

Aus dem Institut für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung zur Immundepression nach ischämischem Schlaganfall
anhand der fortlaufenden Analyse der Thymusfunktion**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Josef Richter

aus Danzig

Datum der Promotion: 14.02.2014

MEINEN ELTERN

Far better an approximate answer to the right question, which is often vague, than the exact answer to the wrong question, which can always be made precise.

John W. Tukey 1962

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abstract auf englisch und deutsch</i>	6
1 EINLEITUNG	8
1.1 DER SCHLAGANFALL, BÜRDE UNSERER ZEIT	9
1.2 PATHOPHYSIOLOGIE UND AKUTTHERAPIE	9
1.3 SCHLAGANFALLINDUZIERTES IMMUNDEPRESSIONS SYNDROM (SIDS).....	10
1.4 T-LYMPHOZYTEN UND HIRNISCHEMIE.....	11
1.5 THYMOPOESE DER T-LYMPHOZYTEN	12
1.6 URSPRUNG DER TREC: V(D)J-REKOMBINATION	13
1.7 DIE STEUERUNG DES THYMUS.....	14
1.8 DER ALTERNDE THYMUS.....	15
1.9 DIE T-ZELL-HOMÖOSTASE: EIN WEITER OZEAN.....	16
1.10 DIE THYMEKTOMIE.....	18
2 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	19
3 MATERIALIEN UND METHODEN	20
3.1 EINFÜHRUNG	20
3.2 VORBEREITENDE METHODEN	21
3.2.3 <i>Das Schlaganfallmodell der Middle Cerebral Artery Occlusion</i>	22
3.3 KLONIERUNG	25
3.4 SEQUENZIERUNG.....	27
3.5 DIE POLYMERASEKETTENREAKTION	28
3.5.1 <i>Die Quantitative Real Time PCR (Echtzeit-PCR)</i>	30
4 ERGEBNISSE	33
4.1 TREC IM EXPERIMENTELLEN SCHLAGANFALL	33
4.1.1 <i>Die Odds Ratio der Operationsgruppen</i>	34
4.1.2 <i>Varianzanalyse des experimentellen Schlaganfalls</i>	36
4.1.3 <i>Ergebnisse am Maus-Schlaganfallmodell</i>	37
4.2 TREC NACH THYMEKTOMIE.....	39

4.3 TREC IM KLINISCHEN SCHLAGANFALL.....	40
4.3.1 Grafische Darstellung der TREC-Verteilung	40
4.3.2 Deskriptive Analyse.....	44
4.3.3 Statistische Modellierung der klinischen Untersuchungen	46
4.3.4 Signifikanzanalyse der klinischen Untersuchungen.....	47
4.3.5 Validierung: die ROC-Analyse.....	49
4.3.6 Subgruppenbetrachtung: die Überlebenden.....	50
4.3.7 Subgruppenbetrachtung: die Verstorbenen	51
4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	53
5 DISKUSSION.....	56
5.1 DIE ECHTZEIT - PCR.....	56
5.2 ERGEBNISDISKUSSION.....	57
5.3 INTERPRETATION	58
5.3.1 Die Interpretation der TREC-Daten.....	58
5.3.2 TREC im MCAO-Modell.....	60
5.3.3 TREC im klinischen Schlaganfall.....	62
5.3.4 Analogien: TREC und SIRS	64
5.4 EXTERNE VALIDITÄT.....	65
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	66
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	67
8 ANHANG.....	75
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	75
8.2 Verbrauchsmaterialien und Instrumente.....	77
8.3 Berechnung der TREC-Ratio.....	78
8.4 Tabellen	79
Eidesstattliche Versicherung	83
Lebenslauf.....	84

Abstract: „Evaluation of Stroke Induced Immunodepression by Continuous Analysis of Thymic Function“

Background and Objective: Since a decade, the evidence for a Stroke Induced Immunodepression Syndrome (SIDS) has been growing. The SIDS is linked to an increased mortality and morbidity during the acute treatment of stroke. Despite the high level of attention, there is still need for clinically applicable measuring methods of the phenomenon. The following dissertation presents a method for measuring thymic function by PCR analysis of T-cell Receptor Excision Circles (TREC), a byproduct of thymic T-cell development. Modern PCR assays enable sensitive detection of TREC DNA even in elderly populations.

Methods: The measuring method for PCR analysis of human and murine TREC DNA is described. Furthermore, an experimental and a clinical study was designed to verify the impact of stroke on TREC numbers. The survey included analysis of blood and tissue samples of 29 murine specimen as well as a prospective 6 months follow-up of 36 patients after an acute ischemic stroke. The patients were subject to a double-blinded placebo-controlled antibiotic treatment with moxacillin. The clinical study was complemented with singular blood samples of 12 thymectomized and 9 healthy probands as controls.

Results: The hypothesis of a postischemic decrease of TREC numbers was confirmed by trend in the animal model. Corresponding to the known phenomenons of postischemic lymphopenia and Th1/Th2 shift, a significant increase of TREC numbers in the spleen and a decrease in blood was observed in the animal model. In the clinical survey, the decrease of TREC numbers was confirmed by trend. Further examinations revealed a significant increase of TREC numbers in the subgroup of deceased patients, contrary to the age expectations of this subgroup. On the other hand, according to the initial hypothesis the TREC numbers in the subgroup of survivors decreased significantly. There was no difference between the antibiotic and placebo subgroups.

Conclusion: The reproducibility, sensitivity and specificity of the TREC PCR assay is excellent whereas processing time is acceptable. The following work gives an insight in a subsidiary aspect of SIDS, focusing on the thymic and T cell responses after ischemic stroke. It strenghtens the thesis of stroke derived neuroimmunomodulation. The measuring of TREC numbers is defined as an immunological marker helping to identify immune disregulations as SIDS. It helps to establish a broader understanding of the complex neuroimmunological interactions.

Hintergrund: Seit einem Jahrzehnt erhärten sich die Belege für die Existenz eines Schlaganfallbedingten Immundepressionssyndroms (SIDS). SIDS wird mit erhöhter Mortalität und Morbidität nach einem ischämischen Schlaganfall in Zusammenhang gebracht. Trotz hoher Aufmerksamkeit besteht hier weiterer Bedarf an klinisch anwendbaren Messmethoden. Die folgende Dissertation stellt eine Methode zur Messung der Thymusfunktion mittels PCR-Analyse von T-Zell Rezeptor Exzisions Zirkeln (TREC), einem Nebenprodukt der thymischen T-Zell Differenzierung. Moderne PCR-Verfahren ermöglichen die Erkennung von TREC-DNA selbst in hohem Alter.

Methoden: In der vorliegenden Arbeit wird die Messmethode der PCR-Analyse von humaner und muriner TREC-DNA beschrieben. Des Weiteren wurde eine experimentelle und eine klinische Studie entwickelt, um den Einfluss des ischämischen Schlaganfalls auf die TREC-Ratio nachzuprüfen. Die Untersuchung beinhaltete eine Analyse von Blut- und Gewebeproben von 29 Mäusen sowie eine prospektive sechsmonatige Verlaufsbeobachtung von 36 Probanden nach einem ischämischen Schlaganfall. Die Probanden wurden in eine doppelblinde, placebokontrollierte Studie mit Gabe von Moxacillin nach Schlaganfalleintritt aufgenommen. Eine Vervollständigung der klinischen Untersuchung erfolgte durch Einschluss von Kontrollgruppen.

Ergebnisse: Die Hypothese eines postischämischen Abfalls der TREC-Ratio wurde im Tiermodell tendentiell bestätigt. Entsprechend einer bekannten postischämischen Lymphopenie mit Th1/Th2-Shift war ein signifikanter Anstieg der TREC-Ratio in der Milz und einen Abfall im Blut zu beobachten. In der klinischen Untersuchung konnte der Abfall der TREC-Ratio festgestellt, aber nicht signifikant bestätigt werden. Die weitere Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg der TREC-Ratio in der Subgruppe der verstorbenen Probanden, entgegengesetzt zur erwarteten Altersverteilung. Demgegenüber fiel in der Subgruppe der Überlebenden die TREC-Ratio, entsprechend der initialen Hypothese, signifikant ab. Zwischen der Antibiotika- und der Placebogruppe zeigte sich keine Differenz.

Schlussfolgerung: Die Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität der TREC-PCR ist exzellent bei mäßigem Prozessieraufwand. Die vorliegende Dissertationsschrift gibt Einblicke in einen Teilaspekt des SIDS hinsichtlich der thymischen und T-Lymphozytären Reaktion und stützt die Hypothese einer schlaganfallinduzierten Neuroimmunmodulation. Sie zeigt die Rolle der TREC-Ratio im Kontext von SIDS auf und stellt die TREC-Ratio als immunologischen Marker auf dem Weg zum weiteren Verständnis der komplexen neuroimmunologischen Interaktion vor.

1 EINLEITUNG

Diese Arbeit ist eingebunden in den Forschungsbereich „Schlaganfallinduzierte Immundepression“ des Instituts für Experimentelle Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Als Teilaspekt der Immundepression wird hierbei nach Eintritt eines ischämischen Schlaganfalls die Thymusfunktion anhand der Messung thymusoriginärer T-Lymphozyten in vivo evaluiert.

Seit Beginn der modernen Medizin im 19. Jahrhundert wurden wiederholt Beobachtungen von gehäuften Infekten nach einem ischämischen Schlaganfall gemacht. Ursächlich dafür nahm man Komplikationen in Zusammenhang mit schlaganfallbedingten Funktionsausfällen an, wie Immobilisation, Dysphagie oder Aspiration. Erst zur Jahrtausendwende konnte die schlaganfallinduzierte Immunsuppression wissenschaftlich manifestiert werden. Dem zugrunde liegt ein erweitertes Verständnis der Interaktion von ZNS und Immunsystem. Die vorliegende Arbeit untersucht eine Facette dieses komplexen Zusammenhangs.

Das einleitende Kapitel legt die Basisinformationen zu dieser Forschungsstudie dar. Zuerst werden Klinik und Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls mit Fokus auf das Schlaganfallinduzierte Immundepressions Syndrom (SIDS) umrissen. Im Anschluss erfolgen die Vorstellung der Thymopoese von T-Lymphozyten und der neuroimmunologischen Kommunikationsachse der Vertebraten. Besonderer Schwerpunkt liegt hierbei auf der T-Zell Rezeptor Rekombination, welche die Kernuntersuchung dieser Dissertation, die Quantifizierung der T-Zell-Rezeptor-Exzisionszirkel (TREC), ermöglicht. Die Einleitung endet mit einer Übersicht über den derzeitigen Kenntnisstand der T-Zell-Homöostase höherer Wirbeltiere.

Auf diesen Informationen aufbauend folgt im zweiten Kapitel die Herleitung der Aufgabenstellung als Geleitwort des praktischen Teils dieser Dissertationsschrift.

11 DER SCHLAGANFALL, BÜRDE UNSERER ZEIT

Im Zuge der Alterung moderner Gesellschaften wird eine Zunahme vaskulärer Erkrankungen des ZNS verzeichnet. Der ischämische Schlaganfall stellt in Industrieländern die dritthäufigste Todesursache nach ischämischer Herzerkrankung und bösartigen Neubildungen dar. In Deutschland werden jährlich über 150.000 Neuerkrankungen bei einer Inzidenz von ca. 200 / 100.000 gezählt.

Der ischämische Schlaganfall stellt zudem die führende Ursache einer Behinderung in Industrieländern dar. Hierzulande leiden ca. 1.000.000 Menschen bei einer Prävalenz von ca. 600 / 100.000 Einwohner an den Folgen eines Schlaganfalls¹.

Ein Schlaganfall verursacht sowohl für Betroffene und Angehörige als auch für die Versicherungsgemeinschaft eine enorme sozioökonomische Belastung. Die Folgekosten der Erkrankung bilden in den industrialisierten Gesellschaften die höchsten Ausgaben des Gesundheitswesens².

12 PATHOPHYSIOLOGIE UND AKUTTHERAPIE

Innerhalb des Oberbegriffs „Schlaganfall“ stellt die akute fokale Hirnischämie die Mehrzahl aller Ereignisse mit einem Anteil von 85 % vor hämorrhagischen und seltenen Schlaganfallformen dar. Durch Einengung oder Verschluss arterieller Hirngefäße kommt es zu einer Minderperfusion des nachgeschalteten Gewebes. Der Perfusionsstörung können eingeschwemmtes thrombotisches Material oder die Lumenverengung hirnersorgender Gefäße durch arteriosklerotische Plaques sowie seltene Ursachen zugrunde liegen. Die Minderperfusion führt zur Ausbildung eines nekrotischen Infarktkerns mit umgebender Penumbra, in welcher eine Restperfusion des Gewebes zum temporären Überleben der Neurone unter Funktionsausfall führt³. Aufgrund akkumulierender pathologischer Prozesse aus dem Infarktkern, wie Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und des Membranpotentials, metabolischer und bioenergetischer Entgleisung, Radikalenbildung, Apoptose und Inflammation, dehnt sich die Nekrosezone auf das Penumbraareal aus^{4,5,6}. Daher bildet die Entwicklung neuroprotektiver Therapiestrategien für das Penumbraorgan ein wichtiges Felder der Hirnischämieforschung neben der Primärprävention und der Akuttherapie.

Bisherige neuroprotektive Therapien erwiesen sich, trotz vielversprechender experimenteller Ansätze, in klinischen Studien als nicht wirksam^{7,8}.

Die nachfolgend vorgestellten Therapieleitlinien des akuten ischämischen Schlaganfalls basieren auf den Behandlungsleitlinien, die 2008 durch die European Stroke Organisation (ESO) veröffentlicht wurden⁹. Nach dem Konzept *Time is Brain* ist jeder Schlaganfall ein Notfall und umgehend auf einer *Stroke Unit* zu behandeln¹⁰. Die Optimierung der zeitlichen Abläufe bis zum Therapiebeginn sowie die spezialisierte Behandlung von Komplikationen wie Infektionen, metabolischer Entgleisung, respiratorischer Insuffizienz und Immobilisationsfolgen senkt die Morbidität und verbessert Prognose signifikant¹¹.

Eine frühzeitige Behandlung mit ASS als Rezidivprophylaxe wird durch die IST- und CAST-Studien nahegelegt¹². Des Weiteren werden zeitliche Richtwerte zur Sichtung, Diagnostik und Therapie vorgegeben¹³. Die *Door-to-Needle*-Zeit gibt einen Zeitrahmen von maximal 60 Minuten zwischen Ankunft des Erkrankten in der Notaufnahme und Beginn der Therapie an. Die rekanalisierende Therapie ist frühestmöglich einzuleiten. In erster Linie handelt es sich hierbei um eine systemische Lyse mit rtPA innerhalb von 4,5 Stunden nach Ereigniseintritt (ECASS I-III, ATLANTIS- und NINDS-Studie)¹⁴ oder eine arterielle Lyse von Verschlüssen der A. cerebri media als individueller Heilversuch in einem spezialisierten Zentrum¹⁵.

1.3 SCHLAGANFALLINDUZIERTES IMMUNDEPRESSIONS SYNDROM (SIDS)

Eine der Hauptursachen der Frühletalität nach ischämischem Schlaganfall bilden schwere Infektionen von Lunge und Harnwegen in der Frühphase der Erkrankung^{16,17,18,19,20}. Sie sind mit Inzidenzraten von 21 – 65 % signifikant häufiger zu finden als in hospitalisierten Vergleichspopulationen^{21,22}. Bereits seit 30 Jahren wird eine Immunsuppression nach ischämischem Schlaganfall vermutet^{23,24}.

Becker et al. sehen in der zentral gesteuerten Immunsuppression einen protektiven Mechanismus vor dem Eindringen immunkompetenter peripherer Zellen in das „immunblinde“ Organ ZNS nach Störung der BHS²⁵. Dabei scheint unter dem Einfluss von Katecholaminen nicht, wie früher geglaubt, eine generalisierte Immunsuppression, sondern eine Unterdrückung der T-lymphozytären Th1-Funktion und Induktion der Th2-

Funktion stattzufinden, ein sog. Th1/Th2-Shift²⁶. Stark vereinfacht kann dabei die Th1-Antwort als zellulär bzw. proinflammatorisch und die Th2-Antwort als humoral bzw. antiinflammatorisch betrachtet werden²⁷.

In tierexperimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte eine überschießende Aktivierung des sympathischen Nervensystems nachgewiesen werden²⁸. In der Folge kam es zu einer Immunsuppression mit Lymphopenie sowie lympho- und monozytärer Dysfunktion, welche wegbereitend für bakterielle Pneumonien waren. Noradrenerge Blockade mit Propranolol zeigte hierbei einen protektiven Effekt²⁹. Die Mortalitäts- und Morbiditätsrate konnte zudem durch eine frühzeitige antibakterielle Therapie signifikant gesenkt werden³⁰. Diese Studien zeigten erstmalig einen kausalen Zusammenhang zwischen einem ischämischen Schlaganfall und einer Immunsuppression.

