016) ist dies vor allem in Hinblick auf die räumliche Verteilung und den zeitlichen Verlauf für die neonatale Hirnschädigung bislang ungeklärt. Die Infiltration der Tregs wurde immunhistochemisch anhand von eGFP/CD45 und eGFP/NeuN Ko-Färbungen in Gewebeschnitten der Striatum- und der Hippocampus-Ebene analysiert. Zunächst erfolgte die Analyse der Treg-Infiltration in der gesamten Hemisphäre (Abbildung 3-1). Auf Höhe des Hippocampus infiltrierten Tregs das Gewebe in einem biphasischen Verlauf: Nach einer signifikanten Reduktion der Zellzahl von Tag 1 zu Tag 3, an dem kaum Zellen detektiert wurden, folgte ein signifikanter Wiederanstieg bis zu Tag 7 (Abbildung 3-1 A, B). Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde auch in der Region des Striatum registriert (Abbildung 3-1 C). Inwiefern diese zeitliche Regulation spezifisch für Tregs war oder aus einer Regulation der Infiltration aller Leukozyten resultierte, wurde zusätzlich über die Ko-Färbung mit CD45 analysiert.

Interessanterweise wich die zeitliche Entwicklung der Leukozyten-Zellzahl in der geschädigten ipsilateralen Hemisphäre sowohl in der Hippocampus- als auch in der Striatumebene vom biphasischen Treg-Infiltrationsmuster ab (Abbildung 3-1 B, C). So kam es in der Hippocampusebene mit akutem Anstieg einen Tag nach HI im weiteren Zeitverlauf zu einer anhaltenden Abnahme der Zellzahl ohne Wiederanstieg an Tag 7, wie er für Tregs beobachtet worden war (Abbildung 3-1 B). In der Striatumebene wurde im Vergleich zu Tregs sogar ein umgekehrter Verlauf der Leukozyten mit einer maximalen Anzahl an Tag 3 nach HI beobachtet (Abbildung 3-1 C). Regulatorische T-Zellen scheinen dementsprechend unabhängig von der Stärke der allgemeinen Leukozyten-Infiltration und somit zumindest zu bestimmten Zeitpunkten selektiv in das hypoxisch-ischämische Gehirn einzuwandern. Daneben kann festgestellt werden, dass auf Höhe der Striatumebene deutlich weniger eGFP⁺-Zellen als in der Hippocampusebene einwandern. Im Mittel infiltrierten an Tag 1 und 7 sechsmal mehr Tregs in die Hippocampusebene verglichen mit der Striatumebene. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Infiltration von Tregs regionspezifisch stattfindet. An Tag 3 finden sich in beiden Ebenen kaum Zellen.

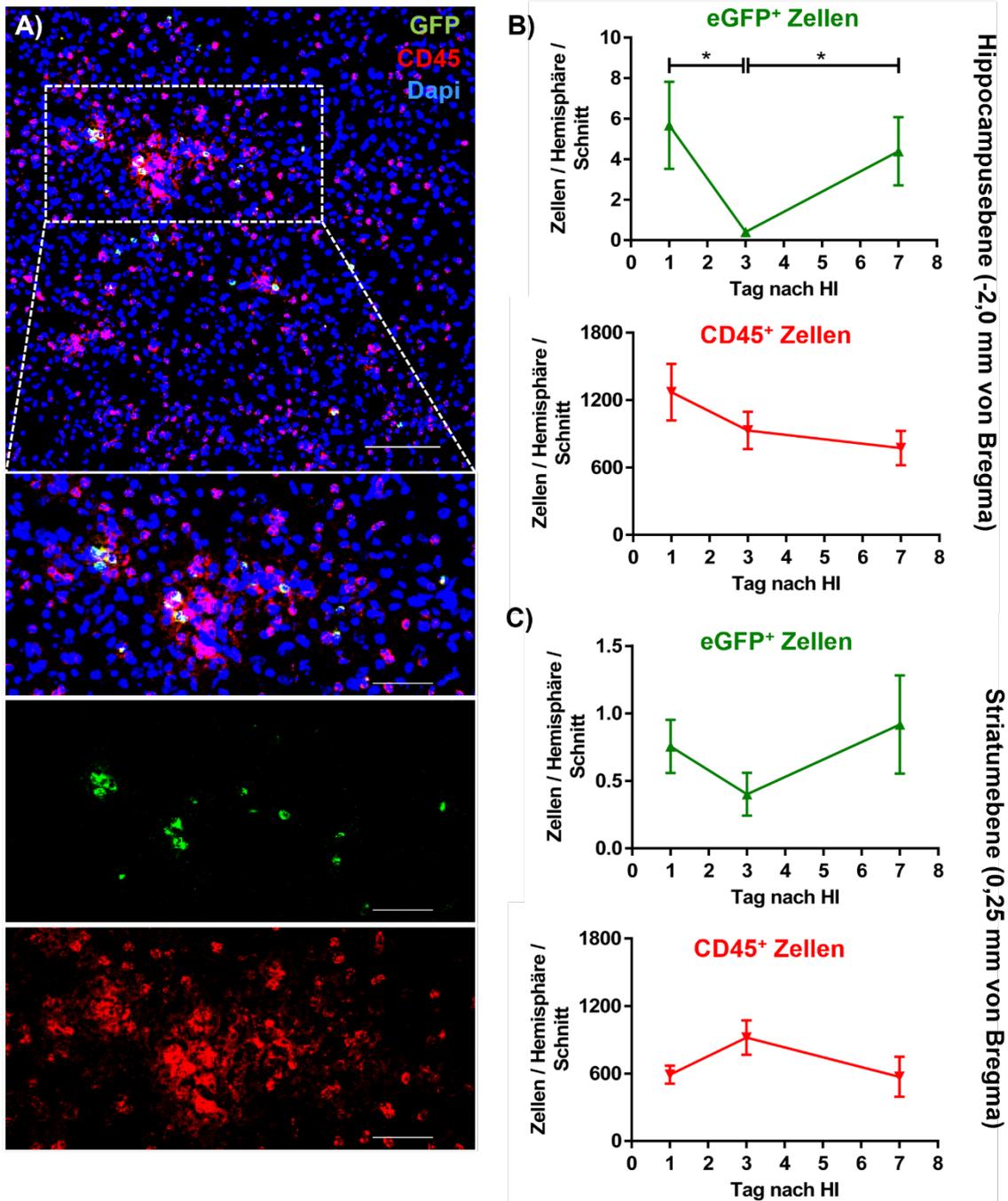


Abbildung 3-1 Biphase selektive Infiltration regulatorischer T-Zellen in das neonatale hypoxisch-ischämische Gehirn

Neun Tage alte DEREK-Mäuse wurden einer HI-Behandlung ausgesetzt und einen, drei oder sieben Tage später das Gehirngewebe auf Infiltration von eGFP⁺-Tregs und CD45⁺-Leukozyten in eGFP/CD45 ko-gefärbten Gewebeschnitten analysiert (A). Repräsentative Aufnahmen in (A) entstammen der Thalamusregion einen Tag nach HI. Die drei unteren Bilder in (A) stellen Aufnahmen höherer Vergrößerung aus dem im darüber liegenden Bild umrandeten Viereck dar (Maßstabsbalken oben: 100 µm, unten: 50 µm). Die Anzahl der Tregs und aller Leukozyten wurde auf dem Level des Hippocampus (B) und des Striatum (C) in der gesamten Hemisphäre bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes. n = 15 (d1), n = 10 (d3), n = 10 (d7) Tiere. *p<0,05

3.1.2 Regulatorische T-Zellen infiltrieren insbesondere in stark geschädigte Regionen des neonatalen hypoxisch-ischämischen Gehirns

Die vorherige Analyse legte bereits eine regional unterschiedliche Infiltration der Tregs nahe. Daher wurde in einem nächsten Schritt eine detaillierte Analyse für die unterschiedlichen Hirnregionen vorgenommen. Inwiefern dies mit der regional unterschiedlichen Ausprägung der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung assoziiert war, wurde über eine NeuN/eGFP Ko-Färbung ermittelt. Als weiterer Parameter für den hypoxisch-ischämischen Gewebeschaden diente die Ausprägung der Ödembildung bzw. Gewebeatrophie in Kresylviolett-gefärbten Schnitten.

Die regionale Analyse der zerebralen Treg-Infiltration belegte signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der analysierten Hirnregion. So wurden zu allen drei Zeitpunkten im Bereich des Cortex nur vereinzelt eGFP⁺-Zellen gefunden, während im Hippocampus und Striatum eine signifikant stärkere Infiltration zu beobachten war. So waren 40%, 60% und 75% aller Tregs an Tag 1, 3, und 7 im Hippocampus vorzufinden. Im Striatum wurden 10%, 40% und 20% aller Tregs detektiert (Abbildung 3-2 A). Auch im Bereich des Thalamus war vor allem einen Tag nach HI ein nicht unerheblicher Anteil (circa 40%) an Tregs lokalisiert (Abbildung 3-2 A). An Tag 3 und 7 nach HI war der prozentuale Anteil an Tregs von allen Tregs der Hemisphäre in dieser Region jedoch gering (Abbildung 3-2 A).

Sowohl die Analyse der neuronalen Dichte (Abbildung 3-2 B) als auch der subakuten Gewebeatrophie bzw. akuten Volumenvergrößerung infolge von Ödembildung (Abbildung 3-2 C) belegte, dass insbesondere die Region des Hippocampus das höchste Schadensmaß aufweist. Hier wurde im Vergleich zum Cortex und Thalamus zu allen Zeitpunkten eine signifikant geringere neuronale Dichte nachgewiesen (Abbildung 3-2 B). Daneben wurde einen Tag nach HI eine deutliche Ödembildung mit einer Volumenzunahme beobachtet, was in einem signifikanten Unterschied zu den anderen betrachteten Regionen resultierte. Darüber hinaus wurde im Hippocampus eine signifikant erhöhte Atrophie an Tag 3 und 7 im Vergleich zum Cortex und Thalamus detektiert (Abbildung 3-2 C). Die zweitstärkste betroffene Region stellte das Striatum dar. Sowohl die neuronale Zelldichte als auch das Gewebenvolumen (Tag 3 und 7) waren im Vergleich zum Cortex und Thalamus deutlich vermindert (Abbildung 3-2 B, C). Obgleich auch der Thalamus an Tag 1 eine geringere neuronale Dichte im Vergleich zum Cortex aufwies, fiel der neuronale Zellverlust jedoch im Vergleich zu Striatum und Hippocampus vor allem zu späteren Zeitpunkten deutlich geringer aus (Abbildung 3-2 B). Der Cortex wies insgesamt nur einen geringen Schaden in Folge der HI auf, hier zeigten sich an allen Zeitpunkten nur geringfügige Unterschiede zwischen der ipsi- und contralateralen Seite.

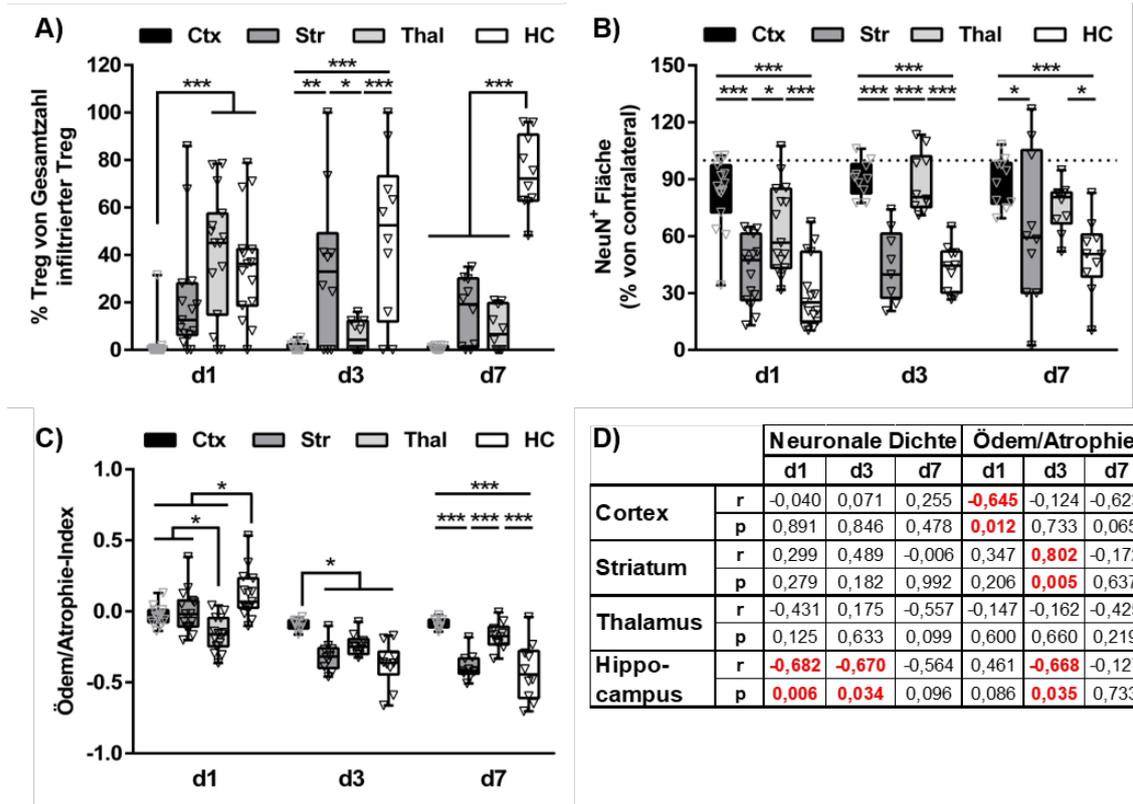


Abbildung 3-2 Regulatorische T-Zellen infiltrieren insbesondere in Gehirnregionen, die in Folge einer Hypoxie-Ischämie einen starken Schaden aufweisen

Neun Tage alte DEREG-Mäuse wurden einer HI-Behandlung ausgesetzt. Am ersten, dritten und siebten Tag nach Schädigung wurde das Gehirngewebe der Tiere histologisch und immunhistochemisch untersucht. Es wurden eGFP/NeuN Ko-Färbungen von Schnitten auf Höhe der Striatum- und Hippocampus-Ebene erstellt und anschließend die Anzahl an eGFP⁺-Tregs pro Region quantifiziert (A). Dargestellt ist der prozentuale Anteil eGFP⁺-Zellen pro Region aus der Summe der Treg-Zahl aller analysierten Regionen (Cortex, Striatum, Hippocampus, Thalamus). Regionale Zellzahlen wurden zuvor auf die in Kresylviolett-gefärbten ermittelten Regionsflächen normiert, um für den Störfaktor der sich über die Zeit ausbildenden Gewebeatrophie zu korrigieren (A). Die Quantifizierung der neuronalen Dichte erfolgte ebenfalls unabhängig von der Gewebeatrophie in einer ROI-basierten Analyse anhand von mikroskopischen Aufnahmen. Die neuronale Fläche der einzelnen Regionen der ipsilateralen Seite wurde im Verhältnis zur contralateralen Seite bestimmt (B). Anhand Kresylviolett-gefärbter Schnitte wurde der Atrophie/Ödem-Index ((Vol_{ipsi} / Vol_{contra})-1) bestimmt, sodass Werte <0 eine Volumenabnahme und >0 eine -zunahme darstellen (C). Für die dargestellten Parameter in (A)-(C) wurden Korrelationsanalysen nach Pearson (parametrische Daten) oder Spearman (nicht parametrische Daten) durchgeführt und die entsprechenden Korrelationskoeffizienten (r) und die p-Werte für die einzelnen Regionen und Zeitpunkte zusammengefasst (D). n = 15 (d1), n = 10 (d3), n = 10 (d7) Tiere. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Aus den oben genannten Beobachtungen lässt sich schließen, dass regulatorische T-Zellen insbesondere in Regionen einwandern, die in Folge einer HI einen starken Schaden aufweisen. Zudem unterschied sich die räumliche Verteilung der Tregs deutlich zwischen den Zeitpunkten. Dies zeigt sich zum Beispiel im Thalamus, in dem an Tag 1 mit ca. 40% der höchste Anteil von allen Tregs zu finden war, jedoch im Verlauf eine Abnahme auf ca. 10% an Tag 7 zu beobachten war. Umgekehrt verhielt es sich hingegen im Hippocampus. Hier

wurde eine Zunahme des prozentualen Anteils im Hippocampus von ca. 40% an Tag 1 auf ca. 75% an Tag 7 beobachtet. Die neuronale Dichte nimmt nahezu in allen analysierten Regionen von Tag 1 zu Tag 7 zu, was auf eine subakut einsetzende kompensatorische Neurogenese zurückzuführen sein könnte (Abbildung 3-2 B). Im Thalamus zeigt sich bereits früh von Tag 1 zu Tag 3 ein Anstieg der NeuN⁺-Fläche, wohingegen die Erhöhung der neuronalen Dichte im Hippocampus und Striatum erst verspätet stattfand bzw. nicht so stark ausgeprägt war. Die Analysen zum Gewebeverlust ergaben, dass es erst im Verlauf zu einer maximalen Ausprägung der Gewebeatrophie vor allem im Hippocampus und Striatum kommt (Abbildung 3-2 C).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die frühe Zunahme der neuronalen Dichte im Thalamus mit dem initial höchsten Anteil an Tregs und gleichzeitig die verzögert einsetzende Zunahme an Neuronen im Hippocampus mit einer über die Zeit zunehmenden Infiltration von Tregs assoziiert war. Diese ging jedoch auch mit der sekundär einsetzenden Ausbildung der HI-assoziierten Gewebeatrophie einher, sodass Tregs zum einen an der Förderung endogen einsetzender Regenerationsprozesse (z.B. Neurogenese) und zum anderen an sekundär einsetzenden Schadensprozessen beteiligt sein könnten. Dies wird auch in Korrelationsanalysen deutlich. Hier zeigte sich einerseits für den Hippocampus eine signifikant inverse Korrelation zwischen der neuronalen Dichte und der Treg-Anzahl, d.h. eine erhöhte Treg-Anzahl war in dieser Region akut mit einer geringeren neuronalen Dichte assoziiert (Abbildung 3-2 D). In ähnlicher Weise wurde für Tag 3 im Hippocampus eine inverse Korrelation zwischen dem Ödem/Atrophie-Index und der Treg-Anzahl detektiert, das heißt die gerade ab Tag 3 offensichtlich werdende Gewebeatrophie des Hippocampus war mit einer erhöhten Treg-Anzahl assoziiert. Demgegenüber steht jedoch die signifikant positive Korrelation zwischen dem Ödem/Atrophie-Index und der Treg-Anzahl an Tag 3 im Striatum, d.h. Tiere mit geringer ausgeprägter Atrophie wiesen eine erhöhte Treg-Anzahl auf. Dies ist insofern interessant, als dass das Striatum in direkter Nähe zur subventrikulären Zone, einer wesentlichen Region der Neurogenese (Plane et al., 2004) liegt.

3.1.3 Weibliche Tregs infiltrieren stärker in das HI-geschädigte Hirngewebe vor allem in Bereichen starker Hirnschädigung

Basierend auf der zuvor ermittelten Infiltrationskinetik der Tregs (Abbildung 3-1) lag der weitere Fokus in dieser Arbeit auf dem ersten Infiltrationspeak 24 Stunden nach HI. Vor dem Hintergrund klinischer und experimenteller Studien zu geschlechtsspezifischen Unterschieden bezüglich des Schadensausmaßes und neuroinflammatorischer Reaktionen infolge einer HI (Charriaut-Marlangue et al., 2017; Mirza et al., 2015; Waddell et al., 2016) wurde die akute Treg-Infiltration in einer nach Geschlecht stratifizierten Analyse detaillierter

untersucht. Dazu wurde die initiale Analyse (Abbildung 3-1 und 3-2) um zusätzliche Tiere erweitert. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben eine signifikant höhere Anzahl an Tregs im geschädigten Hirngewebe weiblicher Jungtiere im Vergleich zu männlichen Tieren (Abbildung 3-3), wobei dieser Effekt vor allem auf der Ebene des Hippocampus, der am stärksten geschädigten Region, sichtbar wurde (Abbildung 3-3 A).

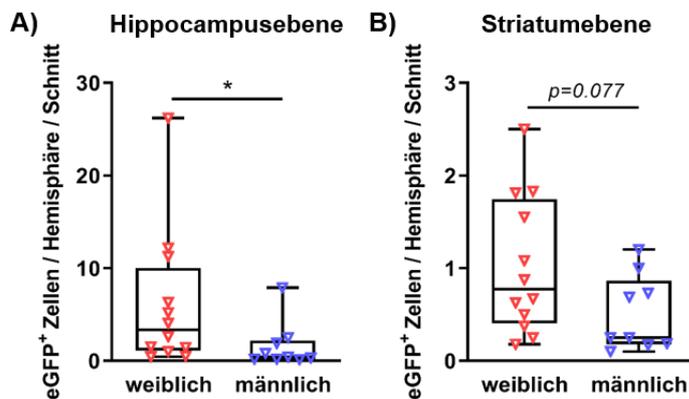


Abbildung 3-3 Weibliche Tregs infiltrieren vermehrt in das neonatale hypoxisch-ischämische Gehirn

24 Stunden nach HI wurde die Infiltration von regulatorischen T-Zellen auf Ebene des Hippocampus (-2,0 mm von Bregma, **A**) und Striatum (0,25 mm von Bregma, **B**) immunhistochemisch in eGFP/CD45 Ko-Färbungen quantifiziert n = 12 (weiblich), n = 9 (männlich), *p<0,05

3.2 Validierung des DEREK-Mausmodells zur Depletion regulatorischer T-Zellen in neonatalen Mäusen

3.2.1 Die intraperitoneale Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin resultiert in einer effizienten Depletion regulatorischer T-Zellen unabhängig vom Geschlecht

Die funktionelle Rolle regulatorischer T-Zellen in der HI-induzierten Hirnschädigung in Abhängigkeit vom Geschlecht sollte im Folgenden unter Verwendung des DEREK-Mausmodells, das neben der Lokalisation der Tregs auch deren zeitspezifische Depletion ermöglicht, untersucht werden. Die Depletion der Tregs erfolgte über die intraperitoneale Applikation von Diphtherietoxin (DTX). Basierend auf Studien der kooperierenden Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie (Prof. W. Hansen, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen), die eine Dosis von 30 ng/g Körpergewicht alle 48 Stunden zur effizienten Depletion vorgeschlagen haben (Abel et al., 2012), wurde zunächst überprüft, inwiefern dieses Applikationsprotokoll auch in neonatalen Mäusen anwendbar ist. Da der Fokus dieser Arbeit die Rolle der früh infiltrierten Tregs war, erfolgte die erste Gabe des DTX an P8 (einen Tag vor HI). Inwiefern eine effiziente Depletion in neonatalen HI-geschädigten Mäusen gegeben ist, wurde einen Tag nach HI (48 Stunden nach DTX-Gabe) durchflusszytometrisch in Blutproben, Milzen und Gehirngewebe untersucht. Diese Analysen ergaben eine signifikante Reduktion zirkulierender Tregs (Abbildung 3-4 A). Auch in der Milz wurden signifikant geringe Mengen an Tregs in DTX-behandelten Jungtieren nachgewiesen (Abbildung 3-4 B). Weder in PBS-behandelten Kontrollgruppen noch in Treg-depletierten Mäusen

wurden Geschlechtsunterschiede in Blut und Milz detektiert (Abbildung 3-4 A, B). Interessanterweise wurde im HI-geschädigten Hirngewebe jedoch eine signifikant reduzierte Anzahl an Tregs in männlichen PBS-Kontrolltieren im Vergleich zu weiblichen Jungtieren verzeichnet (Abbildung 3-4 C), womit die vorigen immunhistochemischen Analysen (Abbildung 3-3) bestätigt werden konnten. Die Treg-Depletion mittels DTX bewirkte in beiden Geschlechtern eine ähnlich starke Reduktion infiltrierter Tregs (Abbildung 3-4 C).

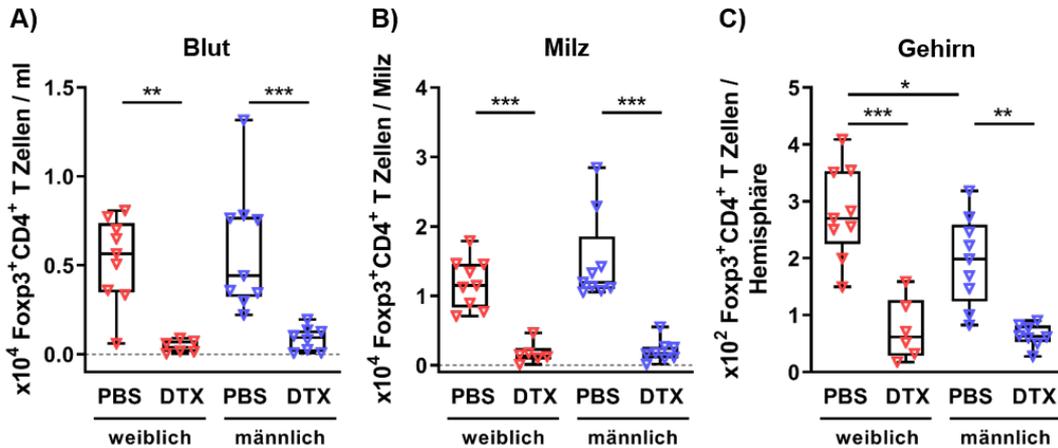


Abbildung 3-4 Die Applikation von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin führt unabhängig vom Geschlecht zu einer signifikanten Reduktion von CD4⁺Foxp3⁺-regulatorischen T-Zellen

Am achten postnatalen Tag erhielten DEREK-Mäuse eine i.p. Injektion von 30 ng/g Körpergewicht DTX. Kontrolltieren wurde PBS injiziert. 48 Stunden später wurden Zellsuspensionen aus Blutproben (A), Milzen (B) und Gehirngewebe (C) aus Tieren gewonnen, die 24 Stunden zuvor an P9 einer HI unterzogen wurden. Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurde die Anzahl an Foxp3⁺CD4⁺-Tregs quantifiziert. n = 9 (weiblich PBS), n = 6 (weiblich DTX), n = 9 (männlich PBS), n = 8 (männlich DTX) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

3.2.2 Die zweimalige Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin in neonatalen Mäusen führt nicht zu langfristigen Autoimmunitätsreaktionen

Für den hier verwendeten Mausstamm wurde zuvor beschrieben, dass eine anhaltende Depletion neonataler Tregs zu späteren lymphoproliferativen Autoimmunreaktionen führen kann, die sich unter anderem in Hyperplasie von Milz und Lymphknoten sowie inflammatorischer Infiltration in verschiedenen Organen äußert (Lahl et al., 2007). Darüber hinaus wurden Gewichtsabnahmen infolge einer anhaltenden neonatalen Treg-Depletion, die die Entwicklung der Tiere beeinträchtigen könnte, beobachtet (Yang et al., 2015). Um die beschriebenen Veränderungen als mögliche Störgrößen für die Verwendung des transgenen Mausmodells zur Untersuchung neonatal induzierter Hirnschädigung auszuschließen, wurden Treg-depletierte Tiere hinsichtlich ihrer Gewichtsentwicklung und der möglichen Ausbildung von Autoimmunreaktionen untersucht. Um während des akuten Infiltrationspeak der Tregs 24 Stunden nach HI eine effiziente Depletion bis drei Tage nach HI aufrecht zu erhalten, war für alle späteren Untersuchungen hinsichtlich der Analyse des Schadensmaßes und

neuroinflammatorischer Reaktionen eine zweite DTX-Injektion 24 Stunden nach HI geplant. Daher wurde der Einfluss einer zweimaligen DTX-Gabe an P8 und P10 auf mögliche lymphoproliferative Veränderungen in Lymphknoten und Milzen von sechs Wochen alten Tieren analysiert (Abbildung 3-5 A, B). Darüber hinaus wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte von Lunge, Leber, Pankreas und Haut histologisch auf Zeichen autoimmuner Veränderungen untersucht (Abbildung 3-5 C). Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die zu gleichen Zeitpunkten PBS-Injektionen erhielten.

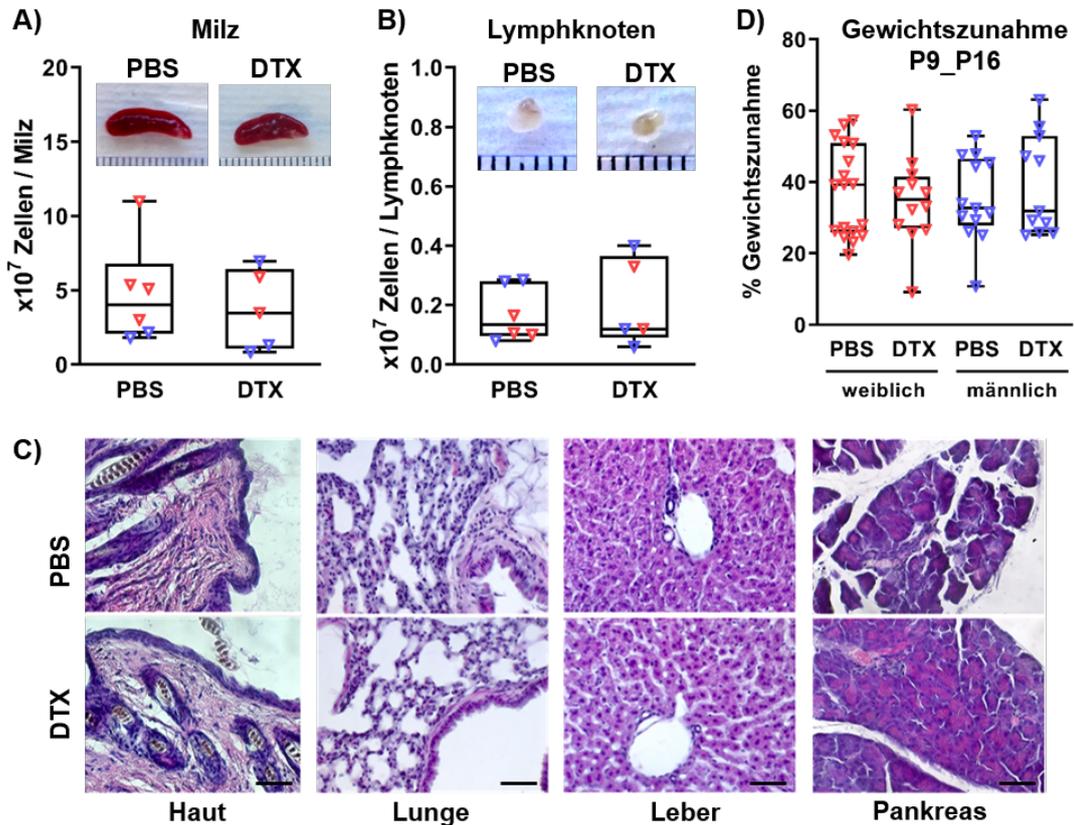


Abbildung 3-5 Die neonatale zweimalige Applikation von Diphtherietoxin hat kein lymphoproliferatives Autoimmunitätssyndrom zur Folge

DEREG-Mäuse erhielten am achten und zehnten postnatalen Tag eine intraperitoneale Injektion von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin zur Depletion regulatorischer T-Zellen. Tiere der Kontrollgruppe wurden mit PBS behandelt. Um zu überprüfen, ob es infolgedessen zu einem lymphoproliferativen Autoimmunitätssyndrom kommt, wurden die Tiere im frühen Erwachsenenalter (6 Wochen) hinsichtlich einer möglichen Hyperplasie in Milzen (**A**) und Lymphknoten (**B**) untersucht. Dargestellt sind neben exemplarischen Fotos der Organe die absoluten Zellzahlen von Milzen (**A**) und Lymphknoten (**B**). Daneben wurden verschiedene Organe histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf Zeichen einer Autoimmunität untersucht (**C**). Es sind beispielhafte Aufnahmen Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitte von Haut, Lunge, Leber und Pankreas dargestellt. Um mögliche Einflüsse der Treg-Depletion auf die Gewichtsentwicklung zu untersuchen, wurde die Gewichtszunahme in einer retrospektiven Analyse aller HI-Tiere dieser Studie mit dem Überlebenszeitpunkt sieben Tage nach HI ermittelt. $n = 6$ (PBS), $n = 5$ (DTX) in (**A-C**), rote und blaue Symbole in (**A, B**) stellen Werte von weiblichen bzw. männlichen Tieren dar, $n = 11-18$ / Gruppe in (**D**).

Die zweimalige neonatale DTX-Applikation führte weder zu einer signifikanten Veränderung der Zellzahl in Milz und Lymphknoten noch zu Unterschieden in der Größe beider Organe (Abbildung 3-5 A, B), so dass das hier verwendete Depletionsschema keine langfristige Hyperplasie lymphatischer Organe bewirkte. Hautproben der DTX-behandelten Mäuse wiesen im Gegensatz zu den von Lahl et al. beschriebenen Veränderungen eine unauffällige Schichtung auf, eine epidermale Hyperplasie konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 3-5 C). Außerdem waren in den angeschnittenen Geweben keine Lymphozyten-Infiltrate vorhanden. In Schnitten von Lungen-Präparaten der DTX-Gruppe wurde normales Lungengewebe mit dünnen, regelmäßigen Alveolarwänden ohne Hinweis auf peribronchiale oder perivaskuläre Infiltrate beobachtet (Abbildung 3-5 C). Die von Lahl et al. beschriebene Immunzellinfiltration und dadurch folgende Destruktion der Pankreas-Azini (Lahl et al., 2007), wurde in dem hier verwendeten kurzzeitigen Applikationsschema nicht beobachtet (Abbildung 3-5 C). Die retrospektive Analyse der Gewichtsentwicklung aller Treg-depletierten Tiere dieser Arbeit mit Überlebenszeitpunkt sieben Tage nach HI (P16) wies ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 3-5 D). Diese Untersuchungen zeigten, dass sich das hier angewendete experimentelle Modell mit kurzzeitiger Treg-Depletion in der Neonatalphase eignet, um die funktionelle Rolle der Tregs genauer zu untersuchen.