1.4 T-LYMPHOZYTEN UND HIRNISCHÄMIE

Die Rolle der Lymphozyten als Schlüsselzellen der Immunregulation im geschädigten Hirngewebe nach einem Schlaganfall ist weitgehend unklar und Gegenstand intensiver Forschung^{31,32}. Bekannt ist, dass T-Lymphozyten fünf Stunden nach dem Infarkt ereignis über proinflammatorische und prothrombotische Aktivität sowie über den Th1/Th2-Shift und einen Anstieg des IFN- γ eine zumindest teilweise schädigende Rolle spielen³³. Die Autoimmunhypothese geht von einer zentral schädigenden Wirkung der T-Lymphozyten aus, da das Immunsystem nach Zusammenbruch der BHS in größerem Maße mit ZNS-Antigenen in Kontakt kommt²⁵.

Mäuse mit erworbener Immuntoleranz gegen Myelin-basisches Protein (MBP) wiesen nach experimentell gesetztem Schlaganfall (MCAO) kleinere Infarktvolumina als Kontrolltiere auf, wobei MBP-tolerante T-Lymphozyten im Infarktareal die Immunantwort eindämmten^{25,34,35}. Stunden bis Tage nach Schlaganfall wurde eine erhöhte Aktivität regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten (T_{reg}) beobachtet, welche die Immunantwort über Sekretion von IL10 und über Induktion des Th1/Th2-Shift hemmten^{36,37,38}. Tiere mit depletiertem T_{reg}-Zellkompartiment wiesen nach ischämischen Schlaganfall neben fehlender Hemmung der Immunreaktion signifikant größere Infarktareale auf³⁶. Becker et al. konnten nachweisen, dass eine Infektstimulation mit Lipopolysacchariden während eines experimentellen Schlaganfalls die adaptive Immunantwort gegenüber MBP signifikant in Richtung Th2/Th1-Shift verlagert und den Infarktschaden erhöht²⁵. Diese Daten legen einen Zusammenhang

der Th1-Immunantwort gegenüber MBP mit einer Verschlechterung des neurologischen Ergebnisses nahe. Zudem wird nach zerebraler Ischämie das Auftreten autoreaktiver Zellen gegen ZNS-Epitope beschrieben, welche eine größere Schädigung beim Reinsult bewirken können^{39,40,41}. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Saino et al. zeigen immundefizitäre *SCID*-Mäuse (Severe Combined Immunodeficiency) sowohl ein geringeres Infarktvolume und geringere Apoptoseraten in ischämisch betroffenen Hirnarealen als auch eine gesteigerte Aktivität von neuronalen Stammzellen, was als Hinweis einer erhöhten Regenerationsfähigkeit von Nervengewebe unter Immunsuppression gewertet wird³².

Unter diesen Gesichtspunkten spielt die Aktivierung des adaptiven Immunsystems nach ischämischem Schlaganfall, insbesondere während gleichzeitiger Infektion, eine entscheidend schädigende Rolle^{34,35}. Das SIDS kann hierbei als aktiver Mechanismus gegen eine ZNS-gerichtete Autoimmunantwort betrachtet werden.

15 THYMOPOESE DER T-LYMPHOZYTEN

Die vorliegende Studie untersucht den Thymus als Zielorgan einer neural gesteuerten Reaktion nach einem ischämischen Schlaganfall. Der Thymus ist ein primäres Organ des adaptiven Immunsystems, das seine Hauptfunktion in der frühen Entwicklungsphase eines Organismus ausübt. T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern hämatogen in den Thymus ein, differenzieren, werden selektiert und als adulte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten in die Körperperipherie ausgeschwemmt. Bis zum ersten Antigenkontakt verfügen diese naiven T-Lymphozyten (T_{nav}) über ein spezifisches Epitopmuster (CD27⁺, CD62L⁺ und CD45RA⁺) und bilden eine eigene Zellentität⁴².

Nach Extravasation ins Thymusinnere differenziert und proliferiert der Thymozyt in der ersten Woche seiner intrathymischen Entwicklung in der kortikomedullären Junktionszone^{43,44}. Anschließend migriert dieser in den Thymuskortex, wo die ersten *Rearrangements* (Umänderungen) im Genabschnitt des T-Zell-Rezeptors (TCR) als kritisches Überlebenssignal während der Positivselektion erfolgen⁴⁵. In der Kortexzone kommt es zur gleichzeitigen Expression von CD4⁺- und CD8⁺-Rezeptoren und zu weiteren *Rearrangements* des TCR⁴⁶. Des Weiteren vollzieht sich hier die positive Selektion nach Bindungsaffinität der TCR mit den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC). Nur Zellen mit ausreichend stabilem TCR-MHC-Kontakt entgehen der Apoptose

und gelangen nach Herunterregulierung eines Korezeptors als CD4⁺- bzw. CD8⁺-monopositive Thymozyten in das Thymusmark⁴⁷. Hier kommt es zur weiteren Reifung und Negativselektion⁴⁸. Während Letzterer wird durch Kontakt mit Antigen-Homunkuli aus thymischen Epithelzellen (TEC) die Mehrzahl der autoreaktiven Thymozyten entfernt⁴⁹. Nach diesen Differenzierungs- und Selektionsschritten verlässt der reife Thymozyt als rezenter thymischer Emigrant (RTE) den Thymus, um das Zellkompartiment naiver T-Lymphozyten aufzufüllen.

1.6 URSPRUNG DER TREC: V(D)J-REKOMBINATION

Bei der V(D)J-Rekombination handelt es sich um ein lymphozytenspezifisches genetisches *Rearrangement* zur Diversifikation von Immunglobulin- und TCR-Genen aus chromosomalen Gensegmenten. Über einen streng regulierten Austausch von Gensegmenten aus einem geringen genetischen Datensatz wird ein Repertoire von ca. 10⁹ verschiedenen Immunglobulinen bzw. TCR mittels dieser *Rearrangements* erstellt. Die Rekombination wird von den RAG-Enzymen (Recombinase Activating Genes) initiiert und vom V(D)J-Rekombinasekomplex durchgeführt. Nach einem bei allen Vertebraten identisch ablaufenden Prozess kommt es an den chromosomalen V(D)J-Rekombinationssequenzen über hierarchisch geordnete Reaktionen an den Rekombinationssignal-Sequenzen (RSS) zu einer Neuzusammensetzung des Chromosomenabschnitts⁵⁰. Der im Genom verbleibende Rest der Rekombinationssequenz bildet das Template zum spezifischen Immunglobulinbauplan des jeweiligen Lymphozyten. Ein Lymphozyt verfügt nach seiner Reifung somit über einen inkompletten genetischen Datensatz und die produzierten Immunglobuline oder exprimierten TCR sind für die spezifische Zelle gleich⁵¹. Exzidierte Genabschnitte, sogenannte *Signal Joints*, verbleiben als episomale Restprodukte ein Zellleben lang im Zytosol des jeweiligen Lymphozyten. Die *Signal Joints* von T-Lymphozyten werden auch *T-Cell Receptor Excision Circle* (TREC) genannt. Vier TCR-Gene kodieren zwei Arten von Heterodimeren: erstens den $\alpha\beta$ TCR, der von über 85 % der T-Lymphozyten exprimiert wird, und zweitens den $\gamma\delta$ TCR, der von 2 – 14 % der T-Lymphozyten exprimiert wird⁵². Während der Thymopoese wird eine Früh- und Spätphase der TCR-Rekombination unterschieden. In Letzterer führt die TCR δ -Deletion zur Einleitung der $\alpha\beta$ TCR-Linie. Dabei bildet die δ Rec- ψ J α -Deletion⁵³ das am häufigsten auftretende Ereignis während der TCR δ -Deletion und tritt nach der Mehrzahl der thymozytären

Zellteilungen auf⁵⁴. Der $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha\text{-TREC}$ wird dabei von ca. 70 % der $\alpha\beta\text{TCR}$ enthaltenden Zellen exzidiert, nachdem 75 % der intrathymischen Zellteilungen erfolgt sind. Somit ist der $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha\text{-TREC}$ am besten für eine quantitative Untersuchung der Thymusfunktion geeignet⁵⁵.

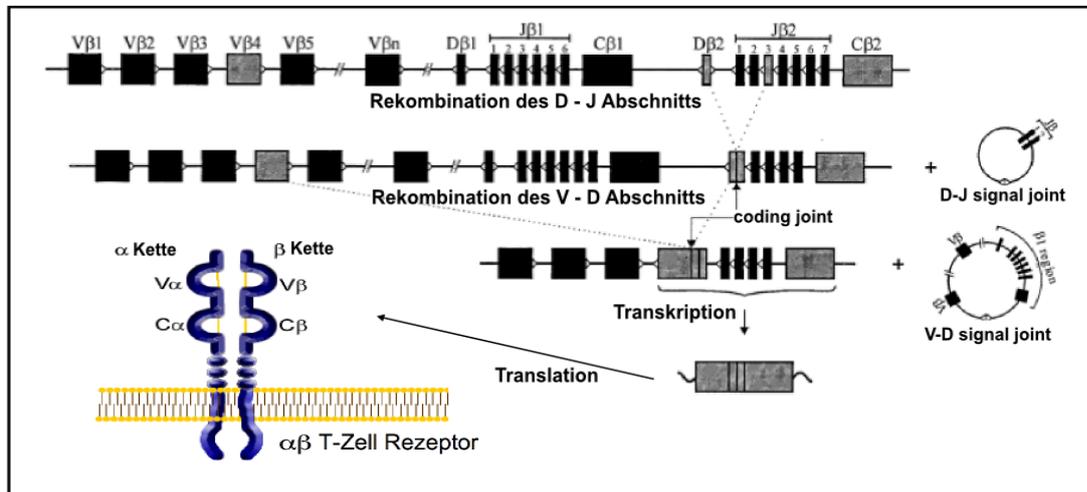


Abb. 1: Schematische Darstellung der TCRD Rekombination. Die exzidierte DNA wird zirkulär ligiert und als TREC ins Zytosol abgegeben. Der $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$ TREC ist spezifisch. Grafik nach Hazenberg et al.

TREC wurden als optimale Zielmoleküle zur quantitativen Untersuchung der Thymusfunktion bestimmt⁵⁶. Sie können in Thymozyten als auch in reifen T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Sie replizieren nicht und werden durch Zellteilung verdünnt^{57,58}. Da sie nur während der Thymopoese entstehen und während der Zellteilung nicht kopiert werden, können sie lediglich in thymischen Emigranten nachgewiesen werden⁵⁶. In der Literatur wird bei Menschen in der Adoleszenz der Thymusexport auf 10^7 bis 10^8 T-Zellen pro Tag geschätzt⁵⁹.

1.7 DIE STEUERUNG DES THYMUS

Die Kontrolle der Thymusfunktion ist komplex. Sie wird maßgeblich auf vegetativem und endokrinem Weg ausgeübt und beinhaltet die intrathymische Signalverarbeitung wie auch extrathymische Steuerungs- und Rückkopplungssysteme^{27,60,61}. Die vegetative Innervation ist sympathisch dominiert^{62,63}, in geringerem Maße werden Rezeptoren für ACh, GABA und das Neuropeptid Y beschrieben⁶⁴. Bei Säugetieren sind adrenerge β_2 -Rezeptoren auf einem Großteil der immunkompetenten Zellen präsent, darunter auch auf Thymozyten und TEC^{26,65}. Eine hohe Nervenfaserdichte ist im Thymuscortex und in

der Junktionszone nachgewiesen⁶⁶. Eine intensive neurogene Kontrolle der Thymozytenpopulationen wird während der späten Positivselektion im Thymuskortex als auch am Übergang vom Thymus in das Gefäßsystem postuliert⁶⁰.

Bidirektionale Beziehungen bestehen zwischen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und thymischer Mikroumgebung⁶⁵. Hypophysenhormone verfügen über immunmodulatorische Eigenschaften. Der Thymus beeinflusst wiederum die hypothalamisch-hypophysäre Funktion über Zytokine. Zusätzlich werden Zytokine von hypothalamischen oder hypophysären Zentren produziert und im Gegenzug klassische hypothalamisch-hypophysäre Hormone wie Prolactin (PRL), Wachstumshormon (GH) und Glukokortikoide von TEC synthetisiert⁶⁷.

1.8 DER ALTERNDE THYMUS

Altern stellt auf physiologischer Ebene einen komplexen und fortschreitenden Prozess dar, welcher alle Organe betrifft und zu deren qualitativer wie quantitativer Funktionsbeeinträchtigung führt, die sich in strukturellen und morphologischen Veränderungen niederschlägt⁶⁸.

Immunologisch betrachtet ist Altern assoziiert mit einer erhöhten Inzidenz von Infektionen, Tumoren und Autoimmunpathologien, welche als Schwächung bzw. Änderung der Immunantwort interpretiert werden können⁶⁹. Hinsichtlich Funktion und Reaktionsfreudigkeit des lymphatischen Gewebes unterliegt das Immunsystem Veränderungen, die als Immunseneszenz bezeichnet werden^{70,71}. Einen dramatischen Einschnitt bildet hierbei die Thymusinvolution im Adoleszentenalter. Entgegen weitverbreiteter Auffassung, nach welcher die Thymusfunktion während der Adoleszenz erlischt, ist dank besserer Untersuchungstechniken eine exponentielle Abnahme der Thymusfunktion mit einer Persistenz der T-Zell-Produktion selbst im hohen Alter nachgewiesen^{56,72}. Es wird vermutet, dass die Thymusinvolution durch Änderung der Hormonausschüttung beim Heranwachsenden initiiert wird und im Weiteren durch das ebenfalls alternde endokrine System beschleunigt wird⁷³, insbesondere da die Thymusfunktion im Tierversuch durch endokrine Manipulation gesteigert werden konnte⁷⁴. Während der Thymusinvolution kommt es zusätzlich zur Vermehrung der intrathymischen vegetativen Nervenfasern und zu einem Anstieg der β_2 -Adrenozeptoren, was eine erhöhte Suszeptibilität des Thymus gegenüber sympathischer Neuroregulation nahelegt⁷⁵.

1.9 DIE T-ZELL-HOMÖOSTASE: EIN WEITER OZEAN

T-Lymphozyten unterliegen einer stringenten homöostatischen Regulation. Einerseits muss eine Zellreserve zur effektiven Reaktion auf exogene Reize bereitstehen, andererseits muss eine ausufernde Reaktion verhindert werden. Des Weiteren müssen neben Zellen gegen bekannte Antigene, sogenannte *memory* T-Lymphozyten (T_{mem}) auch Zellen gegen bisher unbekannte Antigene, die naiven T-Lymphozyten (T_{nav}) vorgehalten werden. Die Lymphozytenhomöostase ist ein dynamischer Prozess und das homöostatische Gleichgewicht kann nach Bedarf variieren. Die Modulation erfolgt auf immunologischem und neuronalem Weg oder direkt über die Zellumgebung^{76,77}. Die T-Lymphozyten sind in funktionellen Kompartimenten organisiert, auch *T-Zell-Pools* genannt. Größe und Aktivität der T-Zell-Pools wird in den sekundären lymphatischen Organen reguliert⁷⁸.

Innerhalb der T-Lymphozyten existieren drei große Kompartimente, das naive- (T_{nav}), das regulatorische- (T_{reg}) und das effector/memory-Kompartiment (T_{mem}), von welchen jedes unterschiedliche Funktionen, Eigenschaften und Lebensspannen besitzt^{79,80}. Die einzelnen Kompartimente sind in verschiedenen Aktivitätszuständen unterschiedlich im lymphatischen Gewebe verteilt⁸¹. Der Erhalt dieses komplexen interdependenten homöostatischen Systems wird zellulär durch dendritische Zellen, T_{reg} -Lymphozyten und mononukleäre Zellen des angeborenen Immunsystems reguliert, welche über MHC- und Zytokinkontakte Apoptose- bzw. Überlebenssignale auslösen. Besondere Bedeutung nimmt hierbei die Expression von IL7 und die Herunterregulierung von IL2 und IL10 ein. Das Überleben von naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ -Lymphozyten ist ein aktiver Prozess, welcher in Anwesenheit von IL7 und bei wiederholtem MHC-TCR Kontakt die T-Zell-Apoptose hemmt⁸².