3.3 Einfluss der akuten Depletion regulatorischer T-Zellen auf die strukturelle und zelluläre Hirnschädigung nach neonataler Hypoxie-Ischämie

3.3.1 Die Auswirkung der regulatorischen T-Zell-Depletion auf HI-induzierte neuropathologische Veränderungen ist geschlechtsabhängig

Über das zuvor erläuterte Behandlungsschema (DTX-Injektion an P8 und P10) wurden Tregs während und kurz nach HI depletiert, um die Auswirkungen der akuten Intervention auf konsekutive bis in die subakute Phase anhaltende Schädigungsprozesse zu beurteilen. Daher erfolgte die Gewebeanalyse 7 Tage nach HI in 16 Tage alten Tieren. Darüber hinaus können strukturelle Veränderungen zu diesem Zeitpunkt sehr gut beurteilt werden (Reinboth et al., 2016). Dazu wurde zunächst eine neuropathologische Beurteilung in Kresylviolett-gefärbten Schnitten vorgenommen.

Männliche Mäuse der PBS-Kontrollgruppe zeigten im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren eine signifikant stärkere Schädigung (Abbildung 3-6 A, B). Während die Treg-Depletion bei weiblichen Tieren zu einer signifikanten Verstärkung neuropathologischer Veränderungen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe führte, resultierte sie bei Männchen in einer signifikanten Reduktion des Schadens (Abbildung 3-6 A, B). Eine detaillierte Analyse spezifischer Hirnregionen ergab eine signifikant erhöhte Schädigung in PBS-behandelten Männchen im

Vergleich zu Weibchen im Cortex, Thalamus und Hippocampus (Abbildung 3-6 C). Die Depletion der Tregs resultierte in einer Abnahme der Schädigung in Männchen, während weibliche Tiere eine erhöhte Schädigung nach Treg-Depletion in diesen Regionen zeigten (Abbildung 3-6 C). Auch im Striatum wurde eine tendenziell erhöhte Schädigung in PBS-Tieren der Männchen im Vergleich zu Kontrolltieren der Weibchen und eine reduzierte Schädigung nach Treg-Depletion in männlichen Mäusen detektiert (Abbildung 3-6 C).

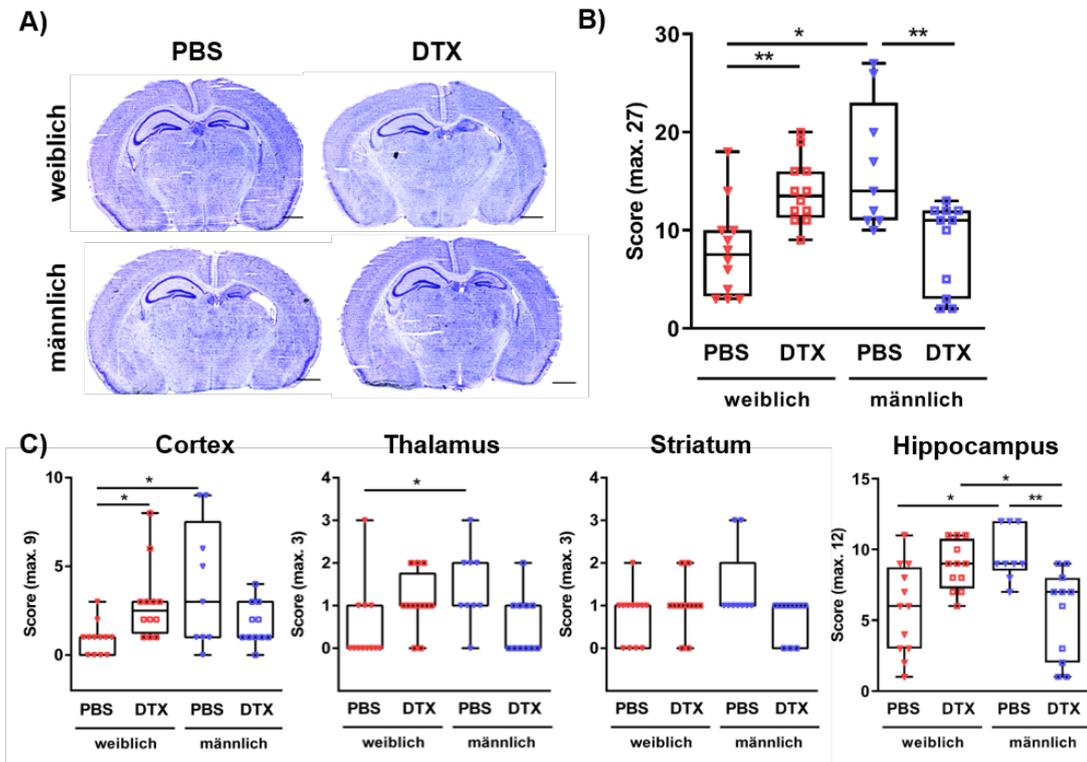


Abbildung 3-6 Die Auswirkung der Treg-Depletion auf neuropathologische Veränderungen an Tag 7 nach Hypoxie-Ischämie ist geschlechtsabhängig

Neun Tage alte DEREG-Mäuse wurden einer Hypoxie-Ischämie-Behandlung unterzogen. Die Depletion regulatorischer T-Zellen erfolgte über i.p. Injektion von 30 ng/g Körpergewicht DTX 24 Stunden vor und nach HI, Kontrolltieren wurde PBS injiziert. Das Ausmaß der Gewebeschädigung wurde über eine neuropathologische Beurteilung anhand von Kresylviolett-gefärbten Gewebeschnitten sieben Tage nach HI analysiert (**A**, Maßstabsbalken: 1 mm). Es erfolgte sowohl ein Vergleich der errechneten Gesamtpunktzahl aller Regionen (**B**) als auch regionaler Gesamtpunktzahlen des Cortex, Thalamus, Striatum und Hippocampus (**C**). n = 12 (PBS weiblich), n = 12 (DTX weiblich), n = 9 (PBS männlich), n = 11 (DTX männlich) *p < 0,05, **p < 0,01

3.3.2 Eine Treg-Depletion hat eine gegenteilige Wirkung auf den HI-induzierten neuronalen Zellverlust in Männchen und Weibchen

Um den detektierten geschlechtsspezifischen Effekt regulatorischer T-Zellen auf den hypoxisch-ischämischen Gewebeschaden auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde die neuronale und oligodendrozytäre Zelldichte immunhistochemisch analysiert. Die Untersu-

chungen zur neuronalen Dichte haben die zuvor ermittelten geschlechtsspezifischen Effekte einer Hypoxie-Ischämie und einer Treg-Depletion vor allem im Hippocampus, der Region, die durch HI den stärksten neuronalen Zellverlust erleidet (Abbildung 3-2 B), bestätigt. Hier wiesen weibliche Tiere der PBS-Gruppe eine signifikant höhere neuronale Dichte im Vergleich zu männlichen Jungtieren auf (Abbildung 3-7 A, B). Die Depletion regulatorischer T-Zellen führte im Hippocampus bei weiblichen Tieren zu einer signifikanten Reduktion der neuronalen Dichte, wohingegen bei männlichen Mäusen ein gegenteiliger Effekt, nämlich eine signifikante Zunahme, festzustellen war (Abbildung 3-7 B). Im Cortex, Striatum und Thalamus waren weder durch das Geschlecht noch durch die Treg-Depletion Veränderungen in der neuronalen Dichte zu beobachten (Abbildung 3-7 C). Um auszuschließen, dass eine Treg-Depletion unabhängig von einer HI möglicherweise Einfluss auf die neuronale Dichte hat, wurden scheinoperierte Tiere untersucht, wobei sich diese Analysen auf die durch HI am stärksten betroffene Region, den Hippocampus, beschränkten. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in Abhängigkeit vom Geschlecht oder einer Treg-Depletion (Abbildung 3-7 B).

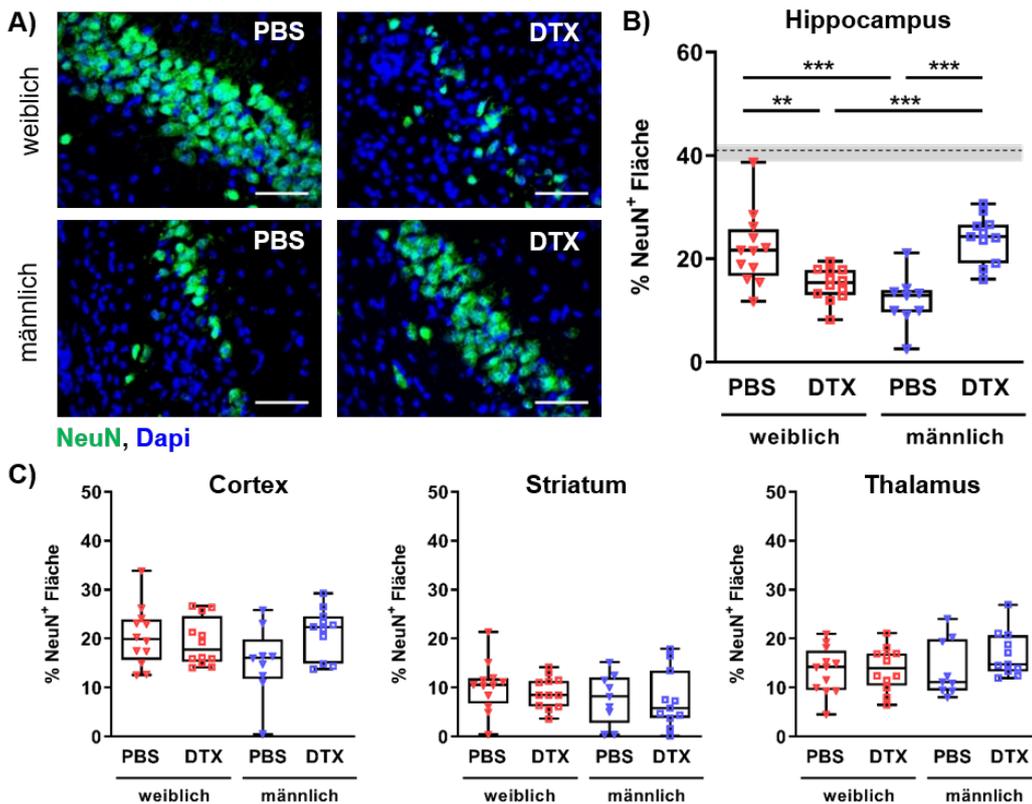


Abbildung 3-7 Der Effekt einer Treg-Depletion auf den HI-induzierten neuronalen Zellverlust ist abhängig von Geschlecht und Region

Am neunten postnatalen Tag wurden DEREK-Mäuse einer HI-Behandlung oder Scheinoperation ausgesetzt. Tregs wurden mittels zweimaliger DTX-Injektion (30 ng/g Körpergewicht, i.p.) an Tag 8 und 10 depletiert, bei Kontrolltieren erfolgte eine Injektion mit PBS. Anhand von immunhistochemischen Färbungen für den neuronalen Marker NeuN (A) wurde die neuronale Dichte im Hippocampus (B) sowie im Cortex, Striatum und Thalamus

(C) über die Ermittlung der NeuN⁺-Fläche in der ipsilateralen Hemisphäre bestimmt. In (A) sind beispielhafte Aufnahmen NeuN-gefärbter Schnitte im Bereich des *Cornu ammonis* (CA1) des Hippocampus dargestellt (Maßstabsbalken: 50 µm). Die in (B) dargestellte gestrichelte Linie und der graue Balken stellen die Median- und Interquartil-Werte scheinoperierter Tiere aller Gruppen dar (n = 8 / Gruppe). n = 12 (PBS weiblich), n = 12 (DTX weiblich), n = 9 (PBS männlich), n = 11 (DTX männlich). **p<0,01; ***p<0,001

Reinboth et al. haben gezeigt, dass ein neuronaler Zellverlust nach Hypoxie-Ischämie mit einer Proliferation von Oligodendrozyten in geschädigten Regionen einhergeht (Reinboth et al., 2016). Um die Dichte an Oligodendrozyten zu untersuchen, wurden daher immunhistochemische Färbungen für den Pan-Oligodendrozytenmarker Olig2 analysiert. Um auch für diese Analysen auszuschließen, dass eine Treg-Depletion unabhängig von einer HI möglicherweise Einfluss auf die Oligodendrozytendichte hat, wurden zusätzlich scheinoperierte Tiere untersucht, wobei sich auch diese Analysen auf die durch HI am stärksten betroffene Region, den Hippocampus beschränkten.

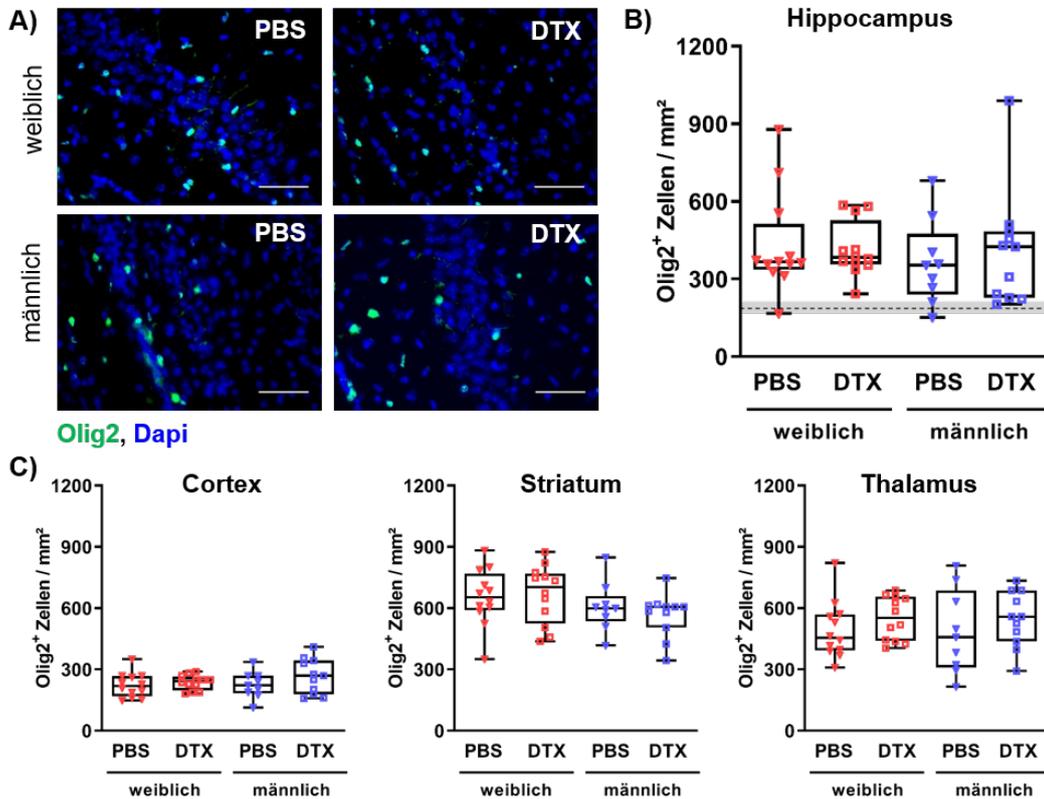


Abbildung 3-8 Eine Treg-Depletion hat keinen Einfluss auf die HI-induzierte Oligodendrozytenzunahme

Am neunten postnatalen Tag wurden DEREK-Mäuse einer HI-Behandlung ausgesetzt. Zusätzlich wurden Tregs mittels zweimaliger DTX-Injektion (30 ng/g Körpergewicht, i.p.) an Tag 8 und 10 depletiert, Kontrolltiere erhielten eine Injektion mit PBS. Sieben Tage nach HI wurde die Oligodendrozytendichte in Gewebeschnitten für den Pan-Oligodendrozytenmarker Olig2 analysiert (A). Die Anzahl Olig2⁺Dapi⁺-Zellen wurde im Hippocampus (B), Cortex, Striatum und Thalamus analysiert (C). In (A) sind exemplarische Aufnahmen Olig2-gefärbter Schnitte im Bereich des *Cornu ammonis* (CA1) des Hippocampus dargestellt (Maßstabsbalken: 50 µm). Die in

(B) dargestellte gestrichelte Linie und der graue Balken stellen die Median- und Interquartil-Werte scheinoperierter Tiere aller Gruppen dar (n = 8 / Gruppe). n = 12 (PBS weiblich), n = 12 (DTX weiblich), n = 9 (PBS männlich), n = 11 (DTX männlich)

Es wurden keine Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen in scheinoperierten Tieren detektiert (Abbildung 3-8 B). In HI-geschädigten Tieren hingegen wurde in Einklang mit zuvor beschriebenen Beobachtungen (Herz et al., 2018b; Reinboth et al., 2016) im Hippocampus mit hohem neuronalen Zelluntergang eine erhöhte Menge an Olig2⁺-Zellen detektiert (Abbildung 3-8 A, B). Im Gegensatz zu den Beobachtungen zum neuronalen Zellverlust hatte jedoch weder das Geschlecht noch die Treg-Depletion einen wesentlichen Effekt auf die Oligodendrozytenanzahl in allen untersuchten Regionen HI-geschädigter Tiere (Abbildung 3-8 C).

Zusammenfassend wurden sowohl für den strukturellen als auch den zellulären neuronalen Schaden infolge einer HI geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen Tieren mit und ohne regulatorische T-Zellen nachgewiesen: Zum einen scheint der Gewebeschaden in männlichen Tieren in Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen stärker ausgeprägt zu sein als in weiblichen Tieren. Diese Verteilung kehrt sich jedoch nach Treg-Depletion um. In Weibchen führt die DTX-Injektion in stark geschädigten Regionen zu einer Zunahme des Schadens, wohingegen bei männlichen Tieren protektive Effekte auf das Schadensausmaß detektiert wurden. Diese Ergebnisse deuten auf eine schützende Rolle der Tregs im weiblichen Geschlecht hin, während eine schädigende Rolle für männliche Tregs angenommen werden kann.

3.4 Auswirkungen einer Treg-Depletion auf HI-induzierte neuroinflammatorische Reaktionen und vaskuläre Schädigung

Um mögliche Effektormechanismen und Zielzellen der Tregs in Abhängigkeit vom Geschlecht zu identifizieren, wurden im nächsten Schritt neuroinflammatorische Reaktionen und die Integrität der Bluthirnschranke genauer untersucht. Da sich hinsichtlich neuropathologischer Veränderungen (Abbildung 3-6) und neuronaler Dichte (Abbildung 3-7) die stärkste Schädigung und die deutlichsten Effekte nach Treg-Depletion im Hippocampus darstellten, beschränkten sich alle folgenden Analysen auf diese Region.

3.4.1 Eine Treg-Depletion erhöht die Mikrogliaaktivierung im weiblichen Geschlecht und führt zu einer geschlechtsunabhängigen verstärkten Astrogliose

Die HI-induzierte neuronale Schädigung ist eng mit zerebralen neuroinflammatorischen Reaktionen verknüpft, wobei vor allem Mikrogliazellen und Astrozyten aktiviert werden. Welchen Einfluss regulatorische T-Zellen auf die Mikroglia- und Astrozytenaktivierung haben, wurde in immunhistochemischen Analysen sieben Tage nach HI untersucht. Speziell wurde die Expression des Mikrogliamarkers Iba-1 und des Astrozytenmarkers GFAP, die nach Zellaktivierung zusätzlich hochreguliert werden (Kozlowski & Weimer, 2012; Pekny & Nilsson, 2005), genauer analysiert (Abbildung 3-9).

Die Analysen zur Mikrogliaaktivierung im Hippocampus ergaben sowohl für die HI-Behandlung als auch für die Treg-Depletion einen geschlechtsabhängigen Effekt. Männliche Tiere der PBS-Gruppe wiesen eine signifikant stärkere Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu weiblichen Kontrolltieren auf (Abbildung 3-9 A, B). Im weiblichen Geschlecht wurde eine signifikante Zunahme der Iba-1-Expression um circa 30% durch Treg-Depletion festgestellt, während die Depletion regulatorischer T-Zellen in männlichen Jungtieren keinen Einfluss auf die Mikrogliaaktivierung hatte (Abbildung 3-9 A, B).

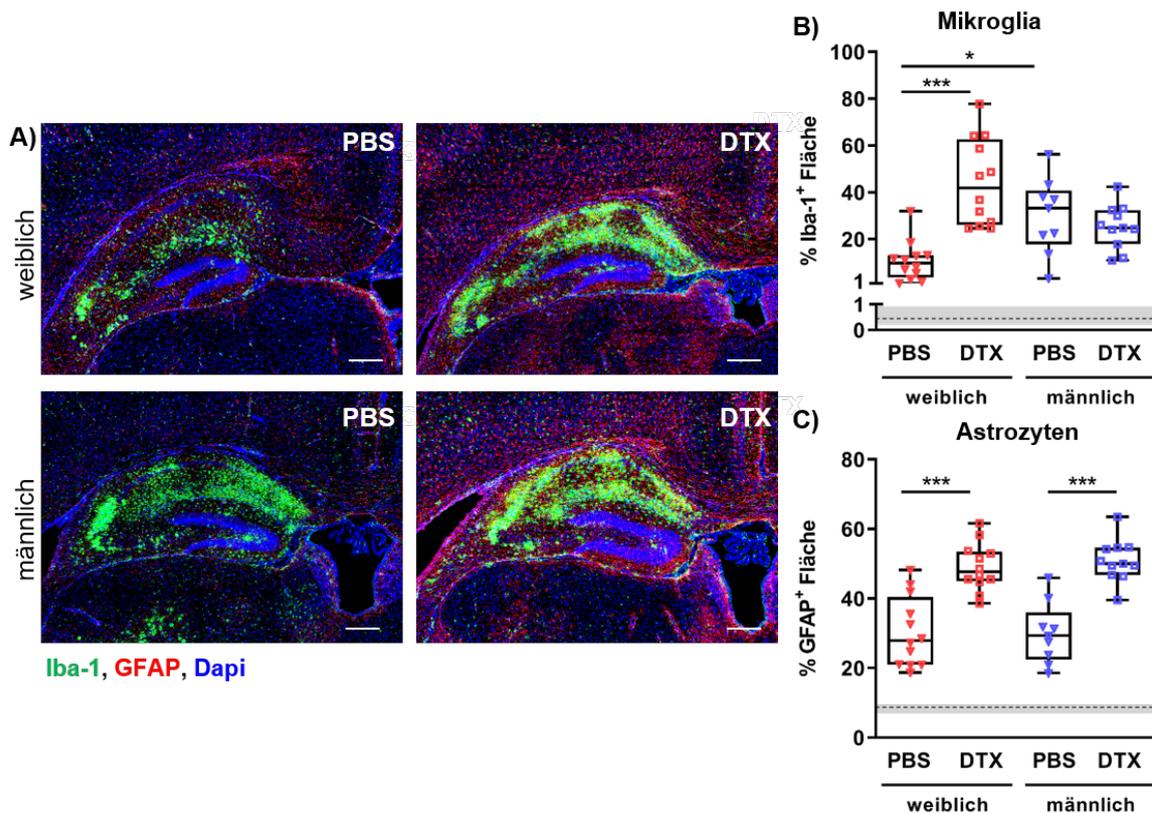


Abbildung 3-9 Eine Treg-Depletion führt zu erhöhter Mikrogliaaktivierung in weiblichen Tieren und verstärkter Astrogliose in beiden Geschlechtern

Am neunten postnatalen Tag wurden DEREK-Mäuse einer HI-Behandlung ausgesetzt. Zusätzlich erfolgte 24 Stunden vor und nach HI eine DTX-Injektion zur Depletion regulatorischer T-Zellen, Kontrolltieren wurde PBS

injiziert. Um den Einfluss der Treg-Depletion auf Mikroglia- und Astrozytenaktivierung zu untersuchen, wurden Iba-1/GFAP Ko-Färbungen (**A**, Iba-1 grün, GFAP rot) sieben Tage nach HI angefertigt. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte in der Hippocampusregion mittels Konfokalmikroskopie. Da eine Abtrennung einzelner Mikroglia und Astrozyten nicht möglich war, wurde die Iba-1⁺ (**B**) und GFAP⁺-Fläche (**C**) ermittelt und auf die Fläche des zuvor umrandeten Hippocampus normiert. In (**A**) dargestellt sind exemplarische Aufnahmen der Hippocampus Region für alle vier untersuchten Gruppen (Maßstabsbalken: 250 µm). Die in (**B**) und (**C**) dargestellten gestrichelten Linien und grauen Balken stellen die Median- und Interquartil-Werte scheinoperierter Tiere aller Gruppen dar (n = 8 / Gruppe). n = 12 (PBS weiblich), n = 12 (DTX weiblich), n = 9 (PBS männlich), n = 11 (DTX männlich). *p<0,05; ***p<0,001

Die Quantifizierung der GFAP-Expression zur Beurteilung der Aktivierung von Astrozyten ergab im Gegensatz zu Mikroglia keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Der prozentuale Anteil der GFAP⁺-Fläche lag sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen der PBS-Gruppe im Mittel bei etwa 30% (Abbildung 3-9 A, C). Interessanterweise führte die Treg-Depletion in beiden Geschlechtern jedoch zu einer signifikanten Zunahme der GFAP⁺-Fläche um circa 20% (Abbildung 3-9 C). In scheinoperierten Tieren wurden bis auf eine leichte Erhöhung der Mikrogliaaktivierung in Treg-depletierten weiblichen Tieren, keine Unterschiede hinsichtlich der GFAP- und Iba-1-Expression festgestellt (Abbildung 3-9 B, C).

3.4.2 Die Wirkung einer Treg-Depletion auf die Gefäßintegrität ist geschlechtsabhängig

Wesentliches Merkmal der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung ist die Verletzung der dichten Bluthirnschranke, die sich unter anderem in der Degradation der Basalmembranen äußert (Mulling et al., 2021). Inwiefern Tregs auch in der neonatalen HI die Integrität der Gefäße und Bluthirnschranke beeinflussen, wurde anhand von immunhistochemischen Ko-Färbungen für den Pan-Endothelzellmarker CD31 und den Basalmembranmarker Pan-Laminin untersucht (Abbildung 3-10 A).

Die Gefäßdichte, die anhand der CD31⁺-Fläche analysiert wurde, war weder durch eine Treg-Depletion noch durch das Geschlecht moduliert (Abbildung 3-10 A, B). Insgesamt unterschied sich die Gefäßdichte aller HI-Tiere zu diesem Untersuchungszeitpunkt auch nicht wesentlich von der in scheinoperierten Tieren (Abbildung 3-10 A). Die HI-induzierte Schädigung der Bluthirnschranke äußert sich jedoch in einer Auflockerung bzw. Gefäßablösung der sonst dicht gepackten und enganliegenden Basalmembranen, was anhand einer erhöhten Lamininfläche in 2-dimensionalen mikroskopischen Aufnahmen gemessen werden kann (Mulling et al., 2021). Die Quantifizierung dieses Phänomens zeigte, dass der Anteil der Laminin⁺-Fläche in PBS-behandelten männlichen Jungtieren verglichen zu weiblichen Mäusen erhöht war (Abbildung 3-10 C). Während die Treg-Depletion in weiblichen Tieren zu einer signifikanten Verstärkung der Basalmembranablösung führte, wurde in Männchen

hingegen eine signifikante Reduktion des Schadens beobachtet, was in einer signifikant stärkeren Basalmembranschädigung in weiblichen DTX-behandelten Tieren im Vergleich zu männlichen DTX-behandelten Mäusen resultierte (Abbildung 3-10 C).

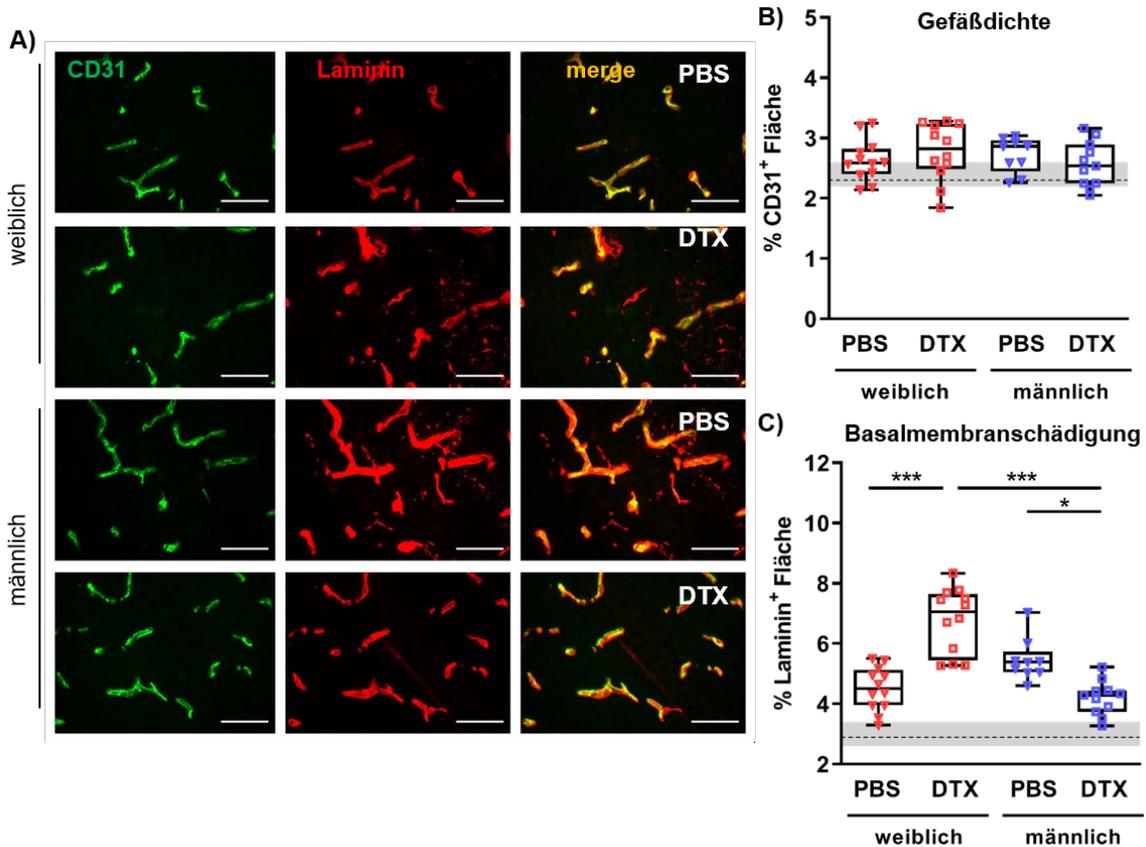


Abbildung 3-10 Eine Treg-Depletion hat eine gegenteilige Wirkung auf die HI-induzierte Schädigung der Basalmembran in Männchen und in Weibchen

Die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung wurde in neun Tage alten DEREK-Mäusen induziert. Die Depletion der Tregs erfolgte mittels DTX-Injektion 24 Stunden vor und nach HI, Kontrolltiere wurden mit PBS behandelt. Der Einfluss der Treg-Depletion auf die Gefäßdichte (**A, B**) und die Integrität der Basalmembran (**A, C**) wurde im Hippocampus über CD31 (Gefäß, grün) / Laminin (Basalmembran, rot) Ko-Färbungen sieben Tage nach HI untersucht (**A**). Zur Quantifizierung wurden binäre Bilder erstellt und die CD31⁺- bzw. Laminin⁺-Fläche ermittelt. In (**A**) sind beispielhafte Aufnahmen der CD31/Laminin Ko-Färbung im Bereich des *Cornu ammonis* (CA1) des Hippocampus dargestellt (Maßstabsbalken: 50 μm). Die in (**B**) und (**C**) dargestellten gestrichelten Linien und grauen Balken stellen die Median- und Interquartil-Werte scheinoperierter Tiere aller Gruppen dar (n = 8 / Gruppe). n = 12 (PBS weiblich), n = 12 (DTX weiblich), n = 9 (PBS männlich), n = 11 (DTX männlich). *p<0,05; ***p<0,001

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es einerseits für männliche und weibliche Tregs ähnliche Effektormechanismen gibt. Dies äußert sich zum Beispiel in einer erhöhten Astrozytenaktivierung nach Treg-Depletion in beiden Geschlechtern. Andererseits zeigte sich, dass Tregs der beiden Geschlechter verschiedene Zellen des ZNS (Zentralen

Nervensystems) in unterschiedlicher Weise modulieren. So bewirkte eine Depletion der Zellen vor allem in Weibchen eine starke Mikrogliaaktivierung, während die ohnehin etwas erhöhte Aktivierung in Männchen nach Treg-Depletion unverändert war. Für die Integrität der Bluthirnschranke zeigte sich zunächst ein ähnliches Bild wie für die Mikrogliaaktivierung, das heißt die Treg-Depletion in Weibchen bewirkte eine erhöhte Schädigung der Basalmembranen, wie sie auch in männlichen Kontrolltieren zu beobachten war. Interessanterweise führte jedoch die Depletion der Tregs in Männchen zu einer signifikanten Reduktion der Basalmembranschädigung.