Zellen mit hohem TREC-Anteil sind fast ausschliesslich im T_{nav} -Kompartiment zu finden. Die Größe dieses Kompartimentes wird durch den Thymusexport, das Angebot an IL7 und die Konversion zum T_{mem} -Phänotyp nach Antigenkontakt der naiven T-Zelle bestimmt^{76,83}. Des Weiteren ist eine vegetative neuronale Kontrolle der T-Zell-Homöostase bekannt²⁷. Die Zellselektion innerhalb des T_{nav} -Kompartimentes unterliegt

neben der Expansionskapazität der T-Lymphozyten und der Affinität des MHC-TCR-Kontaktes auch stochastischen Faktoren⁸². Gleichzeitig gibt es Hinweise für Mechanismen, welche den Erhalt kleiner TCR-Klonreihen sichern und somit die Diversität des T_{nav} -Kompartimentes erhalten^{78,84}.

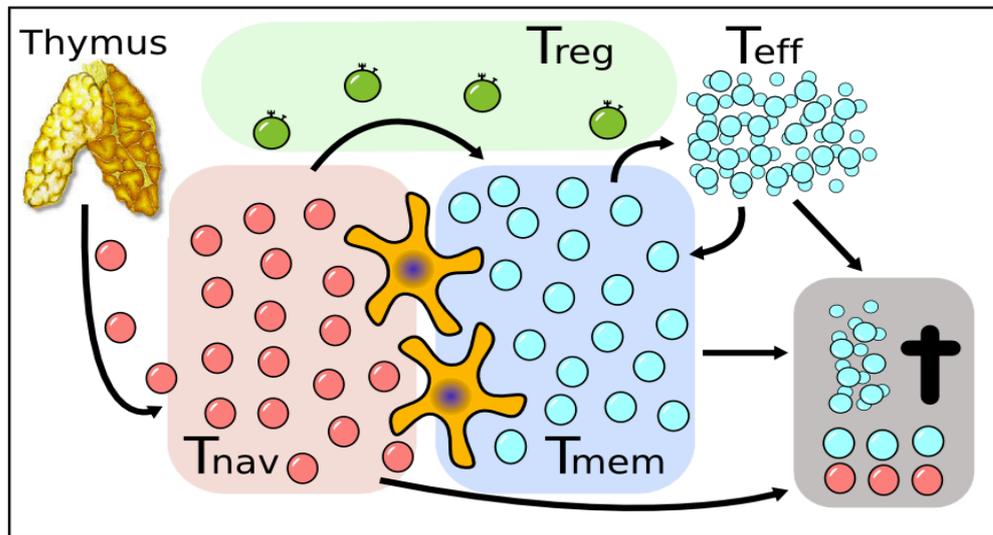


Abb. 2: Schematische Darstellung der T-Zell-Homöostase bei Vertebraten.

Die beiden großen T-Zell-Pools, T_{nav} und T_{mem} , sind symbolisch um dendritische Zellen gruppiert, welche deren Überleben sicherstellen. Gespeist werden beide Kompartimente aus dem Thymus, der Zellteilung sowie der Konversion aus dem naiven in den memory T-Zell-Pool. Die Immunreaktion und die Apoptose (†) stehen unter der Kontrolle der Treg- und dendritischen Zellen.

Bei Mäusen kann bedarfsbedingt die Größe der T_{nav} - und T_{mem} -Kompartimente durch unabhängige Regulationsmechanismen zum Teil erheblich schwanken, wird jedoch nach Ablauf einer Immunreaktion ausgeglichen. Hinter dem Aufrechterhalten gleich großer Kompartimente wird ein optimales Equilibrium zwischen Immunkompetenz und Antigendiversität bei Wirbeltieren vermutet⁸⁴. Im Alter bleibt das T_{nav} -Kompartiment trotz nachlassender Thymusaktivität aufgrund aktiver Homöostasemechanismen größenkonstant⁸⁵. Eine geringere Apoptoserate substituiert dabei den geringeren Thymusexport⁸³. Da rezente thymische Migranten (RTE) die Diversität und Verjüngung des T_{nav} -Kompartimentes sicherstellen, besitzen sie einen Selektionsvorteil und unterliegen weitaus seltener der Apoptose⁸⁶.

110 DIE THYMEKTOMIE

Die Myasthenia gravis pseudoparalytica stellt eine seltene HLA-assoziierte Autoimmunerkrankung mit progressiver Abnahme der tetanischen Anspannung der quergestreiften Muskulatur dar. Neben immunsuppressiver Therapie und Plasmapherese bildet die Thymektomie heutzutage ein Standardverfahren zur Reduktion der Morbidität⁸⁷. Ein signifikanter Abfall der TREC-Ratio im Vollblut nach Thymektomie ist beim Menschen aus der Literatur bekannt⁸⁸.

Thymektomierte Myasthenieprobanden wurden in der hier vorgestellten Arbeit als zusätzliche Kontrollgruppe untersucht. Zum einen dient die Thymektomiekontrolle als Methodvalidierung der verwendeten TREC-Quantifizierung, zum zweiten stellt sie eine Referenz für die Beurteilung einer Änderung der TREC-Ratio von Patienten mit ischämischem Schlaganfall.

2 HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Unter Annahme einer Schlaganfallinduzierten Immunsuppression mit einer Apoptose von Thymozyten und mit veränderter Thymusfunktion wurde aufbauend auf den experimentellen Vorarbeiten von Prass, Meisel et al.^{29,30} die Modulation des Immunsystems über die dynamische indirekte Messung der Thymusfunktion nach ischämischem Schlaganfall untersucht.

Gegenstand der Untersuchung war die Etablierung einer Messmethode und Evaluation von TREC-DNA in vivo. Die Studie beinhaltete Untersuchungen an Probanden mit akutem ischämischen Schlaganfall und tierexperimentelle Untersuchungen am murinen Schlaganfallmodell.

Die Hypothesen lauten:

1. Infolge des ischämischen Schlaganfalls beim Menschen kommt es zu einer signifikanten Verminderung der TREC-Ratio im Blut als Ausdruck einer Suppression der Thymusaktivität.
2. Infolge des experimentellen Schlaganfalls (MCAO) bei der Maus kommt es zu einer signifikanten Verminderung der TREC-Ratio im Blut bzw. in der Milz durch erniedrigten Thymusexport.

Die Nebenhypothese lautet:

1. Die TREC-Ratio nach erfolgter Thymektomie beim Menschen ist signifikant geringer als die altersabgeglichene TREC-Ratio gesunder Probanden.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 EINFÜHRUNG

Die hier vorgestellte klinisch-experimentelle Arbeit untersucht quantitative Unterschiede von TREC Episomen beim Menschen und bei der Maus.

Im klinischen Teil erfolgte die Untersuchung der Blutproben von Probanden nach ischämischem Schlaganfall bzw. Thymektomie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die Schlaganfalluntersuchung war eingebunden in die PANTHERIS-Studie der Neurologischen Klinik der Charité Berlin zur Beurteilung der prophylaktischen Gabe von Moxifloxacin nach ischämischem Schlaganfall. Dieser Studie liegen ausführliche experimentelle Vorarbeiten der Klinik zugrunde^{28,29,30}.

Ergänzend wurden Gewebeproben aus Blut, Milz und Thymus von Mäusen nach experimentellem Schlaganfall (MCAO) mit Kontrolltieren verglichen. Dadurch konnte die TREC-Dynamik direkt in den Organen Milz und Thymus untersucht werden. Bezüglich der murinen immunologischen Schlaganfalluntersuchungen existiert eine vergleichsweise breite Datenbasis in der Literatur^{89,90,91}.

Alle Abbildungen und Tabellen dieses Kapitels stammen aus der hier vorgestellten Studie.

3.2 VORBEREITENDE METHODEN

3.2.1 Patientenproben-Gewinnung

Nach Diagnosevalidierung und Studieneinschluss erfolgte die Abnahme der Blutproben von Probanden der PANTHERIS-Studie an Tag 1, 3, 8, 90 und 180 nach ischämischem Ereignis. Es wurden EDTA-Blutproben von insgesamt 36 Probanden mit ischämischem Schlaganfall im Stromgebiet der A. cerebri media (NIH-SS > 11) entnommen und untersucht. Parallel dazu wurde das Blut von neun gesunden altersabgeglichenen Probanden und 13 thymektomierten Myasthenia gravis Probanden als Kontrollgruppen analysiert. Das Votum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin lag vor, die Studie wurde unter der Registriernummer ISRCTN74386719 der Internationalen Datenbank für Kontrollierte Studien registriert (www.controlled-trials.com).

3.2.2 Maus-Untersuchungen

Die verwendeten Versuchstiere wurden mit dem Ziel der Tiertötung zur Organentnahme beim Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin (Projektnummer: G0063/04) bestellt. 29 männliche Tiere des Stammes C57/BL6 im Alter von zehn bis zwölf Wochen wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Sämtliche Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die zuständigen Landesbehörden und örtlichen Tierschutzbeauftragten (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin). Die Mäuse wurden stochastisch auf die Gruppen Nullkontrolle, Schlaganfalloperation (MCAO) und Operationskontrolle (Sham) verteilt, wobei die Operationsgruppen in die Kategorien Früh- und Spätgruppe (Tag 3 und Tag 21 nach Operation) unterteilt waren. Da in früheren Untersuchungen eine Letalität der Schlaganfalltiere von 40 % nach sieben Tagen postoperativ bekannt war, wurden in die MCAO-Spätgruppe 9 statt 5 Tiere eingeschlossen.

Nullkontrolle: 5 Tiere

MCAO-Frühgruppe: 5 Tiere, untersucht 4 Tiere, 1 Tier verstorben

MCAO-Spätgruppe: 9 Tiere, untersucht 5 Tiere, 4 Tiere verstorben

Sham-Frühgruppe: 5 Tiere, untersucht 4 Tiere, 1 Tier verstorben

Sham-Spätgruppe: 5 Tiere, untersucht 4 Tiere, 1 Tier verstorben

3.2.3 Das Schlaganfallmodell der *Middle Cerebral Artery Occlusion*

Das MCAO-Modell stellt ein etabliertes murines Modell zur Untersuchung der zerebralen Ischämie dar⁹². Das Modell entspricht einem schweren ischämischen Mediainfarkt beim Menschen. Im standardisierten Verfahren wird nach Anästhesie über einen linken zervikalen Zugang ein monofiler Nylonfaden in die A. carotis interna eingeschwenkt und diese für 45 min verschlossen. Anschließend

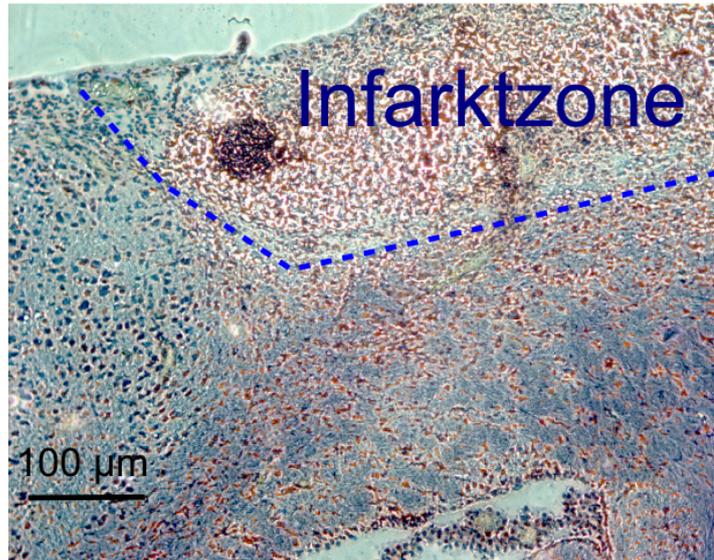


Abb. 3: Schnittbild eines Maushirns 72 h nach MCAO (5 µm HE). Für alle Tiere wurde zum Nachweis der erfolgreichen MCAO ein lichtmikroskopischer Nachweis durchgeführt.

wird der Faden entfernt und das Tier chirurgisch versorgt. Postoperativ findet eine funktionelle Kontrolle des neurologischen Defizits statt. In vorliegender Arbeit wiesen alle MCAO-Tiere postinterventionell eine rechtsseitige Hemiparese auf. Parallel erfolgte zur Minimierung eingriffsbedingter Effekte ein identischer Eingriff bis zur Darstellung der linken A. carotis communis bei der Sham-Gruppe.

3.2.4 Zellisolierung aus Organgewebe

Am 3. postoperativen Tag erfolgte die Sakrifizierung der Kontrolltiere, der MCAO-Frühgruppe und der Sham-Frühgruppe, am 21. postoperativen Tag die der Spätgruppen. Nach Sakrifizierung wurden den Tieren 200 – 500 µl Vollblut, die Milz, der Thymus und das Gehirn entnommen. Letzteres wurde nach Entnahme in Methylbutan bei - 40 °C kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt lichtmikroskopisch ausgewertet.

Leukozytenelution aus parenchymatösem Gewebe

- Filtration der Organe über ein Netz der Meshgröße 100 µm in RPMI Medium
- zweimalige Spülung mit RPMI Medium, Zentrifugation 5 min, 250 g, 4 °C
- Filtration über einem Netz der Meshgröße 40 µm
- Zentrifugation 5 min, 250 g, 4 °C; Resuspension in PBS

3.2.5 Zellisolierung aus dem peripheren Vollblut

10 – 15 ml EDTA-Vollblut wurden den Studienprobanden während der Visitenzeitpunkte abgenommen. Die Mausproben der Sakrifizierungszeitpunkte 3. und 21. Tag enthielten 0,2 – 0,5 ml EDTA-Vollblut. Nach Probengewinnung erfolgte die Separation der Leukozyten mittels der Dichtezentrifugation. Von jeder Probe wurde die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt und durchschnittlich Größen von über 10^7 / ml EDTA-Vollblut beim Menschen und 10^8 / ml EDTA-Vollblut bei der Maus erreicht.

3.2.6 Magnetisch assoziierte Zellsortierung (MACS)

Bei der MACS (Magnetic Associated Cell Sorting) handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Sortierung von Zellen anhand magnetischer Antikörper⁹³. Dabei erfolgt die Zellseparation über die Zelladhäsion im magnetischen Feld. Das MACS-Verfahren ist zellschonend und wurde wegen des geringen Interaktionsrisikos mit nachfolgenden Verfahren anderen Sortierprozeduren gegenüber bevorzugt. Nach Resuspension der isolierten Leukozyten wurden 30 μ l zur molekularbiologischen Untersuchung der Gesamtfraktion PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) und 100 μ l zur MACS-Separation entnommen. Die Reinheit aller Zellfraktionen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie überprüft.

MACS Separation:

- 100 μ l Zellsuspension mit 25 μ l magnetischen CD4- bzw. CD8-Antikörpern,
- Inkubation 10 min, 4 °C
- Waschung mit MACS Puffer, Zentrifugation, 10 min, 300 g, 20 °C
- Filtration über der Sortierkolumne, Spülung mit MACS Puffer
- Ernten der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Fraktion

3.2.7 Immunphänotypisierung mittels FACS

Die Spezifität der magnetischen Separation wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) kontrolliert. Das Zytometer arbeitet mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen Zellbestandteile. Es wurden Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD4, CD8 und CD3 als allgemeine T-Zell Marker verwendet. Durch den Einsatz einer Zweilaseroptik ist neben der Größe und Dichte einer Zelle die gleichzeitige Messung von bis zu vier verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern zur Zellidentifikation möglich.