3.5 Vergleich zirkulierender Hormonlevel und der suppressiven Funktion regulatorischer T-Zellen in männlichen und weiblichen neonatalen Mäusen

3.5.1 Die Serumkonzentration des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol unterscheidet sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Jungtieren

Um zu untersuchen, wie die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Funktionalität der Tregs zu erklären sein könnten, wurde die Konzentration des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol im Serum der Tiere bestimmt. Dies begründet sich nicht nur in der beschriebenen neuroprotektiven Rolle für dieses Hormon, sondern auch in publizierten Arbeiten, die belegten, dass Estrogen die suppressive Funktion von Tregs verstärkt (Luo et al., 2011). Es wurden jedoch keine Unterschiede im Serum männlicher und weiblicher Jungtiere hinsichtlich der Hormonkonzentration beobachtet, was vermutlich auf das neonatale Alter der Tiere zurückzuführen ist (Abbildung 3-11).

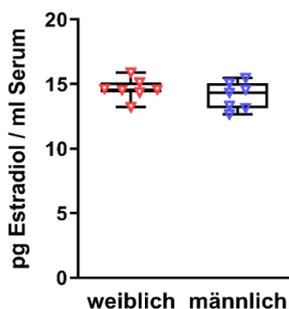


Abbildung 3-11 Die Estradiol-Serumkonzentration unterscheidet sich nicht zwischen männlichen und weiblichen elf Tage alten Mäusen

Um zu untersuchen, ob möglicherweise differierende Spiegel des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol für die beobachtete unterschiedliche Funktion weiblicher und männlicher Tregs verantwortlich sind, wurde 48 Stunden nach HI die Serumkonzentration von Estradiol mittels ELISA bestimmt. n = 7 (weiblich), n = 7 (männlich)

3.5.2 Weibliche regulatorische T-Zellen besitzen eine stärkere suppressive Aktivität als männliche Tregs

Wenngleich die reduzierte Treg-Infiltration in männlichen Tieren die erhöhte Gewebeschädigung und Mikrogliaaktivierung in männlichen PBS-behandelten Kontrolltieren erklären könnte und somit generell auf eine protektive Wirkung der Tregs in neonataler HI hinweisen würde, so erklärt dies nicht die protektiven Effekte der Treg-Depletion auf den neuronalen

Zellverlust und die gestörte Bluthirnschranken-Integrität in männlichen Tieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass männliche und weibliche Tregs möglicherweise intrinsische Unterschiede hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Funktion aufweisen. Daher wurde im Folgenden untersucht, inwiefern sich die Funktionalität der Tregs 24 Stunden nach HI zwischen männlichen und weiblichen Jungtieren unterscheidet. Eine wesentliche Funktion regulatorischer T-Zellen ist die Hemmung der Proliferation anderer Immunzellen, um so die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren (Vignali et al., 2008). Daher wurden Tregs aus Milz- und Thymus-Gewebe isoliert und anschließend auf ihre proliferationshemmenden Eigenschaften in Effektor-T-Zell-Proliferationsassays untersucht. Diese Analysen ergaben, dass männliche regulatorische T-Zellen, die aus Milzgewebe isoliert wurden, eine signifikant geringere immunsuppressive Aktivität im Vergleich zu weiblichen Jungtieren aufwiesen. So wurde die Proliferation stimulierter Effektor-T-Zellen im Median um circa 60% durch weibliche Tregs und circa 40% durch männliche Tregs inhibiert (Abbildung 3-12 A). Die Kultivierung regulatorischer T-Zellen aus Thymus-Gewebe mit T-Effektorzellen resultierte ebenfalls in beiden Gruppen in einer Verminderung der Proliferationsrate um circa 80%, wobei keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tregs festgestellt wurden (Abbildung 3-12 B).

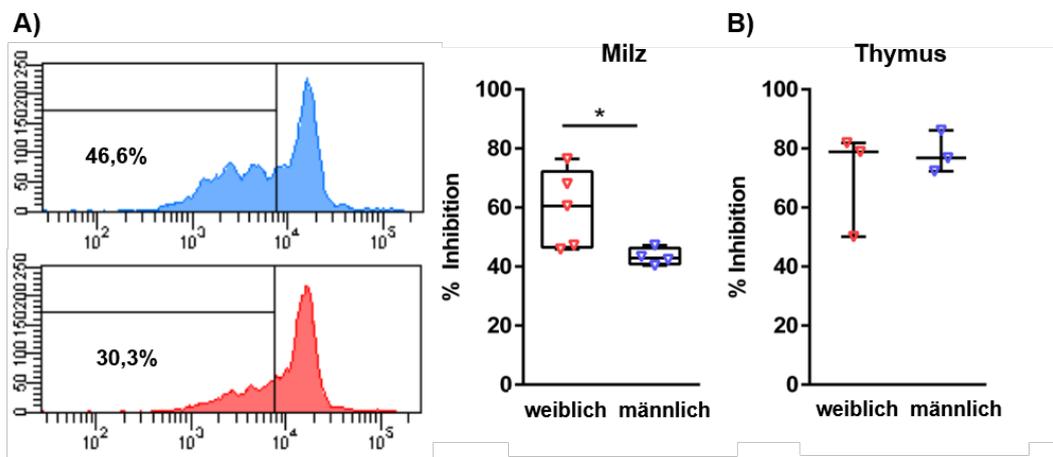


Abbildung 3-12 Weibliche regulatorische T-Zellen weisen eine stärkere suppressive Funktion auf als männliche Tregs

Am neunten postnatalen Tag wurden DEREK-Mäuse einer Hypoxie-Ischämie Behandlung ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurden aus Milz- (A) und Thymusgewebe (B) regulatorische T-Zellen mittels FACS isoliert und diese für vier Tage mit Effektor-T-Zellen ko-kultiviert. Für die Auswertung wurde zunächst in stimulierten Proben mit und ohne Tregs der prozentuale Anteil der proliferierten Effektor-T-Zellen anhand einer unstimulierten Kontrolle ermittelt. Die prozentuale Inhibition wurde berechnet, indem die Proliferationsraten in stimulierten Ko-Kulturen mit Tregs zum Mittelwert der stimulierten Proben ohne Tregs relativiert wurde. In (A) ist jeweils ein Beispielhistogramm für die Proliferation von Effektor-T-Zellen, die mit männlichen (blau, oben) und weiblichen (rot, unten) Tregs, die aus Milzgewebe isoliert wurden, ko-kultiviert wurden, dargestellt. n = 5 (weiblich Milz), n = 5 (männlich Milz), n = 3 (weiblich Thymus), n = 3 (männlich Thymus). *p<0,05

4 DISKUSSION

Die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) des Neugeborenen ist eine der häufigsten Ursachen für neonatale Mortalität und Langzeit-Morbidität. Die Hypothermie als derzeit einzig zugelassene Therapie ist in ihrer Einsetzbarkeit und Wirksamkeit begrenzt, sodass neue, effektivere Behandlungsstrategien entwickelt werden müssen. Eine wesentliche Herausforderung sind zunehmend berichtete Geschlechtsunterschiede in der Pathophysiologie und im Therapieansprechen. Wichtiges Merkmal der HIE-Pathophysiologie sind neuroinflammatorische Reaktionen, die unter anderem die Infiltration peripherer Immunzellen in das geschädigte Gehirn beinhalten. Die Beteiligung einzelner Immunzellsubtypen ist in diesem Zusammenhang bislang jedoch nur wenig untersucht. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den Einfluss regulatorischer T-Zellen (Tregs), die auf Grund ihrer anti-inflammatorischen Eigenschaften und neuroprotektiven Wirksamkeit in anderen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems ein mögliches therapeutisches Ziel in der HIE darstellen könnten. Während der Einfluss von Tregs im adulten Schlaganfall noch kontrovers diskutiert wird, gab es bislang keine Erkenntnisse in der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung. Darüber hinaus haben mögliche Geschlechtsunterschiede in ihrer Wirkung in der ischämischen Hirnschädigung weder im adulten noch im neonatalen Krankheitsmodell bisher Beachtung gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Mausmodell der HIE gezeigt, dass regulatorische T-Zellen eine geschlechtsspezifische Rolle in der durch Hypoxie-Ischämie (HI) verursachten Gehirnschädigung einnehmen. Während für weibliche Tregs eine endogene Neuroprotektion belegt wurde, wurde für männliche Tregs ein schädlicher Einfluss beobachtet. Als mögliche Ursache für die protektive Wirkung weiblicher Tregs wurde eine stärkere anti-inflammatorische Aktivität nachgewiesen. Männliche Tregs scheinen hingegen über eine Verstärkung der HI-induzierten vaskulären Schädigung im neonatalen Gehirn zur Neurodegeneration beizutragen.

Die Infiltration peripherer Immunzellen in das neonatale HI-geschädigte Gehirngewebe wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (Bona et al., 1999; Fathali et al., 2013; Nazmi et al., 2018; Winerdal et al., 2012). Zur Infiltration regulatorischer T-Zellen ist die Datenlage bislang jedoch begrenzt. Vorherige durchflusszytometrische Analysen der Arbeitsgruppe belegten erstmalig eine nicht unerhebliche Infiltration von Tregs sieben Tage nach HI (Herz et al., 2018a). Die Lokalisation und der zeitliche Verlauf der Treg-Infiltration wurde daher in der vorliegenden Arbeit in immunhistochemischen Analysen im DEREG-Mausmodell, das eine Detektion eGFP-exprimierender Tregs ermöglicht (Lahl et al., 2007),

genauer charakterisiert. Sowohl auf Höhe des Hippocampus als auch in der Striatumebene wurde ein biphasisches Infiltrationsmuster von eGFP⁺-Tregs mit einem Maximum an Tag 1 und Tag 7 nach HI detektiert. Eine ähnliche biphasische Kinetik wurde bereits für die gesamte CD4⁺-T-Lymphozyten-Population beschrieben (Albertsson et al., 2014). Darüber hinaus beobachteten Smith et al. auch eine zweigipflige Infiltration myeloider Zellen mit maximaler Anzahl einen und sieben Tage nach HI (Smith et al., 2018). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte biphasische Einwanderung von Tregs könnte durch zeitlich versetzt beginnende pathophysiologische Mechanismen der HIE bedingt sein. So könnte der erste Anstieg an Zellen mit dem primären Zelluntergang und akuten neuroinflammatorischen Reaktionen nach HI assoziiert sein und diese modulieren (Ferriero, 2004). Zum Zeitpunkt des zweiten Infiltrationspeaks könnten Tregs sowohl an Prozessen des sekundären Zelltodes als auch an Regenerations- und Reparaturprozessen, die in der späten Phase einsetzen, beteiligt sein (Fatemi et al., 2009).

Neben der biphasischen Infiltration wurde in der vorliegenden Arbeit belegt, dass Tregs insbesondere in Regionen des Gehirns infiltrieren, die am stärksten durch HI geschädigt werden. Die beobachtete regionsabhängige Infiltration deutet auf eine Involvierung von Tregs an der Schadensausprägung hin, wobei zu klären blieb, welche funktionelle Rolle sie in der neonatalen HI-Pathophysiologie spielen. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Infiltration regulatorischer T-Zellen unabhängig oder lediglich Folge einer generellen biphasischen Leukozyteninfiltration war, wurde zusätzlich die Anzahl CD45⁺-Leukozyten im Gehirngewebe untersucht. Hier zeigte sich jedoch ein abweichendes Infiltrationsmuster, was für eine selektive Infiltration regulatorischer T-Zellen, unabhängig von der Gesamtzahl aller Leukozyten, spricht. Möglicherweise ist diese selektive Infiltration durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf Tregs verglichen zu anderen Immunzellsubtypen bedingt. So zeigte die Arbeit von Schneider-Hohendorf et al. im adulten Organismus, dass sowohl humane als auch murine Tregs im Vergleich zu Foxp3-negativen-Effektor T-Zellen ein deutlich stärkeres Potential besitzen, über die Bluthirnschranke zu migrieren und mit Endothelzellen zu interagieren (Schneider-Hohendorf et al., 2010). Im Kontext der adulten ischämischen Hirnschädigung wurde darüber hinaus belegt, dass regulatorische T-Zellen eine signifikant höhere Expression des Adhäsionsmoleküls LFA-1 im Vergleich zu CD25⁻-CD4⁺-T-Zellen aufweisen, was ihnen eine stärkere Interaktion mit Endothelzellen über den LFA-1/ICAM-1-Signalweg ermöglicht (Kleinschnitz et al., 2013). Weiterführende Analysen der Arbeitsgruppe legten nahe, dass dieser Signalweg auch im neonatalen Organismus einen relevanten Infiltrations-Mechanismus für Tregs darstellen könnte. Eine höhere Expression von LFA-1 auf weiblichen Tregs war hier mit einer stärkeren Infiltrationsneigung assoziiert (Beckmann et al., 2022).

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle der Tregs in der neonatalen HI-induzierten Hirnschädigung wurden Tregs über Gabe von Diphtherietoxin (DTX) in DEREK-Mäusen depletiert (Lahl et al., 2007). Nach erfolgreicher Verifizierung einer effizienten Treg-Depletion mit 30 ng/g Körpergewicht in beiden Geschlechtern und Validierung des hier verwendeten experimentellen Designs, das keine langfristigen Autoimmunreaktionen hervorrief, wurde der Einfluss der Treg-Depletion auf die HI-induzierte strukturelle und zelluläre Gewebeschädigung analysiert. Sowohl präklinische als auch klinische Analysen lieferten erste Hinweise, dass das Geschlecht einen wesentlichen Einfluss auf die Schwere der Gehirnschädigung, Pathomechanismen und Therapieansprechen haben kann (C. A. Hill & Fitch, 2012; Murden et al., 2019; Wood et al., 2020). Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden in Apoptose-Mechanismen liefert die Literatur zunehmend Belege für abweichende neuroinflammatorische Reaktionen (Charriaut-Marlangue et al., 2017; Renolleau et al., 2008). Smith et al. zeigten beispielsweise, dass eine Depletion myeloider Zellen in männlichen neugeborenen Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der ischämischen Schädigung führte, wohingegen die Depletion in weiblichen Tieren keinen Effekt hatte (Smith et al., 2018). Daher lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf einer stratifizierten Analyse nach Geschlecht. Unabhängig von einer Treg-Depletion zeigten männliche Jungtiere im Vergleich zu weiblichen eine stärkere Schädigung hinsichtlich struktureller und zellulärer Gewebeschädigung. Diese Beobachtung bestätigt die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, dass das männliche Geschlecht einen Risikofaktor für die Entwicklung einer HIE darstellt und mit einer stärkeren Gewebeschädigung nach experimentell induzierter HI assoziiert ist (Charriaut-Marlangue et al., 2017; C. A. Hill & Fitch, 2012). Interessanterweise hatte die Depletion von Tregs gegensätzliche Effekte in Männchen und Weibchen. Während die DTX-Behandlung in männlichen Jungtieren in einer signifikanten Verbesserung der Schädigung resultierte, führte sie in Weibchen zu einer Exazerbation des Schadens. Der beobachtete geschlechtsspezifische Einfluss von Tregs auf die Gewebeschädigung auf histologischer Ebene wurde in weiterführenden Analysen der Arbeitsgruppe auch in Bezug auf das funktionelle neurologische Outcome nachgewiesen. In männlichen Tieren führte eine Treg-Depletion zu einer signifikant verbesserten kurz- und langfristigen motor-kognitiven Funktion, wohingegen im weiblichen Geschlecht ein konträrer Effekt beobachtet wurde (Beckmann et al., 2022).

Der gegensätzliche Effekt einer Treg-Depletion auf die strukturelle und zelluläre Schädigung stellte sich besonders im Hippocampus dar. Über die Ursachen des regionsspezifischen Effekts kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Der Hippocampus ist die am stärksten geschädigte Region mit der größten Anzahl infiltrierter Tregs, wobei in weiblichen Tieren eine erhöhte Anzahl im Vergleich zu männlichen Tieren detektiert wurde, was

den geschlechtsabhängigen Effekt der Treg-Depletion in dieser Region erklären könnte. Allerdings war im Hippocampus auch die Schädigung unabhängig vom Geschlecht am stärksten ausgeprägt, so dass nicht Tregs allein für den hier besonders auffallenden geschlechtsspezifischen Unterschied verantwortlich sein müssen. Es ist nicht auszuschließen, dass andere geschlechtsabhängige Mechanismen für die unterschiedlich starke Ausprägung des Gewebeschaden im männlichen und weiblichen Geschlecht nach neonataler HI-induzierter Hirnschädigung verantwortlich sind. Möglicherweise nehmen Tregs abhängig vom Schadensausmaß eine abweichende Funktion in der neonatalen HI ein, sodass nicht das Geschlecht allein, sondern auch die unterschiedlich starke Gewebeschädigung ursächlich für den beobachteten gegensätzlichen Effekt der Treg-Depletion in Weibchen und Männchen sein könnte. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, sollte die Rolle der Tregs in unterschiedlichen Schweregraden der Hirnschädigung, zum Beispiel durch Veränderung der Hypoxiedauer und -stärke, genauer untersucht werden.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass der HI-induzierte neuronale Zellverlust mit einer kompensatorischen Proliferation an Oligodendrozyten in der ipsilateralen Hemisphäre assoziiert ist (Reinboth et al., 2016). Die Analyse von Olig2⁺-Zellen bestätigte eine gesteigerte Oligodendrogenese in der ischämischen Gehirnhälfte, allerdings wurde hier im Gegensatz zu den Analysen der neuronalen Dichte kein eindeutiger Effekt einer Treg-Depletion festgestellt. Dies lässt vermuten, dass Tregs auf zellulärer Ebene insbesondere auf den neuronalen Zelluntergang, unabhängig von Oligodendrozyten, Einfluss nehmen. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass sich die hier dargestellten Analysen auf den Pan-Oligodendrozytenmarker Olig2 beschränkten und somit keine Aussage über den Reifungs- bzw. den Myelinisierungsgrad zulassen. Dies könnte jedoch wichtig sein, da sich das Gehirn noch in der Entwicklung befindet. In einer jüngeren Arbeit der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass HI die Reifung der Oligodendrozyten inhibiert, was mit einer reduzierten Myelinisierung assoziiert war (Kaminski et al., 2020). In einem Modell zur fokalen Demyelinisierung in adulten Mäusen wurde eine regenerative Funktion von regulatorischen T-Zellen und ein positiver Einfluss auf Myelinisierungsprozesse nachgewiesen. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde eine signifikante Förderung der Oligodendrozyten-Differenzierung und Axon-Myelinisierung durch Tregs detektiert, wobei Tregs keinen Einfluss auf die Gesamtzahl an Oligodendrozyten hatten (Dombrowski et al., 2017). Es bleibt daher in zukünftigen Analysen zu ermitteln, welchen Einfluss die Tregs auf die Oligodendrozyten-Reifung und Myelinisierungsprozesse in neonataler Gehirnschädigung haben und ob dieser möglicherweise geschlechtsabhängig ist.

Vor dem Hintergrund der beobachteten divergenten Rolle regulatorischer T-Zellen in der Vermittlung HI-induzierter Schädigung wurden mögliche Zielmechanismen der Tregs genauer untersucht. Die Aktivierung residenter Mikrogliazellen ist ein wichtiger Bestandteil der lokalen inflammatorischen Reaktion nach HI (Hagberg et al., 2015). In anderen neuroinflammatorischen Erkrankungen wie beispielsweise der ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) wurde gezeigt, dass Tregs über eine Interaktion mit Mikrogliazellen neuroprotektiv wirken (Zhao et al., 2012). In Einklang mit publizierten Studien im Modell der neonatalen HIE wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, dass männliche Tiere eine stärkere Mikrogliaaktivierung aufweisen als weibliche Jungtiere (Mirza et al., 2015; Villapol et al., 2019). Interessanterweise bewirkte die Depletion von Tregs in weiblichen Tieren eine signifikant stärkere Iba-1-Expression im Vergleich zu Kontrolltieren, während die ohnehin erhöhte Mikrogliaaktivierung in männlichen Jungtieren durch eine Treg-Depletion nicht verändert war. Die beobachtete Inhibition von Mikroglia durch weibliche Tregs könnte erklären, dass die Depletion von Tregs im weiblichen Geschlecht zu einer Exazerbation des Schadens führt. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass Iba-1 keine Beurteilung bezüglich der Mikroglia-Polarisierung zulässt. Mikrogliazellen können abhängig vom inflammatorischen Milieu unterschiedliche Phänotypen annehmen, einen pro-inflammatorischen M1-Phänotypen mit neurodegenerativen Eigenschaften oder einen anti-inflammatorischen neuroprotektiven M2-Phänotypen (Ma et al., 2017; Tang & Le, 2016). Dies ist für die neonatale Hirnschädigung insofern wichtig, als dass es Hinweise auf eine geschlechtsabhängige Mikroglia-Polarisierung in der neonatalen ischämischen Hirnschädigung gibt, mit überwiegend pro-inflammatorischem Profil in männlichen Jungtieren (Al Mamun et al., 2018; Villapol et al., 2019). Das Überwiegen des pro-inflammatorischen Mikroglia-Phänotypen in männlichen Jungtieren im Vergleich zu Weibchen war zudem mit einem größeren Gehirnschaden in männlichen Mäusen assoziiert (Al Mamun et al., 2018; Villapol et al., 2019). Wenngleich Folgeanalysen zum Mikroglia-Phänotyp im hier untersuchten experimentellen Setting notwendig sind, so legen diese publizierten Erkenntnisse nahe, dass die beobachteten neuroprotektiven Effekte weiblicher Tregs möglicherweise auf eine Modulation des Mikroglia-Phänotyps zurückzuführen sind. In weiteren Analysen bliebe jedoch auch zu analysieren, über welchen genauen Mechanismus weibliche Tregs die beobachtete Suppression der Mikrogliaaktivierung ausüben. Analysen aus anderen Krankheitsmodellen wie z.B. Tiermodellen zur Frühgeborenen-Retinopathie und zur ALS belegen, dass eine Interaktion über direkten Zellkontakt von Tregs und Mikroglia stattfindet oder Tregs die Polarisierung indirekt über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-4 beeinflussen können (Deliyanti et al., 2017; Zhao et al., 2012). Um diese möglichen Interaktionsmechanismen für das hier untersuchte Krankheitsmodell zu untersuchen, würden sich beispielsweise *in vitro* Ko-Kultur-Versuche

mit Mikrogliazellen und Tregs eignen, die einer Sauerstoff-Glukose-Deprivation (*oxygen glucose deprivation*) ausgesetzt werden. Darüber hinaus könnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Versuche mit gezielter Blockade einzelner potenzieller molekularer Mediatoren, beispielsweise durch Gabe eines anti-IL-10-Antikörpers, Aufschluss über die unterschiedlichen Wirkmechanismen männlicher und weiblicher Tregs in der neonatalen HI geben.

Im Rahmen der akuten lokalen inflammatorischen Reaktion auf ein hypoxisch-ischämisches Ereignis werden neben Mikroglia auch Astrozyten aktiviert, was sich in einer erhöhten GFAP-Expression äußert (Kaminski et al., 2020; Reinboth et al., 2016), wobei die Aktivierung von Astrozyten unter ischämischen Bedingungen sowohl protektive als auch neurotoxische Effekte haben kann (Liddelow & Barres, 2017; Liu & McCullough, 2013). Im Gegensatz zur Analyse des neuronalen Zellverlustes und der Mikrogliaaktivierung war das Ausmaß der Astrogliose bei Männchen und Weibchen zum hier untersuchten Zeitpunkt ähnlich groß. Darüber hinaus resultierte die Treg-Depletion in beiden Geschlechtern in einer signifikanten Erhöhung der GFAP-Expression. Diese Beobachtung deutet auf eine Suppression der reaktiven Astrogliose durch Tregs hin, was im Einklang mit veröffentlichten Ergebnissen aus der adulten Schlaganfallforschung ist (Ito et al., 2019). Ito et al. zeigten, dass Astrozyten in Abwesenheit von Tregs vermehrt neurotoxische Marker exprimierten, wohingegen die Expression von neuroprotektiven Markern unverändert war (Ito et al., 2019). Jedoch wurden in dieser Arbeit nur männliche Tiere untersucht und der Zeitpunkt der Depletion war deutlich später (Ito et al., 2019). Daher kann in der hier vorliegenden Arbeit nicht abschließend beurteilt werden, inwiefern die beobachtete Inhibition der Astrozyten mit einer Ausprägung des neonatalen Gehirnschadens assoziiert ist. Vor dem Hintergrund, dass in der vorliegenden Arbeit mit neonatalen Jungtieren in beiden Geschlechtern eine ähnliche Regulation beobachtet wurde, kann darüber hinaus angenommen werden, dass die beobachteten geschlechtsabhängigen Unterschiede hinsichtlich neuronaler Schädigung nicht durch Astrozyten zu erklären sind. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass eine Analyse der GFAP-Expression lediglich Auskunft über die allgemeine Astrozytenaktivierung liefert und keine Unterscheidung zwischen neurotoxischen und -protektiven Astrozyten erlaubt. In zukünftigen Analysen sollte untersucht werden, ob Tregs, möglicherweise geschlechtsabhängig, Einfluss auf die Funktion und den Phänotypen von Astrozyten haben (Liddelow et al., 2017).

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Gewebeschädigung nach HI ist die Degradation der Bluthirnschranke, die sich unter anderem durch eine Ablösung der sonst dicht anliegenden Basalmembran äußert (Mulling et al., 2021). Die hier vorliegenden Ergebnisse zur Gefäßintegrität und der Beschaffenheit der Basalmembran als wichtiger Bestandteil der Bluthirnschranke zeigten, dass die HI-induzierte Ablösung der vaskulären Basalmembran in

männlichen Kontrolltieren stärker ausgeprägt war als in weiblichen PBS-behandelten Tieren. Interessanterweise zeigte eine Treg-Depletion eine ähnliche Wirkung auf die Gefäßintegrität wie auf die strukturelle und zelluläre Gewebeschädigung: Während in weiblichen Tieren ohne Tregs eine stärkere Degradation der Basalmembran beobachtet wurde, führte die Depletion bei Männchen zu einer Protektion der vaskulären Schädigung. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass männliche Tregs einen schädigenden Effekt auf die Integrität der Bluthirnschranke haben. Dies könnte sowohl zu der insgesamt stärkeren Schädigung im männlichen Geschlecht beitragen als auch erklären, warum eine Treg-Depletion in männlichen Jungtieren einen neuroprotektiven Effekt hat. Über welchen Mechanismus männliche Tregs ihre schädigende Wirkung auf die vaskuläre Basalmembran auswirken, ist bislang nicht geklärt und sollte zukünftig analysiert werden. Weiterführende immunhistochemische Analysen der Arbeitsgruppe zeigten, dass die stärkere Schädigung der neurovaskulären Einheit in männlichen Tieren mit einer vorwiegend intra- bzw. perivaskulären Lokalisation der Tregs assoziiert war. Im Gegensatz dazu wurde in weiblichen Tieren die Mehrheit an Zellen extravaskulär detektiert (Beckmann et al., 2022). Kleinschnitz et al. haben im Modell des adulten Schlaganfalls, in dem ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet wurden, nachgewiesen, dass Tregs eine mikrovaskuläre Dysfunktion und die Formation von Mikrothromben fördern, was die Reperfusion nach Ischämie erschwert (Kleinschnitz et al., 2013). Über Induktion der sogenannten Thromboinflammation scheinen Tregs somit unabhängig von ihrer immunologischen Funktion eine Exazerbation des Gehirnschadens herbeizuführen (Kleinschnitz et al., 2013). Angelehnt an diese Studie könnte möglicherweise eine Interaktion von Tregs mit Blutplättchen über einen CD40/CD40L vermittelten Signalweg in männlichen Jungtieren die Ausbildung von Thromben und konsekutiv eine gesteigerte inflammatorische Reaktion induzieren, die zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Matrix-Metalloproteinasen und somit zur Degradation der Basallamina führt (De Meyer et al., 2016; Lakhan et al., 2013; Thomsen et al., 2017). Bislang konnte diesbezüglich für die neonatale HI noch kein zu Grunde liegender Mechanismus identifiziert werden. 24 Stunden nach HI wurde kein Unterschied in der Ansammlung intravaskulärer Plättchen sowie der von-Willebrand-Faktor-Aktivität als mögliche Marker einer Thromboinflammation festgestellt (Beckmann et al., 2022). Daher sind weiterführende Analysen notwendig, die ein größeres Spektrum von Molekülen, die an der komplexen Kaskade der Thromboinflammation beteiligt sind, miteinschließen.

Die beobachteten protektiven Effekte von Tregs in weiblichen Tieren und degenerativen Effekte in männlichen Tieren könnten möglicherweise auf eine unterschiedlich hohe Infiltrationsneigung der Tregs, eine unterschiedlich starke Depletionseffizienz oder eine unterschiedliche suppressive Aktivität zurückzuführen sein. Unter der Berücksichtigung, dass

das *Foxp3*-Gen x-chromosomal lokalisiert ist, könnte eine DTX-Applikation bei Männchen und Weibchen zu einer unterschiedlich starken Depletion an Tregs und somit zu abweichenden Ergebnissen in der Analyse der Schadensausprägung geführt haben. Durchflusszytometrische Analysen der Treg-Anzahl zeigten jedoch in beiden Geschlechtern eine ähnliche Reduktion der Zellzahl, sodass eine abweichende Depletionseffizienz als Ursache ausgeschlossen werden konnte. Durchflusszytometrische und immunhistochemische Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch eine deutlich höhere Treg-Infiltration in das geschädigte Hirngewebe weiblicher Jungtiere im Vergleich zu Männchen. Die offenbar stärkere Migrationsfähigkeit weiblicher Tregs war mit einer höheren Expression von LFA-1 sowie CCR4 und CXCR4 assoziiert (Beckmann et al., 2022). Dennoch erklärt die geringere Menge an Tregs in HI-geschädigtem Hirngewebe männlicher Jungtiere nicht, warum eine Depletion dieser Zellen neuroprotektiv wirkt. Vielmehr deutet dies auf intrinsische Unterschiede in der Funktionalität der Tregs hin. In T-Zell-Effektor-Suppressionsassays zeigte sich, dass weibliche Tregs eine stärkere suppressive Funktion als männliche Tregs aufweisen. Die erhöhte suppressive Funktion lässt eine generell stärkere anti-inflammatorische Wirkung weiblicher Tregs vermuten. Dies wird auch durch die bereits diskutierten unterschiedlichen Effekte einer Treg-Depletion auf die Mikrogliaaktivierung unterstützt.