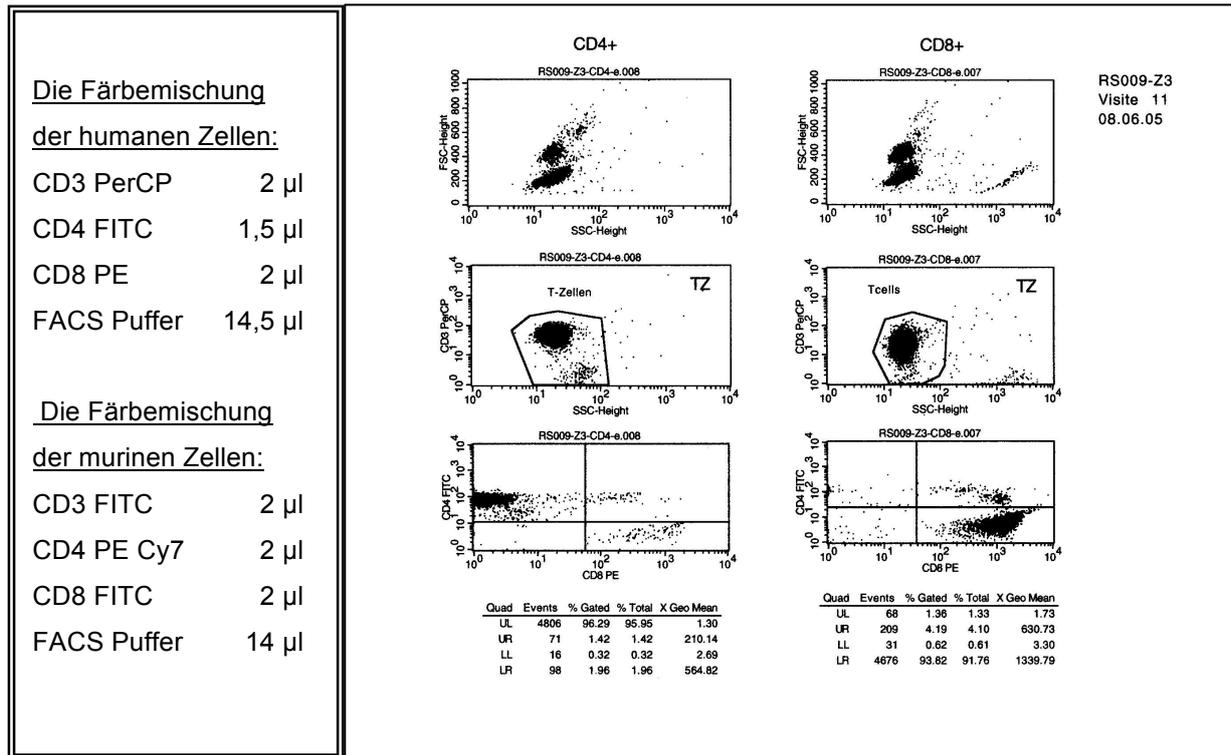


Abb. 4: FACS-Diagramm nach MACS-Sortierung bei einem Schlaganfallprobanden. Grundsätzlich wurde eine Spezifität von ca. 95 % erreicht.

- Das Färbeprotokoll der Lymphozyten

 - Zugabe von 20 µl Fluoreszenzmischung zu 50 µl Zelleluat, Inkubation, 30 min, 4 °C
 - Zugabe 500 µl Ery-Lyse Puffer, Inkubation 5 min, Zentrifugation 5 min, 250 g, 20 °C
 - Zugabe von 1 ml FACS Puffer, Zentrifugation 5 min, 250 g, 20 °C

3.2.8 DNA-Extraktion mit der Spin Column Methode

Die DNA-Extraktion wurde mit einem kommerziellen System nach der pH-Adhäsionsmethode durchgeführt. Hierbei wird die DNA aus dem Lysat an eine pH-aktive Siliziummembran gebunden, gereinigt und anschliessend herausgewaschen. Menge und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt.

- DNA Extraktion mit der Spin Column

 - Zelllyse mit 200 µl Zellgemisch, 20 µl Proteinase K und 350 µl Lysepuffer
 - Inkubation im Thermomixer, 10 min, 70 °C, 900 U/min
 - Zentrifugation, 3 min, 14.000 g, 20 °C; Zugabe von 200 µl Isopropanol
 - Zentrifugation, 2 min, 14.000 g durch eine pH-aktive Membrankolumne
 - Verwerfen der Durchflussfraktion, zweimalige Waschung der Membrankolumne mit Ethanol 80 %, 1 bzw. 3 min, 14.000 g, 20 °C
 - Elution mit 50 µl TRIS Puffer bei 70 °C zur Lösung der DNA von der Membran
 - Herauswaschen der DNA mittels Zentrifugation, 1 min, 14.000 g, 20 °C

3.2.9 Agarose Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese im Agarosegel trennt durch Passage in einem elektrischen Feld ein DNA-Gemisch nach Molekülgröße auf. Anhand eines gleichzeitig aufgetragenen Kalibrierungsmarkers, des DNA-Ladders, kann die Basenpaarlänge der DNA-Probe ermittelt werden. Mit speziellen SMART-Laddern und sensiblen Scannern lassen sich anhand der Fluoreszenzdichte des interkalierenden Ethidiumbromids exakte quantitative Untersuchungen durchführen.

DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

- Auftragen der PCR-DNA auf ein 0,8%iges Agarosegel mit Orange G als Farbstoff
- Gelelektrophorese, 125 mA, 5 mV / cm Elektrodenabstand
- Ausschneiden der gesuchten Banden unter UV-Kontrolle
- Auflösung des Gels mit Lyse-Puffer im Thermomixer, 70 °C, 10 min
- Zentrifugation über Adhäsionsmembran, zweimalige Waschung
- Elution der haftenden DNA mittels TRIS-Puffer
- photometrische Quantifizierung, Lagerung bei -20 °C

3.3 KLONIERUNG

Klonierung ist ein Prozess zum Vervielfältigen von DNA-Sequenzen durch Einschleusung in prokaryote Wirtszellen unter Zuhilfenahme von Vektoren. Die transfizierten Zellen werden mittels eines Antibiotikaresistenzgens selektiert. Die Transfektion selbst erfolgt im gepulsten elektrischen Feld. Für die hier beschriebene Studie war das Klonieren der spezifischen DNA-Sequenz des TREC-Abschnittes aus zwei Gründen unerlässlich:

1. Sequenzierung der DNA-Produkte zur Methodvalidierung der TREC-PCR
2. Herstellung einer Standardkurve für die quantitative Echtzeit-PCR

Aus einer Proben-DNA erfolgte die Herstellung von DNA-Templates ohne Einzelbasenüberhang mittels Pfu-PCR. Diese *blunt-end-DNA* ist für die Plasmidinsertion in den *pcr Blunt II TOPO* Vektor notwendig. Die Extraktion der PCR-DNA aus dem Elektroforesegel erfolgte mit einem kommerziellen System nach Herstellerangaben.

Vektortransfektion mittels Elektroporation

Für das Reaktionsgemisch wurde 1 µl pcr II Blunt TOPO® Vektor mit 4 µl PCR-DNA (5 – 20 ng/µl) und 1 µl 0.1 M NaCl-Lösung verwendet.

- Inkubation, 20 °C, 5 min; danach Reaktionsstopp auf Eis
- 2 µl des Gemisches werden mit 20 µl TOP10® Bakterienlösung vermischt
- Elektroporation und sofortige Resuspension in 1000 µl SOC Medium
- Induktion der Kanamycinresistenz, 45 min, 37 °C, 600 U/min
- in Verdünnungsreihen wird anschließend der Transfektionsansatz auf Kanamycin enthaltende Agarplatten verstrichen
- Inkubation für, 16 h, 37 °C

3.3.1 Klonierungsreaktion

Der *pcr Blunt II TOPO* Vektor enthält neben einem originärem pUC Vektorgerüst einen LacZα-Abschnitt, welcher die multiple Klonierungsstelle beinhaltet, sowie ein in Leserichtung folgendes Kanamycin-Resistenzgen. Die TREC-DNA wird über Restriktionsendonukleasen in die Klonierungsstelle inseriert, dadurch erfolgt auch die Aktivierung des Kanamycin-Resistenzgens. Die Klonierungsstelle wird von standardisierten M13-Sequenzen eingerahmt, um eine Amplifikation mit M13-Primern zu ermöglichen. Die Transfektion des Prokaryoten mit einem Vektor erfolgt im elektrischen Feld mittels Elektroporation. Kommerziell erhältliche TOP10-Stämme von *E.coli* sowie korrespondierende Plasmid-Vektoren wurden ohne Unterbrechung der Kühlkette im Eis aufgetaut. Die Extraktion der Plasmide erfolgte mit einem kommerziellen System nach Herstellerangaben.

Plasmidextraktion

- Verdünnen von 2 ml Inkubationskultur in 100 ml LB-Medium
- Inkubation, 12 h, 37 °C, 300 U/min
- Zentrifugieren der Bakterienlösung, 15 min, 6.000 g, 4 °C
- Resuspension der Zellen in 10 ml RNase enthaltenden 50 mM TRIS Puffer
- Vermischen mit 10 ml Lyse Puffer und Inkubation, 5 min, 20 °C
- Zugabe von 10 ml Neutralisationspuffer auf Eis
- Zentrifugation, 30 min, 20.000 g, 4 °C
- Überstand in ein mit Puffer equilibriertes Filterröhrchen (Qiagen Tip 500) geben, die Plasmide adhärenen pH aktiv an das Filtergewebe
- zweimalige Elution der Plasmid-DNA mit 15 ml TRIS Puffer
- Isopropanol-Ethanol Präzipitation der Plasmid-DNA, Waschung der DNA mit TRIS Puffer, photometrische Quantifizierung, Lagerung bei -20 °C

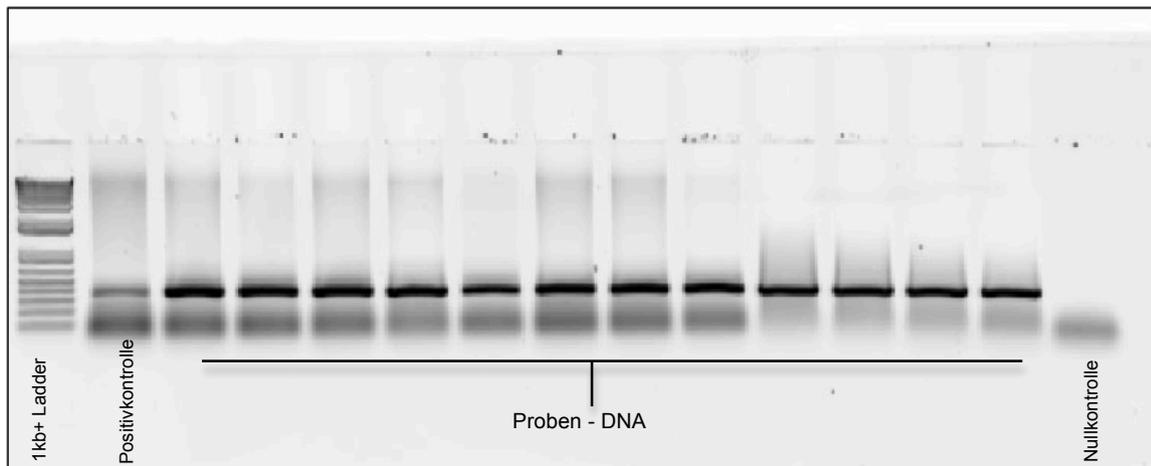


Abb. 5: Gelelektrophorese von humaner TREC-DNA nach PCR Amplifikation.

Typische Qualitätskontrolle nach einer Echtzeit TREC-PCR. Die gesuchte Bande der TREC-PCR liegt bei 376 kb.

3.4 SEQUENZIERUNG

Die Entschlüsselung des Basencodes eines einsträngigen DNA-Polymers erfolgt über die DNA-Sequenzierung. In dieser Arbeit wurde die modifizierte Didesoxy-Methode nach Sanger⁹⁴ verwendet. Über die M13-PCR wird die Ziel-DNA aus dem Plasmid isoliert, in zwei Einzelstränge getrennt und anschließend einer speziellen PCR mit nur einem Primer pro Reaktion unterzogen. Für jede Reaktion werden vier Proben mit üblichen desoxy-NTP (dNTP) verwendet. In jeder Probe wird anteilig ein Nukleotid durch ein fluoreszierendes didesoxy-NTP (ddNTP) ersetzt, welches einen Kettenabbruch der Polymerisierung bewirkt. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, welche in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Nach Reaktionsstopp mittels Formamid werden die Lösungen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, welches für die Sequenziermaschine vorbestimmte Geltaschen besitzt. Die Abbruchprodukte werden nach DNA-Ketten-Länge aufgetrennt und gleichzeitig laseroptisch nach Abbruchlänge und Abbruchnukleotid ausgewertet. Die so erstellte komplementäre Sequenz entspricht der originalen DNA-Sequenz.

Mit der ALF2 Sequenziermaschine konnte in der vorliegenden Arbeit eine Sequenzierungslänge von mehr als 800 bp mit einer Lesegenauigkeit von über 95 % erreicht werden. Dabei wurde für jedes der PCR-Primerpaare durch einen Vergleich mit der genetischen Datenbank des NCBI (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>) eine korrekte Amplifikation der gesuchten Genabschnitte nachgewiesen.

3.5 DIE POLYMERASEKETTENREAKTION

Die PCR ist eine Methode zur schnellen Vervielfältigung von DNA⁹⁵. Zu der doppelsträngigen Zielsequenz werden spezifische DNA-Primer gewählt und synthetisiert. Diese setzen an beiden Strängen der Zielsequenz an und legen den Startpunkt für die Polymerase fest. Sie repliziert die DNA mittels freier Nukleosidtriphosphate in 5' → 3' Richtung des DNA-Stranges repliziert. Durch diesen Schritt entsteht aus einem DNA-Einzelstrang ein DNA-Doppelstrang. Bei 95 °C denaturiert dieser in zwei komplementäre Einzelstränge und kann einen weiteren PCR-Zyklus durchlaufen. Für jede PCR muss je nach Zielsetzung eine Optimalreaktion ermittelt werden.

<u>Echtzeit-PCR (Lightcycler-System)</u>	
<u>Humane TRE -PCR (Lightcycler):</u>	<u>Humane CCR5-PCR (Lightcycler):</u>
Reaktionsmix für eine Probe (20 µl):	Reaktionsmix für eine Probe (20 µl):
Proben - DNA ca. 100 ng	Proben - DNA ca. 100 ng
MgCl ₂ Endkonzentration 3,5 mM	MgCl ₂ Endkonzentration 3 mM
FSM (Puffer/Polymerase) 2 µl	FSM (Puffer/Polymerase) 2 µl
Primer Mix (10 µM) 2 µl	Primer Mix (10 µM) 2 µl
steriles Wasser ad 20 µl	steriles Wasser ad 20 µl
<u>Murine TREC-PCR (Lightcycler):</u>	<u>Murine TOLL2-PCR (Lightcycler):</u>
Reaktionsmix für eine Probe (20 µl):	Reaktionsmix für eine Probe (20 µl):
Proben - DNA ca. 100 ng	Proben - DNA ca. 100 ng
MgCl ₂ Endkonzentration 4 mM	MgCl ₂ Endkonzentration 4 mM
FSM (Puffer/Polymerase) 2 µl	FSM (Puffer/Polymerase) 2 µl
Primer Mix (10 µM) 2 µl	Primer Mix (10 µM) 2 µl
steriles Wasser ad 20 µl	steriles Wasser ad 20 µl
<u>PCR-Konditionen (Roche Lightcycler) für Quantifizierungsreaktion:</u>	
<i>Inkubation 5 min bei 95 °C</i>	
<i>40 Zyklen à 30 sec bei 95 °C</i>	
<i>30 sec bei spezifischer Primer-Temperatur</i>	
<i>30 sec bei 72 °C</i>	
<i>Inkubation 5 min bei 95 °C</i>	
<i>Probenkühlung bei 4 °C</i>	

Additive PCR-Ansätze (Hybaid-System)

Pfu-PCR:

Reaktionsmix für eine Probe (50 µl):

Proben - DNA (100 ng/µl)	1 µl
dNTP	2,5 mM
Pfu Polymerase (2,5 u/50 µl)	1 µl
Pfu Puffer (Mg 10 µM)	5 µl
Primer Mix (50 µM)	2 µl
steriles Wasser	ad 50 µl

PCR-Konditionen (Hybaid PCRexpress) für Pfu-PCR:

Inkubation 5 min bei 95 °C

25 Zyklen à 45 sec bei 95 °C

45 sec bei spezifischer Primer-Temperatur

45 sec bei 72 °C

Inkubation 5 min bei 95 °C, Probenkühlung bei 4 °C

Sequenzierungs-PCR:

Zur Herstellung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Reaktionsmix für eine Probe (50 µl):

Proben - DNA (100 ng/µl)	1 µl
dNTP	2,5 mM
fluoresz. dNTP	2,5 mM
Taq Polymerase (2,5 u/50 µl)	1 µl
Taq Puffer (Mg 10 µM)	5 µl
M13 Primer Mix (50 µM)	2 µl
steriles Wasser	ad 50 µl

PCR-Konditionen (Hybaid PCRexpress) für Sequenzierungs-PCR:

Inkubation 5 min bei 95°C

30 Zyklen à 45 sec bei 95 °C

45 sec bei spezifischer Primer-Temperatur

45 sec bei 72 °C

Inkubation 5 min bei 95 °C, Probenkühlung bei 4 °C

Verwendete Primer

hTREC Primer (T_A 72° C, 3,5 mM MgCl₂, E=1,85, Produktlänge: 376 kb)

hTREC - Fwd: 5' - AAA GAG GGC AGC CCT CTC CAA GGC AAA - 3'

hTREC - Rev: 5' - AGG CTG ATC TTG TCT GAC ATT TGC TCC G - 3'

hCCR5 Primer (T_A 64° C, 3 mM MgCl₂, E=1,99, Produktlänge: 302 kb)

hCCR5 - Fwd: 5' - GAA GGT CTT CAT TAC ACC TGC AG - 3'

hCCR5 - Rev: 5' - GTT AGA GCT ACT GCA ATT ATT CAG G - 3'

mTREC Primer (T_A 58° C, 4 mM MgCl₂, E=1,96, Produktlänge: 115 kb)

mTREC - Fwd: 5' - CCT CTC TGA GGA ACA CGG AG - 3'

mTREC - Rev: 5' - CAC GAA GAG CTG AAC TTA TTG C - 3'

mTOLL2 Primer (T_A 59° C, 4 mM MgCl₂, E=1,98, Produktlänge: 322 kb)

mTOLL - Fwd: 5' - CTG AAT TTG TCC AGT ACA GGG - 3'

mTOLL - Rev: 5' - GTC TCC ATA GTA AAG GAT AGG - 3'

Sequenzier-Primer M13: (T_A 56°C, 2 mM MgCl₂, Produktlänge nach inserierter DNA variierend)

M13 - Fwd: 5' - GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'

M13 - Rev: 5' - CAC AGG AAA CAG CTA TGA CC - 3'

3.5.1 Die Quantitative Real Time PCR (Echtzeit-PCR)

Mit der hier beschriebenen quantitativen Echtzeit-PCR lässt sich über den Einsatz eines fluoreszierenden Interkalators, externen Standardkurven aus Verdünnungsreihen und gleichzeitiger Untersuchung von Referenzgenen die ursprüngliche Menge der Ziel-DNA in einer Probe bestimmen⁹⁶. Eine Qualitätskontrolle erfolgt am Ende eines PCR-Laufes über die Schmelzkurvenanalyse. Die Genauigkeit und die Geschwindigkeit dieser modernen PCR-Methode stellt das Hauptargument zur PCR gestützten TREC-Quantifizierung und den wichtigsten Schritt im Rahmen dieser Dissertation dar.

Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* interkaliert in doppelsträngige DNA und bildet einen DNA-Farbstoff-Komplex, welcher grünes Licht bei 521 nm emittiert. Am Ende eines Polymerisierungsschrittes der PCR ist dadurch eine direkte Messung der DNA-Menge in der Probe möglich. Eine exakte Quantifizierung gelingt erst ab einem signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Hintergrundfluoreszenz. Der zugehörige PCR-Zyklus wird *Crossing Point* (Cp) genannt, mathematisch definiert als das Maximum der 1. Ableitung der Fluoreszenzkurve.

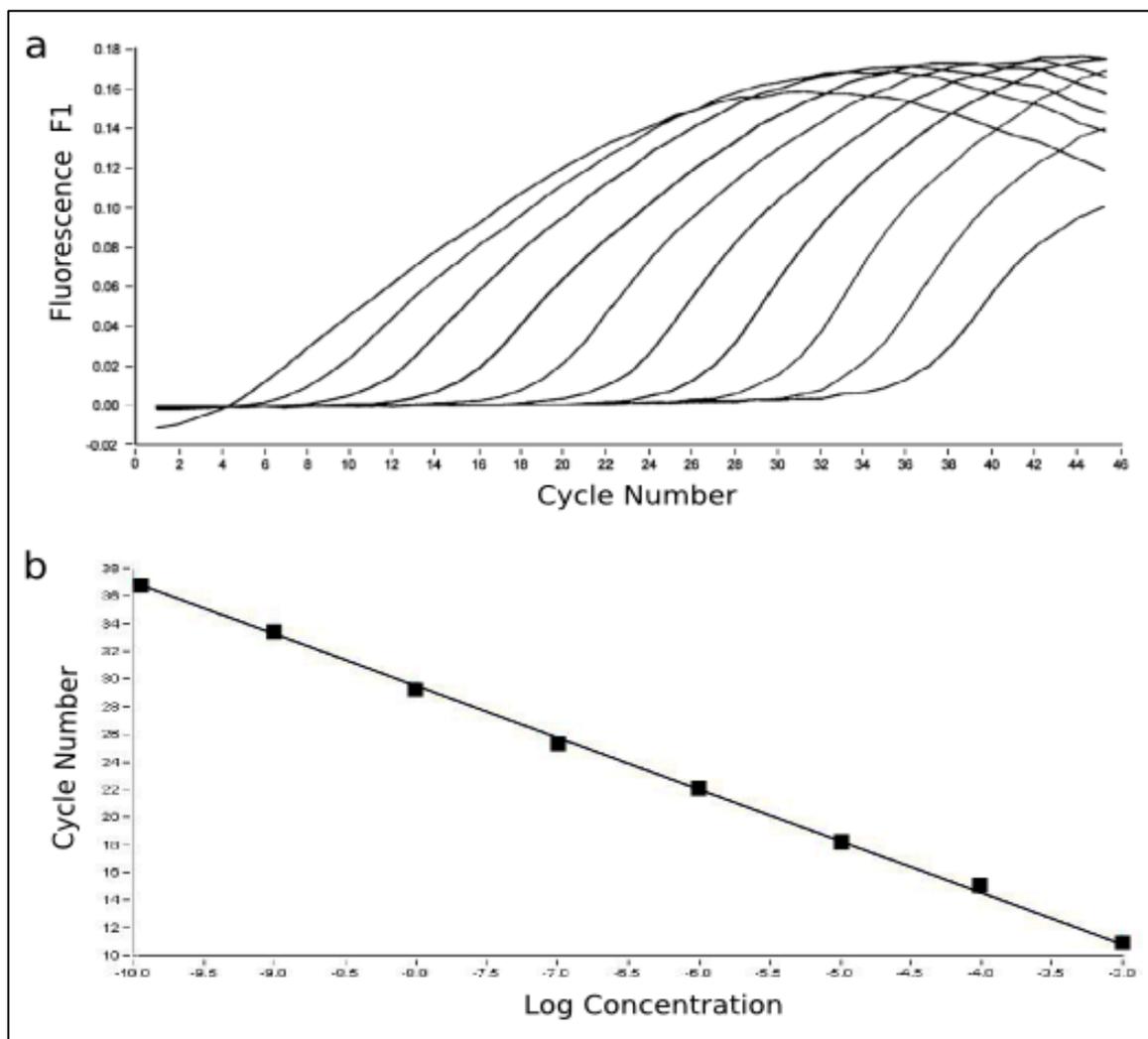


Abb. 6: Die Standardkurve für humane TREC-DNA.

Der homogene Anstieg der Fluoreszenz in der Titrierreihe (a) lässt sich als Summe aller Umschlagpunkte in der sog. Standardkurve darstellen (b). Der akkurate Verlauf der Standardkurve bis in den niedrigen Titrationsbereich stellt ein Maß der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR-Untersuchung dar.

Anhand von Verdünnungsreihen bekannter DNA-Menge eines Zielgens lässt sich aus den C_p der Verdünnungsproben im stabilen Bereich der PCR eine Gerade darstellen, die Standardkurve (s. Abb.6). Eine Standardkurve dient als Matrize für Proben unbekannter DNA-Menge eines Zielgens. Bei einem PCR-Lauf unter gleichen Konditionen lässt sich über das Auftragen des ermittelten C_p auf die Standardkurve die Menge an Ziel-DNA der unbekannt Probe berechnen. Die Standardkurve zeigt weiterhin über deren Steigung die Vervielfältigungsrate der Ziel-DNA pro Zyklus, die Effizienz E einer PCR-Reaktion an ($0 < E < 2$).

In dieser Studie ermöglicht die Standardkurvenanalyse die Ergebnisdarstellung in der Form „TREC/Gesamtzellzahl“ (s. Kap 8.3). Dazu werden Standardkurven von TREC-PCR und Referenzgen-PCR der gleichen Probe in Bezug gesetzt. Als Referenzgen

wurden die häufig verwendeten Referenzgene CCR5 bei Menschen und Toll2 bei der Maus verwendet.

Am Schluss des PCR-Laufes ermöglicht die Echtzeit-PCR eine Spezifitätsüberprüfung über die Schmelzkurvenanalyse. Zugrundeliegend ist die spezifische Denaturierungstemperatur eines DNA-Stranges aufgrund von Sequenz, Länge und Basenverhältnis.

Misst man die Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus vor Erreichen der Denaturierungstemperatur, erreicht man einen Messausschluss von Artefakt-DNA und damit eine hohe Spezifität der Messung. Am Ende des PCR Laufes wird bei langsam ansteigender Temperatur in Schritten von 0,5 °C die Fluoreszenz gemessen. Diese sog. Schmelzkurvenanalyse stellt alle PCR-Produkte eines PCR-Laufes und die jeweiligen Schmelztemperaturen dar und dient somit als Qualitätskontrolle (s. Abb.7). In den hier beschriebenen PCR-Ansätzen konnte über die Schmelzkurvenanalysen die absolute Spezifität der Messungen gezeigt werden.

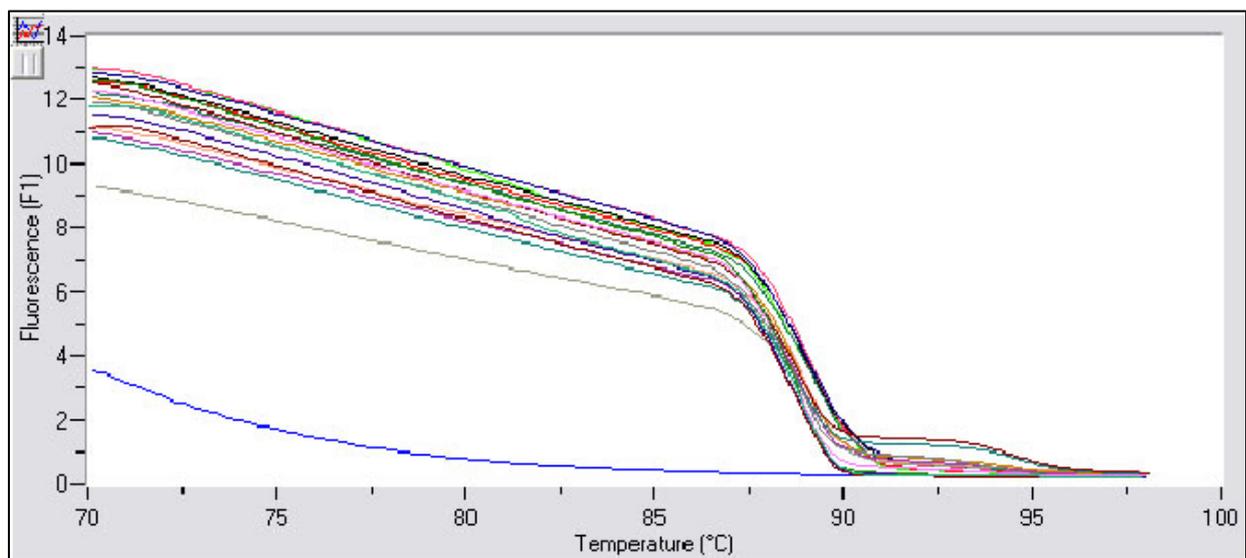


Abb. 7: Schmelzkurvenanalyse eines PCR-Laufes humaner TREC-DNA und Nullkontrolle.

Ersichtlich ist die spezifische Schmelztemperatur von 89 °C für die die verwendeten hTREC-Primer. Die blaue Kurve ist die Nullkontrolle. Da keine anderen Schwankungen der Kurve auftreten, ist dies ein Hinweis einer stabilen und spezifischen PCR.

Der Einsatz der Echtzeit-PCR mit Ziel- und Referenzgenen sowie der Abgleich an Standardkurven zeigten stabil reproduzierbare Untersuchungen bis in den Bereich von $10^1 - 10^2$ Templatkopien. Eine Ergebniskontrolle erfolgte zuverlässig über die Schmelzkurvenanalyse. Die Etablierung und Evaluation der TREC-PCR und der Kontroll-PCR zeigte nach entsprechender Optimierung der PCR-Reaktion bei humanen und murinen Pilotuntersuchungen eine hervorragende Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des Assays.

4 ERGEBNISSE

Das Kapitel ist in drei Abschnitte unterteilt. Zunächst werden die Ergebnisse aus dem Maus-Schlaganfallmodell mit Focus auf die Gruppen MCAO und Sham vorgestellt. Im zweiten Teil wird die Untersuchung der thymektomierten Probanden umrissen. Im dritten Teil werden die Untersuchungen an Studienprobanden vorgestellt. Nach Präsentation der Ergebnisse mit Hilfe einer deskriptiven Analyse erfolgt die Auswertung der multifaktoriellen Varianzanalysen und deren Validierung über eine ROC-Testung. Die signifikanten klinischen Gruppen werden charakterisiert. Als Überleitung zur Diskussion werden zum Schluß die relevanten Ergebnisse zusammenfassend dargestellt und ein Vergleich der experimentellen und klinischen Daten gezogen. Die benutzte Maßeinheit ist, bis auf gekennzeichnete Ausnahmen, die TREC-Ratio, definiert als $TREC / 10^5$ Zellen.

4.1 TREC IM EXPERIMENTELLEN SCHLAGANFALL

Bei den murinen Experimenten wurden die Tiere in die Gruppen Nullkontrolle, Shamkontrolle und ischämischer Schlaganfall (MCAO) aufgeteilt. Nach Operation der Sham- und MCAO-Gruppe erfolgte die Sakrifizierung der Gruppen Nullkontrolle, Sham und MCAO an Tag 3 sowie für die Gruppen Sham und MCAO zusätzlich an Tag 21. Untersucht wurden die Gewebe Blut, Milz und Thymus des jeweiligen Tieres. Die Auswertungen erfassten Veränderungen sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen zu den Zeitpunkten Tag 3 und Tag 21. Der Fokus der murinen Untersuchungen lag auf den Unterschieden zwischen der MCAO- und der Sham-Gruppe, da hierbei der ischämische Schlaganfall als einziger Differenzierungsfaktor vorausgesetzt werden konnte.

4.1.1 Die Odds Ratio der Operationsgruppen

Zunächst wurde die Mortalitätswahrscheinlichkeit der MCAO- und Sham-Gruppe mittels Odds Ratio (OR) Berechnungen ermittelt. Wie in Tab. 1 zu sehen, war das relative Mortalitätsrisiko der MCAO-Gruppe doppelt so hoch wie das der Sham-Gruppe (OR 2,2). Bei Differenzierung nach den Untersuchungszeitpunkten zeigte sich die Mortalitätswahrscheinlichkeit an Tag 3 vergleichbar (OR 1), während die Mortalitätswahrscheinlichkeit der MCAO-Gruppe an Tag 21 stark anstieg (OR 2,67). Die Mortalität der MCAO-Tiere ab dem 3. Tag nach Operation bildete somit den maßgeblichen Unterschied.

Tab. 1: Die Odds Ratio der Mortalität zwischen MCAO und Sham.

Dargestellt sind die Chancenverhältnisse für postoperative Mortalität. Während die Odds Ratio an Tag 3 gleich ist, steigt die Mortalitätswahrscheinlichkeit der MCAO-Gruppe am Tag 21 stark an.

Mortalität gesamt	verstorben	lebend	
MCAO	5	9	
Sham	2	8	
			OR 2.2

Mortalität Tag 3	verstorben	lebend	
MCAO	1	4	
Sham	1	4	
			OR 1

Mortalität Tag 21	verstorben	lebend	
MCAO	4	5	
Sham	1	4	
			OR 2.7

Weiterhin wurde die Odds Ratio von MCAO und Sham hinsichtlich eines Abfalls gegenüber der Nullkontrolle untersucht. Der Ereigniseintritt wurde als Abfall der TREC-Ratio von mehr als 10 % nach Intervention definiert. Nach Tab. 2 ist die Wahrscheinlichkeit einer niedrigen TREC-Ratio im Blut der MCAO-Gruppe an Tag 3 höher als in der Sham-Gruppe, vor allem in der CD4⁺- und CD8⁺- Population (OR >>1). Im Blut erweist sich die Odds Ratio in der Fraktion PBMC an Tag 21 umgekehrt, hier ist eine niedrige TREC-Ratio für die Sham-Gruppe wahrscheinlicher (OR 0,2). In der Milz ist an Tag 3 die Odds Ratio beider Gruppen ausgeglichen, an Tag 21 ist die Wahrscheinlichkeit eines Abfalls der TREC-Ratio in der Gesamtfraktion der Sham-Gruppe (OR<<1) erhöht. Im Thymus zeigt sich keine Änderung der TREC-Ratio zu allen Zeitpunkten.