Die immunsuppressive und neuroprotektive Wirkung von Tregs wird im erwachsenen Organismus oft mit unterschiedlichen Spiegeln des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol in Verbindung gebracht. In klinischen Studien zum adulten Schlaganfall wurde eine neuroprotektive Wirkung dieses Hormons mit einer geringeren Schlaganfall-Inzidenz bei prämenopausalen Frauen assoziiert (McCullough & Hurn, 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Estradiol nachweislich die Proliferation und suppressive Aktivität von Tregs fördert (Polanczyk et al., 2004; Prieto & Rosenstein, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde mit neonatalen Tieren gearbeitet, was eher gegen Estradiol-abhängige Mechanismen spricht (C. A. Hill & Fitch, 2012; Klein & Flanagan, 2016). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt, da im Einklang mit früheren experimentellen Studien (Mirza et al., 2015) keine Unterschiede im Estradiolspiegel zwischen weiblichen und männlichen Jungtieren beobachtet wurden. Dies deutet auf intrinsische Unterschiede hin, die evtl. auch genetische Faktoren beinhalten könnten (Klein & Flanagan, 2016). Erste explorative mRNA-Expressions-Analysen der Arbeitsgruppe unterstützen diese Hypothese. Für weibliche Tregs wurde verglichen zu männlichen eine ausgeprägte Genanreicherung für die mTORC1- und Myc-Signalwege sowie den Signalweg der oxidativen Phosphorylierung detektiert (Beckmann et al., 2022). Das ist insofern interessant, als dass diese Signalwege kürzlich mit einer erhöhten funktionellen Treg-Aktivität in Verbindung gebracht wurden (Chapman et al., 2018; Saravia et al., 2020). Bei allen dargestellten Analysen zur Treg-

Funktionalität und -Transkriptionsaktivität bleibt zu berücksichtigen, dass sie sich bislang auf Tregs aus peripheren Organen (Milz und Thymus) beschränkten. Möglicherweise besitzen Tregs im HI-geschädigten Hirngewebe andere inhibitorische Eigenschaften bzw. Effektoormechanismen. Suppressionsassays und Transkriptionsanalysen mit aus dem ZNS gewonnenen Tregs könnten in zukünftigen Analysen somit zu einem besseren Verständnis beitragen. Die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Tregs auf Grund der insgesamt geringen Anzahl im Gehirn ist jedoch herausfordernd, wie in der Arbeit von Ito et al. ersichtlich wird, in der Tregs aus insgesamt 60 Mäusegehirnen für eine Mikroarray-Analyse isoliert und vereint werden mussten (Ito et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Auswirkung einer akuten Treg-Depletion. In Anbetracht der in dieser Arbeit gezeigten biphasischen Infiltration wäre es in Zukunft jedoch auch von besonderem Interesse, den Einfluss der sekundären Infiltration in Hinblick auf Regenerations- und Reparaturmechanismen zu untersuchen. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse verdeutlichen sehr klar, dass stratifizierten Analysen nach Geschlecht in neonataler hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung essenziell sind. Zudem könnte die Arbeit neue Forschungsansätze für den adulten Schlaganfall liefern, bei dem die Rolle weiblicher Tregs bislang kaum untersucht wurde. Darüber hinaus ergaben sich wichtige Erkenntnisse für die mögliche Entwicklung geschlechtsabhängiger Therapieansätze. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte eine Steigerung der Zellzahl neuroprotektiver Tregs im weiblichen Geschlecht einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf haben. Eine mögliche Strategie wäre z.B. eine *in vitro* Expansion von allogenen Tregs mittels anti-CD28 und anti-CD3 Antikörpern und anschließender Infusion der Zellen (Ferreira et al., 2019). Alternativ könnten Tregs möglicherweise *in vivo* über einen anti-CD28 Antikörper (Na et al., 2015) oder einen Anti-IL2/IL2-Antikörperkomplex (Zhang et al., 2018) stimuliert werden. Für männliche Tregs wurde ein schädlicher Einfluss auf die Bluthirnschranke und den Gewebeschaden identifiziert, der möglicherweise unabhängig von ihren immunologischen Funktionen ist. Nach einer genaueren Charakterisierung der Schädigungsmechanismen könnte z.B. eine gezielte Blockade der Interaktion von Tregs mit Endothelzellen bzw. Blutplättchen einen protektiven Ansatz darstellen. Bei sämtlichen Interventionen ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine Modulation von regulatorischen T-Zellen im neonatalen Organismus und ein damit verbundener Eingriff in das unreife Immunsystem auch mit Risiken wie beispielsweise einer erhöhten Infektanfälligkeit assoziiert sein könnte. Weitere grundlagenwissenschaftliche Analysen kombiniert mit stratifizierten klinischen Studien sind daher essenziell, um neugeborenen Kindern mit HIE und ihren Familien möglichst frühzeitig eine bessere Option für die Behandlung und die neurologische Entwicklung der Kinder zu liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) ist eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Langzeitmorbidity des Neugeborenen. Derzeit empfohlene Therapien sind in ihrer Anwendbarkeit und Wirksamkeit begrenzt, sodass die Erforschung der Pathophysiologie essenziell ist, um neue Therapieansätze zu entwickeln. Ein zentraler Bestandteil der durch Hypoxie-Ischämie (HI) verursachten Hirnschädigung ist die Aktivierung residenter Immunzellen und Infiltration peripherer Immunzellen in das geschädigte Gewebe. Regulatorische T-Zellen (Tregs), deren Rolle in der HI-Pathophysiologie bislang unbekannt war, könnten auf Grund ihrer zuvor in anderen Krankheitsmodellen beschriebenen immunsuppressiven und neuroprotektiven Wirksamkeit ein relevanter Einflussfaktor in der HI-vermittelten Hirnschädigung sein. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle von Tregs im Mausmodell in der akuten Phase nach HI zu analysieren. Dazu wurde das Dereg (*Depletion of regulatory t-cells*)-Mausmodell verwendet, das eine Detektion von Tregs sowie eine spezifische Depletion der Zellen ermöglicht. In Hinblick auf kürzlich belegte geschlechtsspezifische Unterschiede in der HI-Pathophysiologie und Schadensausprägung erfolgten die Analysen nach Geschlecht stratifiziert. Immunhistochemische Analysen ergaben eine biphasische Infiltration von Tregs nach HI, insbesondere in stark geschädigte Regionen des Gehirns, wobei eine stärkere Infiltrationsneigung für weibliche Tregs beobachtet wurde. Analysen zum strukturellen und zellulären Gewebeschaden bestätigten eine bereits vorbeschriebene, stärkere Schadensausprägung im männlichen Geschlecht. Die Depletion von Tregs hatte interessanterweise geschlechtsabhängige Effekte: Während in weiblichen Jungtieren eine stärkere Schädigung in Abwesenheit von Tregs beobachtet wurde, hatte die Treg-Depletion in männlichen Jungtieren einen protektiven Effekt. Somit wirken Tregs von weiblichen Jungtieren offenbar neuroprotektiv, während männliche Tregs die sekundäre Neurodegeneration verstärken. Das Geschlechtshormon Estradiol scheint in diesem Alter nicht ursächlich für den beobachteten sexuellen Dimorphismus zu sein. Als ein möglicher Mechanismus wurde jedoch für weibliche Tregs eine stärkere suppressive Aktivität identifiziert, die mit einer Inhibition der Mikrogliaaktivierung nach HI assoziiert war. Hingegen deutete eine geringere Gefäßschädigung bei Treg-depletierten männlichen Tieren darauf hin, dass männliche Tregs durch Interaktion mit dem Gefäßsystem eine Schädigung der neurovaskulären Einheit hervorrufen und darüber schädigend wirken. Die in dieser Arbeit belegte divergierende Beteiligung von Tregs in der HI-induzierten Hirnschädigung könnte eine wesentliche Erklärung für beschriebene Geschlechtsunterschiede in der Ausprägung der HIE sein und möglicherweise einen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer geschlechtsabhängiger Therapieansätze darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abel, S., Luckheide, N., Westendorf, A. M., Geffers, R., Roers, A., Muller, W., Sparwasser, T., Matuschewski, K., Buer, J., Hansen, W. (2012): Strong impact of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells and limited effect of T cell-derived IL-10 on pathogen clearance during *Plasmodium yoelii* infection. *J Immunol* 188, 5467-5477.
2. Al Mamun, A., Yu, H., Romana, S., Liu, F. (2018): Inflammatory Responses are Sex Specific in Chronic Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Cell Transplant* 27, 1328-1339.
3. Albertsson, A. M., Bi, D., Duan, L., Zhang, X., Leavenworth, J. W., Qiao, L., Zhu, C., Cardell, S., Cantor, H., Hagberg, H., Mallard, C., Wang, X. (2014): The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury. *J Neuroinflammation* 11, 153.
4. Albertsson, A. M., Zhang, X., Vontell, R., Bi, D., Bronson, R. T., Supramaniam, V., Baburamani, A. A., Hua, S., Nazmi, A., Cardell, S., Zhu, C., Cantor, H., Mallard, C., Hagberg, H., Leavenworth, J. W., Wang, X. (2018): γ delta T Cells Contribute to Injury in the Developing Brain. *Am J Pathol* 188, 757-767.
5. Alvarez-Diaz, A., Hilario, E., de Cerio, F. G., Valls-i-Soler, A., Alvarez-Diaz, F. J. (2007): Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology* 92, 227-235.
6. Azzopardi, D., Strohm, B., Marlow, N., Brocklehurst, P., Deierl, A., Eddama, O., Goodwin, J., Halliday, H. L., Juszczak, E., Kapellou, O., Levene, M., Linsell, L., Omar, O., Thoresen, M., Tusor, N., Whitelaw, A., Edwards, A. D., Group, T. S. (2014): Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med* 371, 140-149.
7. Azzopardi, D., Wyatt, J. S., Cady, E. B., Delpy, D. T., Baudin, J., Stewart, A. L., Hope, P. L., Hamilton, P. A., Reynolds, E. O. (1989): Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 25, 445-451.
8. Beckmann, L., Obst, S., Labusek, N., Abberger, H., Koster, C., Klein-Hitpass, L., Schumann, S., Kleinschnitz, C., Hermann, D. M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Hansen, W., Herz, J. (2022): Regulatory T Cells Contribute to Sexual Dimorphism in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Stroke*, STROKEAHA121037537.
9. Bona, E., Andersson, A. L., Blomgren, K., Gilland, E., Puka-Sundvall, M., Gustafson, K., Hagberg, H. (1999): Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res* 45, 500-509.
10. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., Ramsdell, F. (2001): Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.
11. Chamorro, A., Meisel, A., Planas, A. M., Urra, X., van de Beek, D., Veltkamp, R. (2012): The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 8, 401-410.
12. Chapman, N. M., Zeng, H., Nguyen, T. M., Wang, Y., Vogel, P., Dhungana, Y., Liu, X., Neale, G., Locasale, J. W., Chi, H. (2018): mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated Treg subsets to protect tissue homeostasis. *Nat Commun* 9, 2095.

13. Charriaut-Marlangue, C., Besson, V. C., Baud, O. (2017): Sexually Dimorphic Outcomes after Neonatal Stroke and Hypoxia-Ischemia. *Int J Mol Sci* 19
14. De Meyer, S. F., Denorme, F., Langhauser, F., Geuss, E., Fluri, F., Kleinschnitz, C. (2016): Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke* 47, 1165-1172.
15. de Vries, L. S., Jongmans, M. J. (2010): Long-term outcome after neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 95, F220-224.
16. Deliyanti, D., Talia, D. M., Zhu, T., Maxwell, M. J., Agrotis, A., Jerome, J. R., Hargreaves, E. M., Gerondakis, S., Hibbs, M. L., Mackay, F., Wilkinson-Berka, J. L. (2017): Foxp3(+) Tregs are recruited to the retina to repair pathological angiogenesis. *Nat Commun* 8, 748.
17. Dombrowski, Y., O'Hagan, T., Dittmer, M., Penalva, R., Mayoral, S. R., Bankhead, P., Fleville, S., Eleftheriadis, G., Zhao, C., Naughton, M., Hassan, R., Moffat, J., Falconer, J., Boyd, A., Hamilton, P., Allen, I. V., Kissenpfennig, A., Moynagh, P. N., Evergren, E., Perbal, B., Williams, A. C., Ingram, R. J., Chan, J. R., Franklin, R. J. M., Fitzgerald, D. C. (2017): Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci* 20, 674-680.
18. Eunson, P. (2015): The long-term health, social, and financial burden of hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol* 57 Suppl 3, 48-50.
19. Fatemi, A., Wilson, M. A., Johnston, M. V. (2009): Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol* 36, 835-858, vii.
20. Fathali, N., Ostrowski, R. P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., Zhang, J. H. (2013): Splenic immune cells in experimental neonatal hypoxia-ischemia. *Transl Stroke Res* 4, 208-219.
21. Ferreira, L. M. R., Muller, Y. D., Bluestone, J. A., Tang, Q. (2019): Next-generation regulatory T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov* 18, 749-769.
22. Ferriero, D. M. (2004): Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 351, 1985-1995.
23. Finer, N. N., Robertson, C. M., Richards, R. T., Pinnell, L. E., Peters, K. L. (1981): Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 98, 112-117.
24. Fleiss, B., Gressens, P. (2012): Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol* 11, 556-566.
25. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
26. Golomb, M. R., Fullerton, H. J., Nowak-Gottl, U., Deveber, G., International Pediatric Stroke Study, G. (2009): Male predominance in childhood ischemic stroke: findings from the international pediatric stroke study. *Stroke* 40, 52-57.
27. Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., Ley, T. J. (2004): Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601.
28. Gunn, A. J., Bennet, L. (2009): Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models. *Clin Perinatol* 36, 579-593.
29. Gunn, A. J., Thoresen, M. (2019): Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy. *Handb Clin Neurol* 162, 217-237.
30. Hagberg, H., David Edwards, A., Groenendaal, F. (2016): Perinatal brain damage: The term infant. *Neurobiol Dis* 92, 102-112.

31. Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., Gressens, P. (2015): The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* 11, 192-208.
32. He, F., Balling, R. (2013): The role of regulatory T cells in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5, 153-180.
33. Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Rivera, A. L., Toennis, K. M., Appel, J. E., Zhao, W., Moore, D. H., Powell, S. Z., Appel, S. H. (2013): Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 5, 64-79.
34. Herz, J., Koster, C., Crasmoller, M., Abberger, H., Hansen, W., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I. (2018a): Peripheral T Cell Depletion by FTY720 Exacerbates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Mice. *Front Immunol* 9, 1696.
35. Herz, J., Koster, C., Reinboth, B. S., Dzierko, M., Hansen, W., Sabir, H., van Velthoven, C., Bendix, I., Felderhoff-Muser, U. (2018b): Interaction between hypothermia and delayed mesenchymal stem cell therapy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Behav Immun* 70, 118-130.
36. Hill, A., Volpe, J. J. (1989): Perinatal asphyxia: clinical aspects. *Clin Perinatol* 16, 435-457.
37. Hill, C. A., Fitch, R. H. (2012): Sex differences in mechanisms and outcome of neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: implications for sex-specific neuroprotection in clinical neonatal practice. *Neurol Res Int* 2012, 867531.
38. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
39. Ito, M., Komai, K., Mise-Omata, S., Iizuka-Koga, M., Noguchi, Y., Kondo, T., Sakai, R., Matsuo, K., Nakayama, T., Yoshie, O., Nakatsukasa, H., Chikuma, S., Shichita, T., Yoshimura, A. (2019): Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature* 565, 246-250.
40. Jacobs, S. E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W. O., Inder, T. E., Davis, P. G. (2013): Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003311.
41. Kaminski, N., Koster, C., Mouloud, Y., Borger, V., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Giebel, B., Herz, J. (2020): Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce Neuroinflammation, Promote Neural Cell Proliferation and Improve Oligodendrocyte Maturation in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Front Cell Neurosci* 14, 601176.
42. Klein, S. L., Flanagan, K. L. (2016): Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 16, 626-638.
43. Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Gobel, K., Schuhmann, M. K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., Mayer, C. T., Brede, M., Varallyay, C., Pham, M., Bendszus, M., Jakob, P., Magnus, T., Meuth, S. G., Iwakura, Y., Zerneck, A., Sparwasser, T., Nieswandt, B., Stoll, G., Wiendl, H. (2013): Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 121, 679-691.
44. Kozłowski, C., Weimer, R. M. (2012): An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS One* 7, e31814.
45. Kramer, T. J., Hack, N., Bruhl, T. J., Menzel, L., Hummel, R., Griemert, E. V., Klein, M., Thal, S. C., Bopp, T., Schafer, M. K. E. (2019): Depletion of regulatory T cells

- increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon-gamma gene expression in acute experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 16, 163.
46. Kumar, A., Mittal, R., Khanna, H. D., Basu, S. (2008): Free radical injury and blood-brain barrier permeability in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 122, e722-727.
47. Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., Badawi, N. (2010): Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 86, 329-338.
48. Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., Sparwasser, T. (2007): Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204, 57-63.
49. Lai, J. C. Y., Rocha-Ferreira, E., Ek, C. J., Wang, X., Hagberg, H., Mallard, C. (2017): Immune responses in perinatal brain injury. *Brain Behav Immun* 63, 210-223.
50. Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Tepper, D., Leonard, A. (2013): Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol* 4, 32.
51. Lawn, J. E., Cousens, S., Zupan, J. (2005): 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *The Lancet* 365, 891-900.
52. Leonardo, C. C., Pennypacker, K. R. (2009): Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation* 6, 13.
53. Li, M., Lin, Y. P., Chen, J. L., Li, H., Jiang, R. C., Zhang, J. N. (2015): Role of regulatory T cell in clinical outcome of traumatic brain injury. *Chin Med J (Engl)* 128, 1072-1078.
54. Li, P., Gan, Y., Sun, B. L., Zhang, F., Lu, B., Gao, Y., Liang, W., Thomson, A. W., Chen, J., Hu, X. (2013): Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol* 74, 458-471.
55. Liddel, S. A., Barres, B. A. (2017): Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957-967.
56. Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Munch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., Barres, B. A. (2017): Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487.
57. Liesz, A., Kleinschnitz, C. (2016): Regulatory T Cells in Post-stroke Immune Homeostasis. *Transl Stroke Res* 7, 313-321.
58. Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., Veltkamp, R. (2009): Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 15, 192-199.
59. Liu, F., McCullough, L. D. (2013): Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol Sin* 34, 1121-1130.
60. Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C., Li, D. J. (2011): Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol* 8, 50-58.
61. Ma, Y., Wang, J., Wang, Y., Yang, G. Y. (2017): The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 157, 247-272.