Die Odds Ratio legt eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen Abfall der TREC-Ratio der MCAO-Gruppe nahe, wobei dieser hauptsächlich an Tag 3 im Blut auftritt.

BLUT

Blut PBMC Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	2	3	
Sham	1	3	
			OR 2

Blut CD4 Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	4	0	
Sham	1	3	
			OR >>1

Blut CD8 Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	4	0	
Sham	2	2	
			OR >>1

Blut PBMC Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	2	3	
Sham	3	1	
			OR 0.2

Blut CD4 Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	2	3	
Sham	2	2	
			OR 0.7

Blut CD8 Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	4	0	
Sham	4	0	
			OR 1

MILZ

Milz PBMC Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	0	4	
Sham	0	3	
			OR 0.8

Milz CD4 Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	1	3	
Sham	3	2	
			OR 0.7

Milz CD8 Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	0	4	
Sham	0	3	
			OR 0.8

Milz PBMC Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	0	4	
Sham	4	0	
			OR <<1

Milz CD4 Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	5	0	
Sham	4	0	
			OR 1.3

Milz CD8 Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	4	1	
Sham	2	2	
			OR 4

THYMUS

Thymus Tag 3	Abfall	konst.	
MCAO	0	4	
Sham	0	3	
			OR 0.8

Thymus Tag 21	Abfall	konst.	
MCAO	0	5	
Sham	0	4	
			OR 0.8

Tab. 2: Quotenverhältnis des postoperativen TREC-Abfalls zwischen MCAO und Sham.

Eine Odds Ratio (OR) größer als 1 zeigt eine höhere Wahrscheinlichkeit eines Abfalls der TREC-Ratio der MCAO-Gruppe und umgekehrt eine höhere Wahrscheinlichkeit des Abfalls der Sham-Gruppe bei OR kleiner 1.

4.1.2 Varianzanalyse des experimentellen Schlaganfalls

1. Schritt: Unterschiede zwischen den Gruppen

Hier wurden zunächst einfaktorielle Varianzanalysen bezüglich des Faktors Gruppe an den Zeitpunkten Tag 3 und Tag 21 gerechnet. Die Korrektur des Signifikanzniveaus für die Paarvergleiche erfolgte nach Dunn-Sidak. Um auch für den Spätzeitpunkt testen zu können, wurden für die Nullkontrollen die Werte von Tag 3 übernommen. Die Testergebnisse treffen eine Aussage darüber, ob sich die TREC-Ratio der drei Gruppen ohne Berücksichtigung des Zeitverlaufs signifikant voneinander unterscheiden. Wie im Anhang (Tab. 8 und Tab. 9) zu sehen, zeigten sich signifikante Unterschiede der Gruppen hauptsächlich in der Milz zum Zeitpunkt Tag 21.

Die einfaktorielle Varianzanalyse der Gruppen stellte eine signifikant erhöhte TREC-Ratio der MCAO-Gruppe am Tag 21 in den Kompartimenten Milz-Gesamtzellen und Milz-CD4⁺ heraus.

2. Schritt: Testen unter Einbeziehung des Zeitfaktors

Während bei dem ersten Auswertungsschritt keine Aussage über den möglichen Zeiteffekt getroffen wird, lässt sich mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse für die Gruppen MCAO und Sham auch eine Aussage über den möglichen Zeiteffekt treffen.

(s. Tab. 10 im Anhang). Der Zeitfaktor wurde dabei nicht als Messwiederholungsfaktor berücksichtigt, da von einem Tier nicht an zwei Zeitpunkten Messwerte erhoben werden konnten. Es handelt sich somit um den klassischen Fall der Varianzanalyse mit zwei unabhängigen Faktoren, einer zweifaktoriellen ANOVA.

Die Testergebnisse treffen eine Aussage darüber, ob eine signifikante dynamische Änderung der TREC-Ratio innerhalb der Gruppen MCAO bzw. Sham zwischen Tag 3 und Tag 21 stattgefunden hat.

4.1.3 Ergebnisse am Maus-Schlaganfallmodell

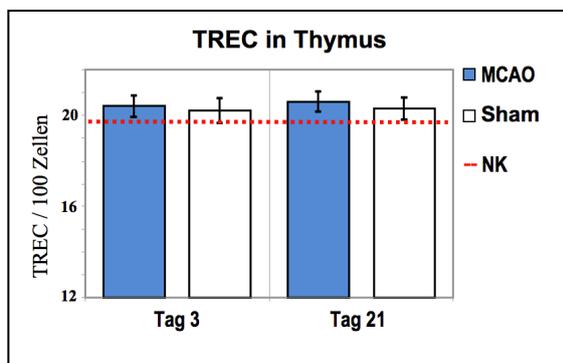
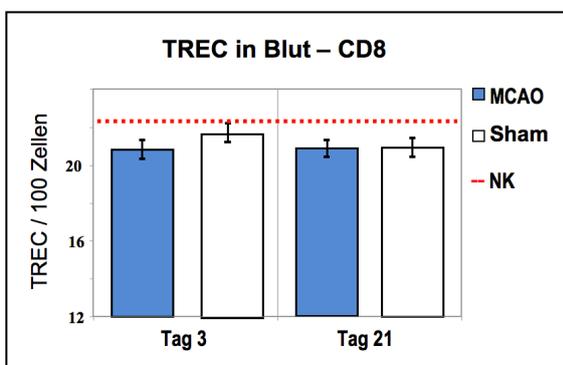
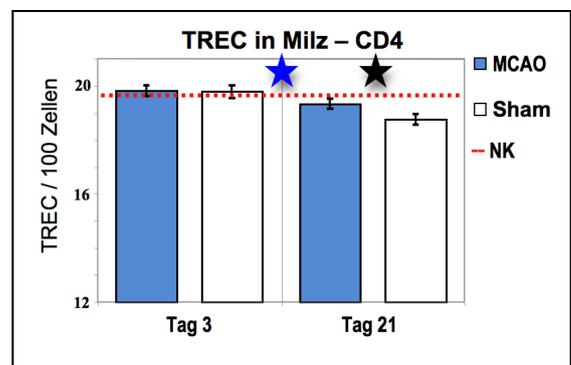
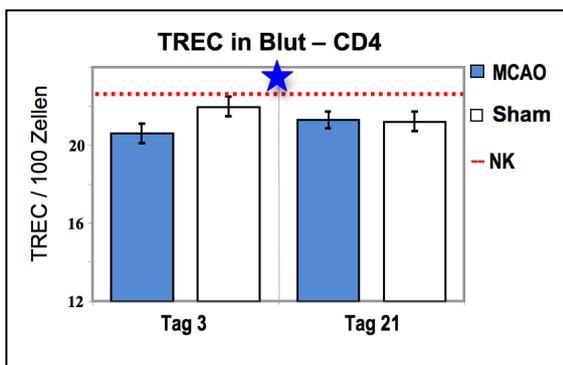
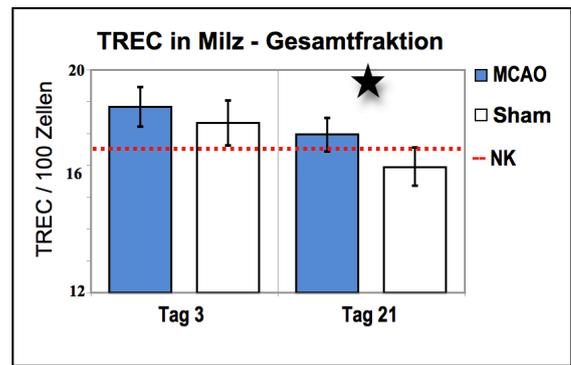
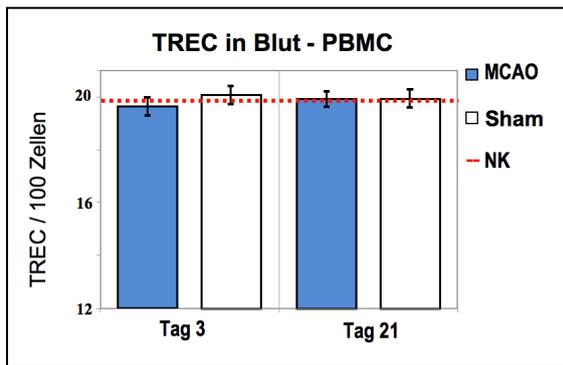


Abb. 8: TREC-Ratio von MCAO und Sham im Verlauf. Dargestellt sind nach Körpergewebe unterteilte Balkendiagramme der TREC-Ratio zum Früh- und Spätzeitpunkt. Die signifikanten Unterschiede zwischen MCAO und Sham eines Untersuchungszeitpunktes sind mit einem schwarzen Stern, die signifikanten Unterschiede zwischen Tag 3 und Tag 21 mit einem blauen Stern gekennzeichnet. Die TREC-Ratio der Nullkontrollen (NK) ist als rote Linie eingetragen.

Die TREC-Ratio der Milz weist die höchsten Schwankungen und die meisten signifikanten Unterschiede der untersuchten Gewebe auf. Insbesondere zeigt sich in der Gesamtzellfraktion der Milz zu beiden Messzeitpunkten eine erhöhte TREC-Ratio der MCAO-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe und der Nullkontrolle (s. Abb. 8). In den Fraktionen MCAO und CD4⁺ der Milz ist die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe am Tag 21 signifikant höher als die der Shamkontrolle ($p = 0.017$ bzw. 0.001). Im Blut zeigt sich vor allem am Tag 3 eine erniedrigte TREC-Ratio der MCAO-Gruppe verglichen mit der Sham-Gruppe und der Nullkontrolle.

Eine signifikante dynamische Änderung der TREC-Ratio ergibt sich in der CD4⁺-Population sowohl im Blut ($p = 0.008$) als auch in der Milz ($p = 0.015$). Wie in Tab. 6 im Anhang gezeigt fällt die TREC-Ratio in der Milz zwischen Tag 3 und Tag 21 signifikant in der MCAO- und Sham-Gruppe in allen Fraktionen (MCAO: $p = 0.02$, CD4⁺: $p = 0.01$, CD8⁺: $p = 0.01$). Hingegen kommt es im Blut zwischen Tag 3 und Tag 21 bei der MCAO-Gruppe zu einem Anstieg, in der Sham-Gruppe zu einem Abfall der TREC-Ratio. In der CD4⁺-Fraktion des Blutes ist dies signifikant ($p = 0.008$). Im Thymus zeigt sich die TREC-Ratio der operierten Gruppen höher als die der Nullkontrollen, in der MCAO-Gruppe ist der Anstieg signifikant. Zumindest am Tag 21 wäre dabei aufgrund des jüngeren Sakrifizierungsalters eine höhere TREC-Ratio der Nullkontrollen zu erwarten.

Insgesamt deutet die Varianzanalyse der MCAO-Tiere auf eine entgegengesetzte Dynamik der TREC-Ratio im Blut und in der Milz. Während die TREC-Ratio im Blut tendenziell von einem niedrigen Wert ausgehend ansteigt, fällt sie in der Milz von einem hohen Wert ab. Die Signifikanzanalyse legt eine gleichgerichtete Tendenz mit der zuvor beschriebenen Odds Ratio Berechnung nahe. Die Dynamik der TREC-Ratio verhält sich sowohl bei der Betrachtung des Chancenverhältnisses als auch bei der Varianzanalyse in den Geweben Blut und Milz tendenziell gegenläufig.

4.2 TREC NACH THYMEKTOMIE

Die Nachuntersuchungen der thymektomierten Probanden fanden in einem Zeitraum zwischen einem und neun Jahren nach Thymektomie statt. Tab.3 charakterisiert alle 13 Studienteilnehmer nach Alter, Krankheitsdauer und Thymektomiezeitpunkt. Bei neun von 13 Probanden erfolgte die Thymektomie ein Jahr nach Erstdiagnose. Jeweils ein Proband wurde fünf bzw. elf Jahre nach der Erstdiagnose thymektomiert. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation lag bei 46 ± 24 Jahren.

Die TREC-Ratio unterschied sich beträchtlich unter den Probanden, unabhängig vom Alter und vom Zeitpunkt der Operation, was mit Remissionsraten von 23 – 81 % aus der Literatur übereinstimmt⁹⁷. Wie erwartet zeigt sich die TREC-Ratio der thymektomierten Probanden im Mann-Whitney Rangsummentest signifikant geringer als die TREC-Ratio der gesunden altersabgeglichenen Population ($p = 0.001$).

Tab. 3: Übersicht der thymektomierten Myasthenie-Probanden.

Pat.	Geburtsjahr	Diagnose	Thymektomie	Nachunters.	TREC/10 ⁵ Zellen	StDev
1	1961	2002	2002	2003	966	107
2	1942	2002	2003	2003	112	47
3	1959	1998	1999	2003	239	90
4	1960	1992	1994	2003	188	5
5	1961	1995	1996	2003	0	0
6	1925	1997	2000	2003	1049	6
7	1932	2002	2003	2003	1237	46
8	1965	2001	2002	2003	511	69
9	1975	2000	2000	2003	260	14
10	1975	1999	2000	2003	1777	246
11	1954	1995	2000	2003	201	14
12	1940	1999	2000	2003	84	12
13	1955	1987	1999	2003	486	79

4.3 TREC IM KLINISCHEN SCHLAGANFALL

4.3.1 Grafische Darstellung der TREC-Verteilung

Anhand gesunder Probanden wurde für die Fraktionen PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ die Thymusfunktionskurve in Abhängigkeit des Alters berechnet. Dabei konnte für jede dieser Zellfraktionen eine logarithmisch abfallende Funktion ermittelt werden. In diese Thymusfunktionskurven wurden zusätzlich die Thymektomiekontrollen sowie alle Schlaganfallprobanden, unterteilt in Überlebende und Verstorbene, einzeln aufgetragen (s. Abb. 9-11). Die TREC-Analyse der Thymektomiekontrollen fand nur in der PBMC Fraktion statt. Die Unterteilung der Schlaganfallprobanden wird im Kap. 4.3.3 erklärt.

Die Werte der TREC-Ratio von verstorbenen Probanden liegen über der errechneten Thymusfunktionskurve, die Werte von Thymektomieprobanden und von überlebenden Probanden darunter. In Anbetracht der individuellen Streubreite der TREC-Ratio und des Individuenalters konnten im konservativ schätzenden Mann-Whitney Rangsummentest keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Schlaganfall und Kontrolle herausgearbeitet werden. Hingegen zeigte sich eine signifikant niedrigere TREC-Ratio der thymektomierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0.001$) sowie eine signifikant erhöhte TREC-Ratio in der Subgruppe der verstorbenen Schlaganfallprobanden (PBMC: $p = 0.031$, CD4⁺: $p = 0.037$ und CD8⁺: $p = 0.001$). Für die Post-hoc-Analyse zwischen der überlebenden Schlaganfallgruppe und den altersangepassten Daten der Thymusfunktionskurve (s. Kap. 4.3.6) ergab sich ein signifikanter Abfall der TREC-Ratio in der Gruppe der überlebenden Probanden in den Frühzeitpunkten Tag 1 bis Tag 8 (PBMC: $p = 0.05$, CD4⁺: $p = 0.01$ und CD8⁺: $p = 0.01$) und in den Spätzeitpunkten Tag 90 und Tag 180 (CD4⁺: $p = 0.005$ und CD8⁺: $p = 0.01$).

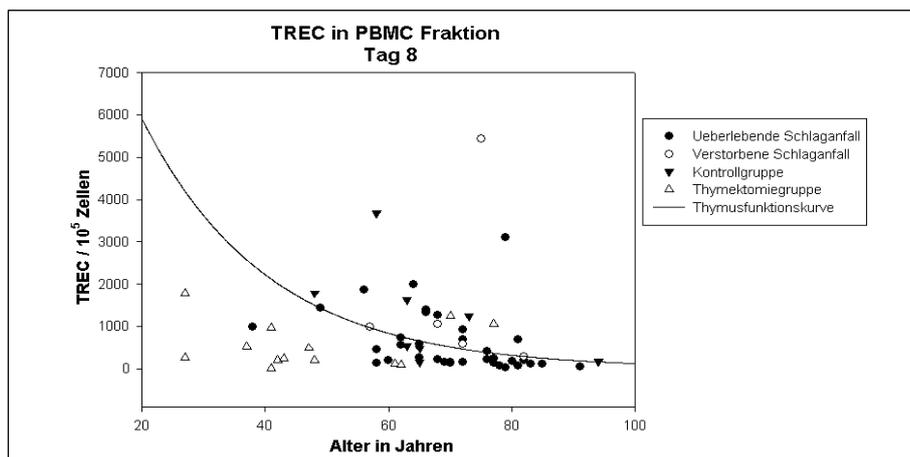
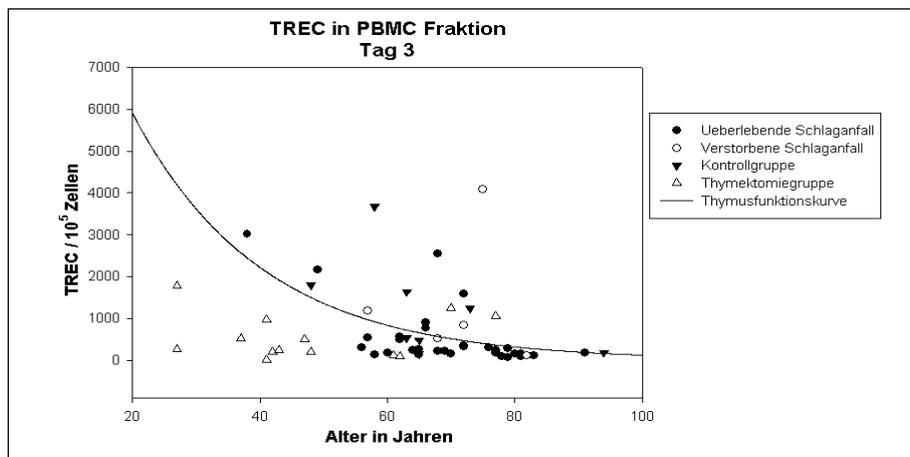
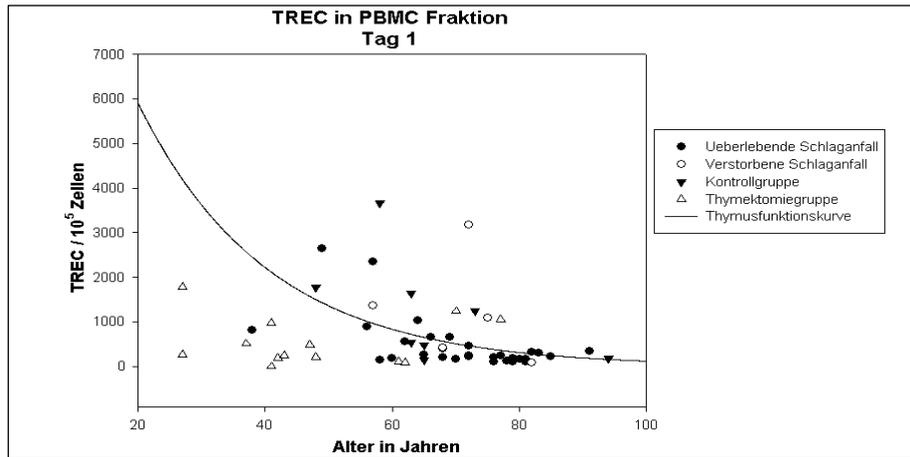


Abb. 9 a-c: TREC-Ratio bezogen auf Individuenalter in der PBMC-Fraktion.

Dargestellt sind Messwerte als TREC/10⁵ Zellen auf der Altersachse in Jahren. Einzeln dargestellt sind die Kontrollgruppe, die Thymektomiegruppe und die Studienpatienten, unterteilt in die Untergruppen Überlebende und Verstorbene. Die exponentielle Funktion stellt die TREC-Verlaufskurve dar, errechnet aus Daten der Kontrollgruppe. Die TREC-Ratio ist in der Gruppe Verstorbene Schlaganfall signifikant erhöht und in den Gruppen Überlebende Schlaganfall und Thymektomie signifikant erniedrigt.

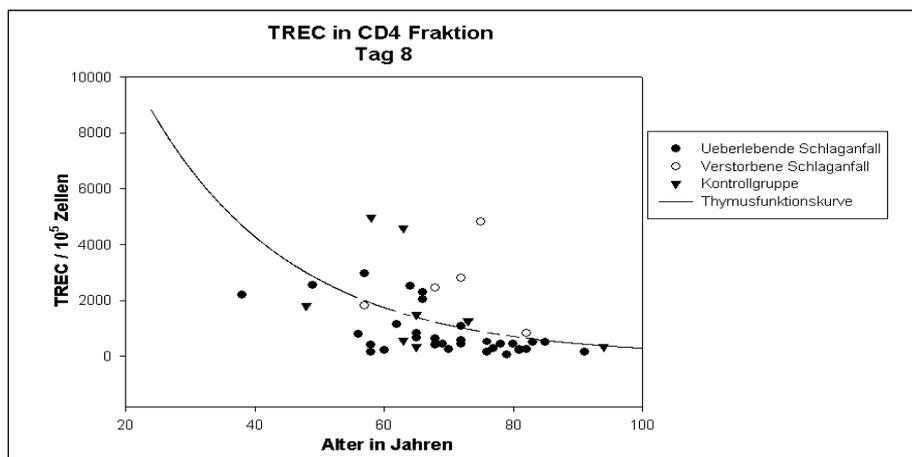
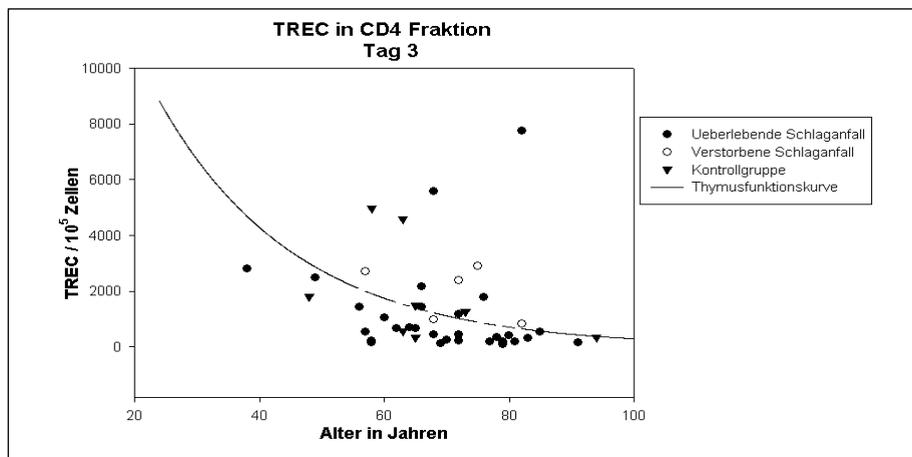
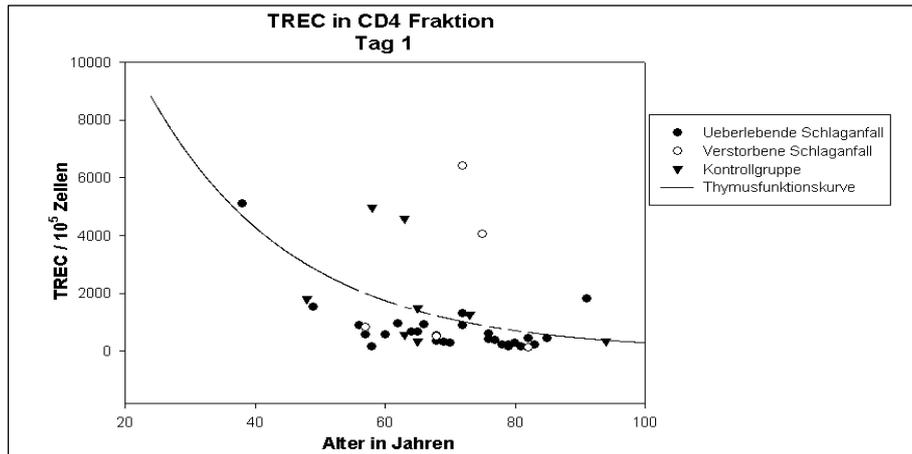


Abb. 10 a-c: TREC-Ratio bezogen auf Individuenalter in der CD4-Fraktion.

Dargestellt sind die Messwerte als TRECs/ 10^5 Zellen auf der Altersachse in Jahren. Einzeln dargestellt sind die Kontrollgruppe, die Thymektomiegruppe und die Studienpatienten, unterteilt in die Untergruppen Überlebende und Verstorbene. Die exponentielle Funktion stellt die TREC-Verlaufskurve dar, errechnet aus Daten der Kontrollgruppe. Die TREC-Ratio ist in der Gruppe Verstorbene Schlaganfall signifikant erhöht und in der Gruppe Überlebende Schlaganfall signifikant erniedrigt.

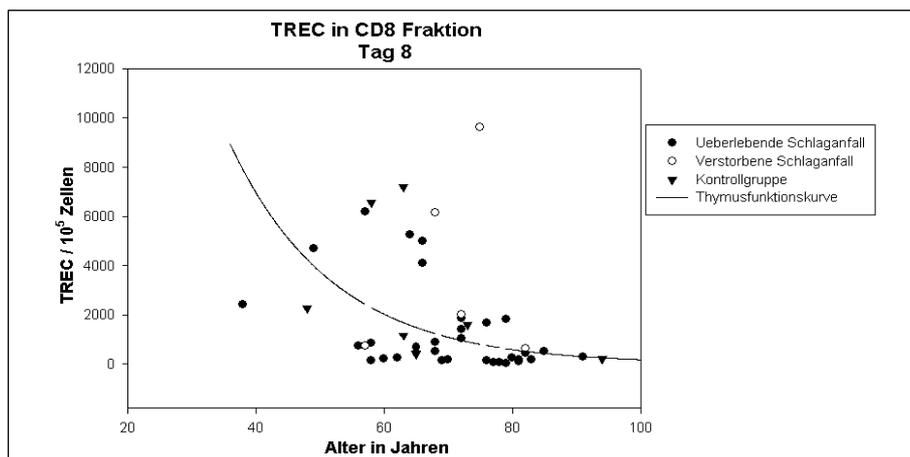
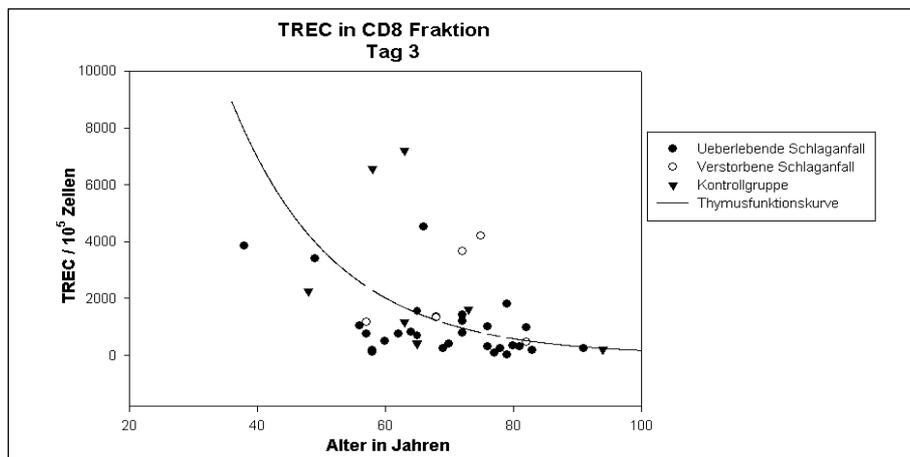
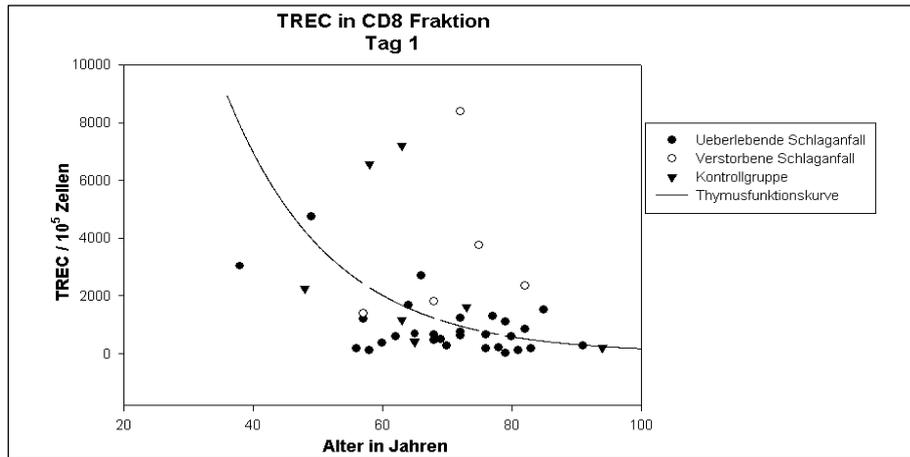


Abb. 11 a-c: TREC-Ratio bezogen auf Individuenalter in der CD8-Fraktion.

Dargestellt sind die einzelnen Messwerte als TRECs/ 10^5 Zellen auf der Altersachse in Jahren. Einzeln dargestellt sind die Kontrollgruppe, die Thymektomiegruppe und die Studienpatienten, unterteilt in die Untergruppen Überlebende und Verstorbene. Die exponentielle Funktion stellt die TREC-Verlaufskurve dar, errechnet aus Daten der Kontrollgruppe. Die TREC-Ratio ist in der Gruppe Verstorbene Schlaganfall signifikant erhöht und in der Gruppe Überlebende Schlaganfall signifikant erniedrigt.

4.3.2 Deskriptive Analyse

Nach Studieneinschluss wurden die Schlaganfallprobanden in die Gruppen antibiotische Therapie und Placebo aufgeteilt. Zu fünf Zeitpunkten (Tag 1, 3, 8, 90, 180) wurden Blutproben auf TREC-DNA in den Zellfraktionen PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ untersucht.

Als zusätzliche Einflussgrößen wurden Geschlecht, Alter (Grenzwert 64 Jahre), Schlaganfallseite (rechtshirig oder linkshirig), Schlaganfallschwere (NIH-SS Grenzwert 16 Punkte) und Prognose (Barthels Index Grenzwert 55 Punkte) betrachtet (s. Tab. 4). Im Studienverlauf wurde zudem erfasst, ob ein Proband im Beobachtungszeitraum verstorben ist oder eine Infektion entwickelt hat. Im Fall der verstorbenen Probanden konnten Daten nur für die ersten drei Untersuchungstage erhoben werden, da alle vor dem 4. Untersuchungstag verstarben (s. Tab. 5).

Tab. 4: Deskriptive Verteilung der Einflussgrößen

Es zeigt sich ein Übergewicht von weiblichen Probanden und von Probanden unter 64 Jahren. Die Schlaganfallseite ist ausgewogen, die Ratio von Tod und Infektion entspricht den Literaturangaben^{23,61,90}.

		N	%
Verum	Nein	17	47,2 %
	Ja	19	52,8 %
Geschlecht	W	24	66,7 %
	M	12	33,3 %
Alter	<=64	9	25,0 %
	>64	27	75,0 %
Schlaganfallseite	Rechts	18	50,0 %
	Links	18	50,0 %
NIHSS	<= 16	20	55,6 %
	> 16	16	44,4 %
Barthel Index	<= 55	12	33,3 %
	> 55	15	41,7 %
	Fehlend	9	25,0 %
Tod	Nein	31	86,1 %
	Ja	5	13,9 %
Infektion	Nein	27	75,0 %
	Ja	9	25,0 %

Tab. 5: Fehlende Angaben der einzelnen Fraktionen

Die fehlenden Daten der späteren Zeitpunkte sind auf Tod (n = 5), Rücknahme der Studieneinwilligung und Kontaktverlust (n = 12) zurückzuführen.