62. McCullough, L. D., Hurn, P. D. (2003): Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* 14, 228-235.
63. Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D., Liu, F. (2015): Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation* 12, 32.
64. Mulling, K., Fischer, A. J., Siakaeva, E., Richter, M., Bordbari, S., Spyra, I., Koster, C., Hermann, D. M., Gunzer, M., Felderhoff-Muser, U., Bendix, I., Jablonska, J., Herz, J. (2021): Neutrophil dynamics, plasticity and function in acute neurodegeneration following neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Behav Immun* 92, 234-244.
65. Murden, S., Borbelyova, V., Lastuvka, Z., Myslivecek, J., Otahal, J., Riljak, V. (2019): Gender differences involved in the pathophysiology of the perinatal hypoxic-ischemic damage. *Physiol Res* 68, S207-S217.
66. Na, S. Y., Mracsko, E., Liesz, A., Hunig, T., Veltkamp, R. (2015): Amplification of regulatory T cells using a CD28 superagonist reduces brain damage after ischemic stroke in mice. *Stroke* 46, 212-220.
67. Nakamura, K., Kitani, A., Strober, W. (2001): Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-644.
68. Nazmi, A., Albertsson, A. M., Rocha-Ferreira, E., Zhang, X., Vontell, R., Zelco, A., Rutherford, M., Zhu, C., Nilsson, G., Mallard, C., Hagberg, H., Lai, J. C. Y., Leavenworth, J. W., Wang, X. (2018): Lymphocytes Contribute to the Pathophysiology of Neonatal Brain Injury. *Front Neurol* 9, 159.
69. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M. J. (2007): CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8, 1353-1362.
70. Pekny, M., Nilsson, M. (2005): Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.
71. Perlman, J. M. (2007): Pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury. *Journal of Perinatology* 27, S39-S46.
72. Plane, J. M., Liu, R., Wang, T. W., Silverstein, F. S., Parent, J. M. (2004): Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiol Dis* 16, 585-595.
73. Polanczyk, M. J., Carson, B. D., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenberg, A. A., Ziegler, S. F., Offner, H. (2004): Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 173, 2227-2230.
74. Prieto, G. A., Rosenstein, Y. (2006): Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology* 118, 58-65.
75. Reinboth, B. S., Koster, C., Abberger, H., Prager, S., Bendix, I., Felderhoff-Muser, U., Herz, J. (2016): Endogenous hypothermic response to hypoxia reduces brain injury: Implications for modeling hypoxic-ischemic encephalopathy and therapeutic hypothermia in neonatal mice. *Exp Neurol* 283, 264-275.
76. Ren, X., Akiyoshi, K., Vandenberg, A. A., Hurn, P. D., Offner, H. (2011): CD4+FoxP3+ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 26, 87-90.
77. Renolleau, S., Fau, S., Charriaut-Marlangue, C. (2008): Gender-related differences in apoptotic pathways after neonatal cerebral ischemia. *Neuroscientist* 14, 46-52.

78. Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C., Brierley, J. B. (1981): The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9, 131-141.
79. Rocha-Ferreira, E., Hristova, M. (2016): Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. *Neural Plast* 2016, 4901014.
80. Rodriguez-Fanjul, J., Duran Fernandez-Feijoo, C., Lopez-Abad, M., Lopez Ramos, M. G., Balada Caballe, R., Alcantara-Horillo, S., Camprubi Camprubi, M. (2017): Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question? *PLoS One* 12, e0184643.
81. Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Jr., Muller, W., Rudensky, A. Y. (2008): Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28, 546-558.
82. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
83. Saravia, J., Zeng, H., Dhungana, Y., Bastardo Blanco, D., Nguyen, T. M., Chapman, N. M., Wang, Y., Kanneganti, A., Liu, S., Raynor, J. L., Vogel, P., Neale, G., Carmeliet, P., Chi, H. (2020): Homeostasis and transitional activation of regulatory T cells require c-Myc. *Sci Adv* 6, eaaw6443.
84. Schneider-Hohendorf, T., Stenner, M. P., Weidenfeller, C., Zozulya, A. L., Simon, O. J., Schwab, N., Wiendl, H. (2010): Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 40, 3581-3590.
85. Schuhmann, M. K., Kraft, P., Stoll, G., Lorenz, K., Meuth, S. G., Wiendl, H., Nieswandt, B., Sparwasser, T., Beyersdorf, N., Kerkau, T., Kleinschnitz, C. (2015): 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* 35, 6-10.
86. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., Noble-Haeusslein, L. J. (2013): Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106-107, 1-16.
87. Shankaran, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., McDonald, S. A., Donovan, E. F., Fanaroff, A. A., Poole, W. K., Wright, L. L., Higgins, R. D., Finer, N. N., Carlo, W. A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C. M., Stevenson, D. K., Stoll, B. J., Lemons, J. A., Guillet, R., Jobe, A. H., National Institute of Child, H., Human Development Neonatal Research, N. (2005): Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 353, 1574-1584.
88. Sheldon, R. A., Sedik, C., Ferriero, D. M. (1998): Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain Res* 810, 114-122.
89. Shrivastava, K., Chertoff, M., Llovera, G., Recasens, M., Acarin, L. (2012): Short and long-term analysis and comparison of neurodegeneration and inflammatory cell response in the ipsilateral and contralateral hemisphere of the neonatal mouse brain after hypoxia/ischemia. *Neurol Res Int* 2012, 781512.
90. Silver, J., Miller, J. H. (2004): Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5, 146-156.

91. Smith, P. L. P., Mottahedin, A., Svedin, P., Mohn, C. J., Hagberg, H., Ek, J., Mallard, C. (2018): Peripheral myeloid cells contribute to brain injury in male neonatal mice. *J Neuroinflammation* 15, 301.
92. Stoll, G., Nieswandt, B. (2019): Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment. *Nat Rev Neurol* 15, 473-481.
93. Tamosiuniene, R., Manouvakhova, O., Mesange, P., Saito, T., Qian, J., Sanyal, M., Lin, Y. C., Nguyen, L. P., Luria, A., Tu, A. B., Sante, J. M., Rabinovitch, M., Fitzgerald, D. J., Graham, B. B., Habtezion, A., Voelkel, N. F., Aurelian, L., Nicolls, M. R. (2018): Dominant Role for Regulatory T Cells in Protecting Females Against Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 122, 1689-1702.
94. Tang, Y., Le, W. (2016): Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53, 1181-1194.
95. Thomsen, M. S., Routhe, L. J., Moos, T. (2017): The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 3300-3317.
96. Vexler, Z. S., Yenari, M. A. (2009): Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Dev Neurosci* 31, 378-393.
97. Vignali, D. A. A., Collison, L. W., Workman, C. J. (2008): How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 8, 523-532.
98. Villapol, S., Faivre, V., Joshi, P., Moretti, R., Besson, V. C., Charriaut-Marlangue, C. (2019): Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 20
99. Volpe, J. J. (1976): Perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Clin North Am* 23, 383-397.
100. Waddell, J., Hanscom, M., Sharon Edwards, N., McKenna, M. C., McCarthy, M. M. (2016): Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Experimental Neurology* 275, 285-295.
101. Wassink, G., Gunn, E. R., Drury, P. P., Bennet, L., Gunn, A. J. (2014): The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci* 8, 40.
102. Winerdal, M., Winerdal, M. E., Kinn, J., Urmaliya, V., Winqvist, O., Aden, U. (2012): Long lasting local and systemic inflammation after cerebral hypoxic ischemia in newborn mice. *PLoS One* 7, e36422.
103. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2008): CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275.
104. Wood, T. R., Gundersen, J. K., Falck, M., Maes, E., Osredkar, D., Loberg, E. M., Sabir, H., Walloe, L., Thoresen, M. (2020): Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis. *Sci Rep* 10, 10833.
105. World Health Organization. (2018, 27.11.2018). Distribution of causes of death among children aged < 5 years (%). 2022, Online-Publikation; [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-death-among-children-aged-5-years-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-death-among-children-aged-5-years-(-)) (abgerufen am 20.05.2022)
106. Xie, L., Choudhury, G. R., Winters, A., Yang, S. H., Jin, K. (2015): Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. *Eur J Immunol* 45, 180-191.

107. Yang, S., Fujikado, N., Kolodin, D., Benoist, C., Mathis, D. (2015): Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science* 348, 589-594.
108. Zhang, H., Xia, Y., Ye, Q., Yu, F., Zhu, W., Li, P., Wei, Z., Yang, Y., Shi, Y., Thomson, A. W., Chen, J., Hu, X. (2018): In Vivo Expansion of Regulatory T Cells with IL-2/IL-2 Antibody Complex Protects against Transient Ischemic Stroke. *J Neurosci* 38, 10168-10179.
109. Zhao, W., Beers, D. R., Liao, B., Henkel, J. S., Appel, S. H. (2012): Regulatory T lymphocytes from ALS mice suppress microglia and effector T lymphocytes through different cytokine-mediated mechanisms. *Neurobiol Dis* 48, 418-428.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| APC | Antigenpräsentierende Zellen |
| ANOVA | Analysis of variance |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | Cluster of differentiation |
| CTLA | Cytotoxic t lymphocyte associated antigen |
| d | Tag nach Hypoxie-Ischämie |
| Dapi | 4'6-Diamidin-2-pheylindol |
| DEREG | Depletion of regulatory T-cell |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DS | Donkey Serum |
| DTR | Diphtherietoxin Rezeptor |
| DTX | Diphtherietoxin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FSG | Fischhaut-Gelatine |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein |
| eGFP | enhanced Green fluorescent protein |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie) |
| FCS | Fetal calve serum (fetales Kalbserum) |
| Foxp3 | Forkhead box protein P3 |
| FTY720 | Fingolimod |
| HI | Hypoxie-Ischämie (experimentelle Modellierung der HIE) |
| HIE | neonatale hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (klinisch) |
| Iba | Ionized calcium-binding adapter molecule |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| IL | Interleukin |
| i.p. | Intraperitoneal |
| LFA | Lymphocyte function-associated antigen |
| MACS | Magnetic-activated cell sorting (magnetische Zellsortierung) |
| NeuN | Neuronal Nuclei (Neuronen-spezifisches Kernprotein) |
| NGS | Normal goat serum |
| Olig2 | Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2 |
| P | Postnataler Tag |
| PARP | Poly-(ADP-ribose) Polymerase |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PE-Cy | Phycoerythrin-Cyanine |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex |
| PFA | Paraformaldehyd |
| RAG | Recombination activating antigen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROI | Region of Interest |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| TGF | Transforming growth factor |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| Treg | Regulatorische T-Zelle |
| VCAM | Vascular cell adhesion molecule |
| VLA | Very late antigen |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 2-1 Experimentelles Design | 21 |
| Abbildung 2-2 Bewertungskriterien zur neuropathologischen Schadensevaluation | 26 |
| Abbildung 2-3 Atrophie/Ödem-Messung verschiedener Regionen auf Höhe des Striatum und des Hippocampus | 27 |
| Abbildung 2-4 Untersuchte Regionen zur immunhistochemischen Analyse der leukozytären, neuronalen und oligodendrozytären Dichte in der Striatum- und Hippocampus-Ebene..... | 29 |
| Abbildung 2-5 Neonatale HI verursacht eine Schädigung der Basalmembran | 31 |
| Abbildung 2-6 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der Anzahl an Tregs | 33 |
| Abbildung 2-7 Gating-Strategie zur Auswertung des Suppressionsassays | 36 |
| Abbildung 3-1 Biphasische selektive Infiltration regulatorischer T-Zellen in das neonatale hypoxisch-ischämische Gehirn..... | 39 |
| Abbildung 3-2 Regulatorische T-Zellen infiltrieren insbesondere in Gehirnregionen, die in Folge einer Hypoxie-Ischämie einen starken Schaden aufweisen..... | 41 |
| Abbildung 3-3 Weibliche Tregs infiltrieren vermehrt in das neonatale hypoxisch-ischämische Gehirn..... | 43 |
| Abbildung 3-4 Die Applikation von 30 ng/g Körpergewicht Diphtherietoxin führt unabhängig vom Geschlecht zu einer signifikanten Reduktion von CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ -regulatorischen T-Zellen | 44 |
| Abbildung 3-5 Die neonatale zweimalige Applikation von Diphtherietoxin hat kein lymphoproliferatives Autoimmunitätssyndrom zur Folge..... | 45 |
| Abbildung 3-6 Die Auswirkung der Treg-Depletion auf neuropathologische Veränderungen an Tag 7 nach Hypoxie-Ischämie ist geschlechtsabhängig | 47 |
| Abbildung 3-7 Der Effekt einer Treg-Depletion auf den HI-induzierten neuronalen Zellverlust ist abhängig von Geschlecht und Region..... | 48 |
| Abbildung 3-8 Eine Treg-Depletion hat keinen Einfluss auf die HI-induzierte Oligodendrozytenzunahme | 49 |
| Abbildung 3-9 Eine Treg-Depletion führt zu erhöhter Mikrogliaaktivierung in weiblichen Tieren und verstärkter Astroglieose in beiden Geschlechtern | 51 |
| Abbildung 3-10 Eine Treg-Depletion hat eine gegenteilige Wirkung auf die HI-induzierte Schädigung der Basalmembran in Männchen und in Weibchen | 53 |
| Abbildung 3-11 Die Estradiol-Serumkonzentration unterscheidet sich nicht zwischen männlichen und weiblichen elf Tage alten Mäusen | 54 |
| Abbildung 3-12 Weibliche regulatorische T-Zellen weisen eine stärkere suppressive Funktion auf als männliche Tregs | 55 |

7.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 2-1 Chemikalien..... | 14 |
| Tabelle 2-2 Lösungen und Puffer | 15 |
| Tabelle 2-3 Medien..... | 15 |
| Tabelle 2-4 Primäre Antikörper | 16 |
| Tabelle 2-5 Sekundäre Antikörper | 16 |
| Tabelle 2-6 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen zur Ermittlung der Depletionseffizienz | 16 |
| Tabelle 2-7 Antikörper für die Zellsortierung mittels FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>) | 16 |
| Tabelle 2-8 Antikörper und Farbstoffe für Isolation, Färbung und Stimulation von Responderzellen | 17 |
| Tabelle 2-9 Antikörper zur Messung der Proliferation von Responderzellen | 17 |
| Tabelle 2-10 Kits | 17 |
| Tabelle 2-11 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien | 17 |

8 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit in der Arbeitsgruppe für Experimentelle perinatale Neurowissenschaften des Universitätsklinikum Essen. Meine Arbeit wurde durch die Else-Kröner-Fresenius Stiftung sowie die Studienstiftung des Deutschen Volkes gefördert, ich bedanke mich für die fachliche und finanzielle Unterstützung.

An erster Stelle gebührt mein Dank meiner Doktormutter und Betreuerin PD Dr. Josephine Herz. Ich danke dir für deine herausragende Betreuung, dein stetiges Engagement, den spannenden Austausch und dein Herzblut für unser gemeinsames Projekt, wodurch du so maßgeblich zum Erfolg meiner Promotionsarbeit beigetragen hast. Es ist dir gelungen, mich durch deinen Enthusiasmus nachhaltig für die Wissenschaft zu begeistern!

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Prof. Dr. Ivo Bendix, der es mir ermöglicht hat, meine wissenschaftliche Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Vielen Dank für deine kontinuierliche Unterstützung und den spannenden Austausch während meiner gesamten Promotionszeit. Auch danke ich Prof. Dr. Ursula Felderhoff-Müser, der Leiterin der Klinik für Kinderheilkunde I, für ihre guten Ratschläge und ihren Zuspruch.

Der gesamten Arbeitsgruppe für Experimentelle perinatale Neurowissenschaften danke ich für die großartige Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich mich bei Christian Köster für die Einarbeitung sowie seine tatkräftige Unterstützung bedanken. Vielen Dank, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mich mit deiner guten Laune angesteckt hast. Ein weiterer großer Dank gilt meiner Mitstreiterin Marina Seitz, die während meiner Zeit im Labor stets meine erste Anlaufstelle war und sämtliche Schwierigkeiten sowie Höhepunkte dieser Zeit mit mir geteilt hat. Ich bedanke mich bei den bereits genannten Josephine, Ivo, Marina und Christian sowie bei Meray Serdar, Hemmen Sabir, Mandana Rizazad, Sabrina Forell und Swantje Hertel für die vielen schönen gemeinsamen Stunden im und außerhalb des Labors sowie für die Freundschaften, die daraus entstanden sind. Ihr alle habt meine Promotionszeit zu etwas ganz Besonderem gemacht. Prof. Dr. Wiebke Hansen, Dr. Hanna Abberger und Sina Luppus sowie Jun.-Prof. Dr. Sven Schumann danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie sowie meiner besten Freundin Lea danke ich für die großartige Unterstützung in jeglicher Hinsicht während meiner gesamten Ausbildungszeit. Besonderer Dank gilt meinem Opa, der mich mit seinem Stolz und seiner Zuversicht stets sehr motiviert hat. Für die einzigartige Unterstützung sowie den bedingungslosen Rückhalt gilt der größte Dank meinem Verlobten Freddy, ohne dich hätte ich diese Aufgabe niemals in dieser Weise bewältigen können.

9 LEBENS LAUF

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