		PB MC	CD 4	CD 8
Tag 1	Gültige N	36	34	34
	Fehlend N	0	2	2
Tag 3	Gültige N	35	35	34
	Fehlend N	1	1	2
Tag 8	Gültige N	36	36	36
	Fehlend N	0	0	0
Tag 90	Gültige N	22	21	21
	Fehlend N	14	15	15
Tag 180	Gültige N	19	19	19
	Fehlend N	17	17	17

Die nach einzelnen Zellfraktionen und Untersuchungstagen aufgeschlüsselte TREC-Ratio von Schlaganfallprobanden wird in Abb. 12 dargestellt. Die Mittelwerte der TREC-Ratio unterschiedlicher Untersuchungszeitpunkte zeigen lediglich geringe Schwankungen. Sie sind niedriger als die TREC-Ratio der Kontrollgruppe ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

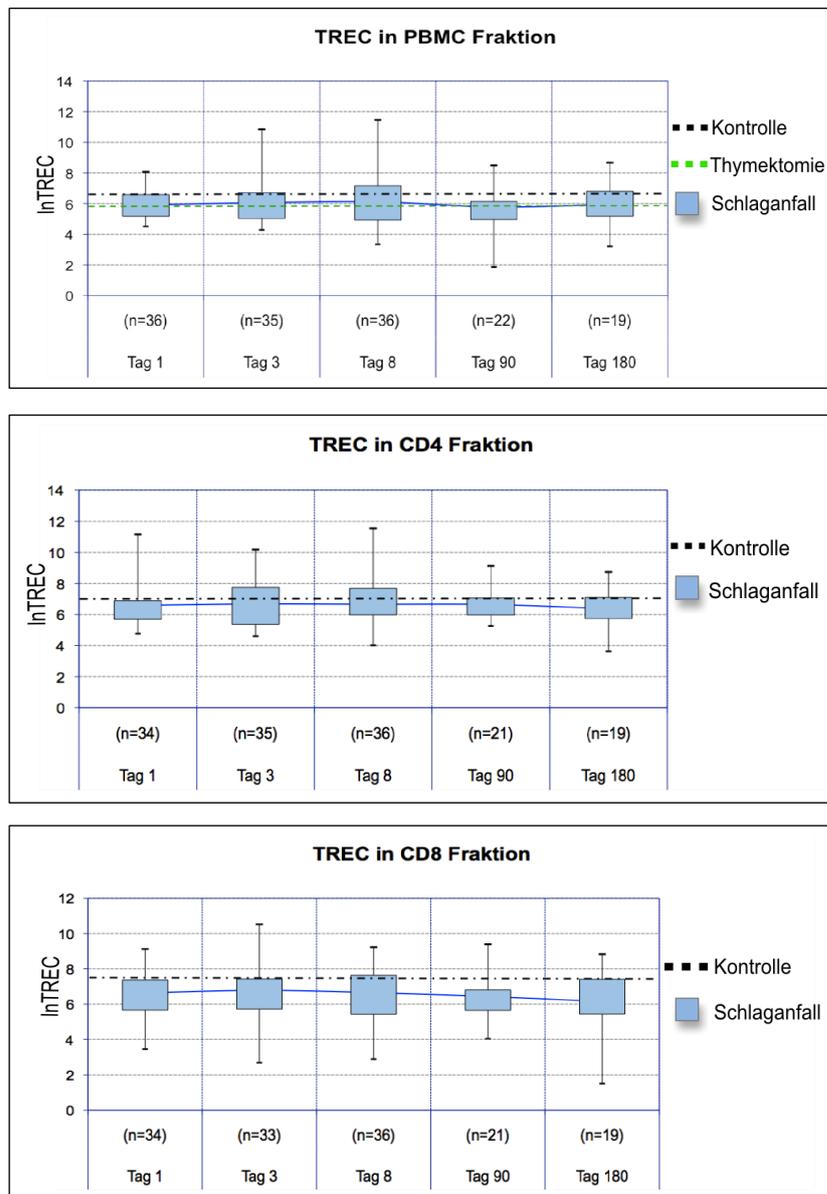


Abb. 12 a-c: TREC-Ratio der Fraktionen PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ bei Schlaganfallprobanden.

Dargestellt sind Boxplots der logarithmierten Werte zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Kontrollgruppe bzw. die Thymektomiegruppe ist mit jeweils einem Messzeitpunkt aufgetragen. Die Unterschiede der verschiedenen Zeitpunkte untereinander bzw. unter den Gruppen sind nicht signifikant, tendenziell zeigt sich die TREC-Ratio von Schlaganfallprobanden erniedrigt. Ein signifikanter Unterschied im Zeitverlauf der Schlaganfallgruppe ist nicht erkennbar. Die TREC-Ratio ist logarithmiert, $\ln(\text{TREC}/10^5 \text{ Zellen})$. Die Ergebnisse wurden mittels unidirektionaler ANOVA analysiert.

4.3.3 Statistische Modellierung der klinischen Untersuchungen

Aufgrund der Fallzahl von 36 Studienprobanden war es nicht möglich, alle in Frage kommenden Einflussgrößen gleichzeitig gegen die Änderung der TREC-Ratio als Zielgröße zu betrachten. Deshalb wurden lineare Modelle mit jeweils zwei Faktoren gerechnet. Da das Beobachtungsziel in einer dynamischen zeitlichen Änderung liegt, ist der erste Faktor immer die Zeit und wurde als Messwiederholungsfaktor berücksichtigt. Der zweite Faktor ist eine der restlichen acht Einflussgrößen (Tab. 11 im Anhang). Insgesamt wurden für jede der drei Zellfraktionen (PBMC, CD4⁺, CD8⁺) acht lineare Modelle gerechnet.

Auf der Basis von Longitudinaldaten bei gleichem Individuum wurde für die Kovarianzstruktur des Faktors Zeit die Standardfunktion *autoregressiv* vorgegeben, da zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten starke Korrelationen bestehen. Die Modellkoeffizienten wurden mit Hilfe der REML-Methode (Restricted Maximum Likelihood Methode) geschätzt. Für die statistische Auswertung wurden die mit Hilfe des natürlichen Logarithmus transformierten Werte betrachtet. Durch die logarithmische Transformation konnten parametrische Testverfahren verwendet werden, da so die starke Verteilungsabweichung der Originalwerte behoben werden konnte.

Umgesetzt wurden diese Modelle in SPSS 15 mit Hilfe der Funktionalität der gemischten Modelle, wobei bei den hier vorliegenden Modellen keine zufälligen Effekte, sondern nur feste Effekte auftraten.

4.3.4 Signifikanzanalyse der klinischen Untersuchungen

Die Zeit wies bei keinem der Modelle einen signifikant nachweisbaren Effekt auf, das heißt, es konnte in keiner Gruppe eine signifikante Änderung der TREC-Ratio im Verlauf der Erkrankung gezeigt werden. Anzumerken ist, dass die TREC-Ratio vor Eintritt des ischämischen Schlaganfalls der Untersuchung nicht zugänglich war.

Die Auswertung der TREC-Ratio konnte den bekannten Abfall der Thymusfunktion mit zunehmendem Alter bestätigen (s. Kap. 1.4).

Wie in Tab. 6 zu sehen, zeigt sich eine signifikant erhöhte TREC-Ratio in allen Zellfraktionen bei Probanden, welche vor dem 4. Untersuchungszeitpunkt verstarben (PBMC: $p = 0.031$, $CD4^+$: $p = 0.037$ und $CD8^+$: $p = 0.001$). Dieses Ergebnis steht konträr zu der Ausgangshypothese, nach welcher bei Schlaganfallprobanden eine erniedrigte TREC-Ratio erwartet wurde. Die hohe TREC-Ratio der Verstorbenen verhielt sich zudem entgegen der Alterskorrelation der Thymusfunktionskurve bei einem Durchschnittsalter aller Schlaganfallprobanden von 68 Jahren und einem Durchschnittsalter der verstorbenen Probanden von 71 Jahren (s. Abb. 13).

Tab. 6: Signifikante Unterschiede der TREC-Ratio im Verlauf eines ischämischen Schlaganfalls.

Dargestellt sind die geschätzten Mittelwerte signifikanter Unterschiede in den Subgruppen „Alter“ und „Tod“ der gemessenen Zellkompartimente. Die Einheit ist $\log TREC/10^5$ Zellen.

MW = Mittelwert, StDev = Standardfehler, UG/OG = unterer/oberer Grenzwert

Zellfraktion	Parameter		MW (Modell)	StDev	UG	OG
Blut	Alter	Jünger	6,581	0,275	6,030	7,133
		Älter	5,773	0,179	5,412	6,134
	Tod	Nein	5,891	0,181	5,525	6,257
		Ja	6,830	0,400	6,023	7,636
CD4	Tod	Nein	6,515	0,163	6,185	6,846
		Ja	7,441	0,399	6,636	8,247
CD8	Tod	Nein	6,448	0,212	6,019	6,878
		Ja	8,148	0,462	7,214	9,082

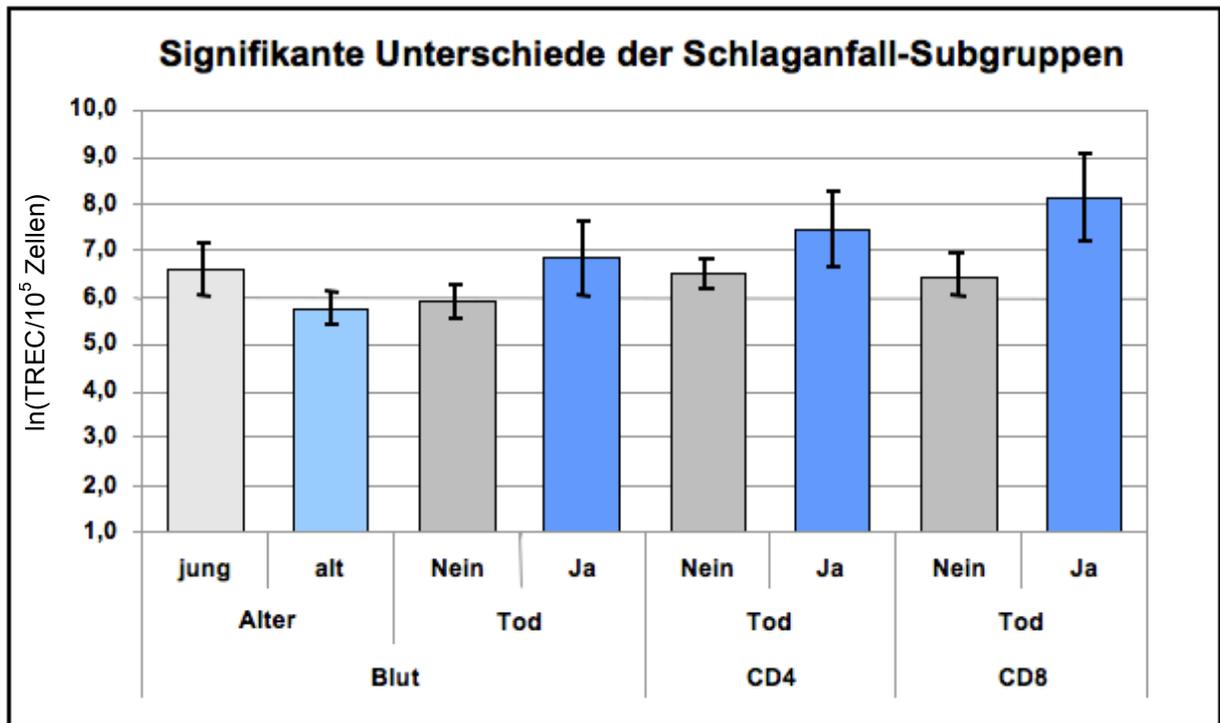


Abb. 13: Signifikante Unterschiede der TREC-Ratio im Verlauf eines ischämischen Schlaganfalls.

Dargestellt sind die signifikanten Unterschiede der Schlaganfall-Subgruppen in Form von Balkendiagrammen \pm StDev. Die TREC-Ratio ist logarithmiert, $\ln(\text{TREC}/10^5 \text{ Zellen})$. Während der bekannte Abfall der TREC-Ratio im Alter bestätigt wird, zeigt sich eine erhöhte TREC-Ratio in der Subpopulation der verstorbenen Schlaganfallprobanden. Letztere verhalten sich dabei als ältere Population entgegen der Tendenz der Thymusfunktionskurve.

Die daraufhin durchgeführte Post-hoc-Analyse zwischen der Gruppe der überlebenden Schlaganfallprobanden der Zeitpunkte Tag 1 bis Tag 8 und der altersabgeglichenen Kontrollgruppe zeigte eine signifikant erniedrigte TREC-Ratio in der überlebenden Schlaganfallgruppe in allen Kompartimenten (s. Kap 4.3.6). Die TREC-Ratio von Thymektomieprobanden ist signifikant niedriger als die gesunder Probanden ($p = 0.001$), die TREC-Ratio von Probanden mit ischämischem Schlaganfall liegt entsprechend unserer Hypothese unter der TREC-Ratio der Kontrollgruppe ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

4.3.5 Validierung: die ROC-Analyse

Zur Evaluation der Analysestrategie für die Subgruppe der verstorbenen Schlaganfallprobanden wurde eine ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristic) durchgeführt. Für die Gruppen „Verstorbene“ und „Überlebende“ wurde die TREC-Ratio auf eine Ordinalskala von 1 (definitiv kleiner) bis 6 (definitiv größer) in Bezug auf die Mittelwerte der Kontrollgruppe aufgeschlüsselt. Mit diesen Rohdaten lassen sich im Rahmen der ROC-Analyse (s. Abb. 14) über die Berechnung der Kurvenintegrale die Sensitivität, die Spezifität und die Genauigkeit eines Studienansatzes und somit das Qualitätsmaß einer Untersuchung definieren⁹⁸.

Die ROC-Analyse schätzt das Qualitätsmaß einer Untersuchung, in diesem Fall hinsichtlich der tatsächlichen Unterschiede zwischen verstorbenen und überlebenden Schlaganfallprobanden. Die *Area under the curve* zeigte mit Werten zwischen 0.831 und 0.867 eine gute bis sehr gute Genauigkeit des diagnostischen Tests. Zusammenfassend zeigt sich ein gutes Qualitätsmaß zur Herausarbeitung der Unterschiede von TREC-Untersuchungen zwischen Verstorbenen und Überlebenden.

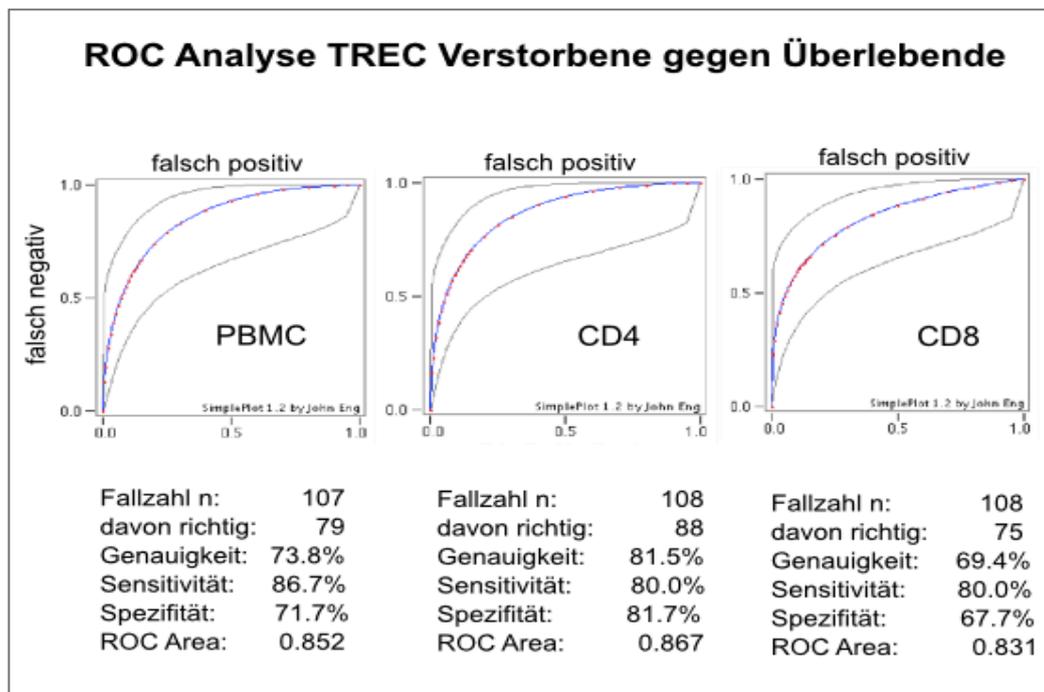


Abb. 14: ROC-Analyse des Qualitätsmaßes zwischen verstorbenen und überlebenden Probanden.

Zur Validierung wurde die TREC-Ratio der Verstorbenen oberhalb des Mittelwertes der Kontrollgruppe sowie die Gruppe der Überlebenden darunter festgelegt. Die Auswertung des Integrals (ROC-Area) zeigt eine gute Validität der Analysestrategie.

4.3.6 Subgruppenbetrachtung: die Überlebenden

Bei auffälliger Diskrepanz zwischen der TREC-Ratio überlebender und verstorbener Schlaganfallprobanden wurde in einer Post-hoc-Analyse eine Signifikanzanalyse der „überlebenden Schlaganfallprobanden“ (Tag 8: n = 31, Tag 180: n = 19) gegen die Gruppe der altersabgeglichenen Daten aus der errechneten Thymusfunktionskurve und gegen die Kontrollgruppe (n = 9) gerechnet. Da die Daten eine nichtparametrische Verteilung aufweisen, wurde der Mann-Whitney Rangsummentest verwendet.

Die Post-hoc-Hypothese lautete: Die TREC-Ratio von Schlaganfallprobanden, welche an Tag 8 bzw. Tag 180 nach dem Ereignis am Leben waren, ist im Vergleich zur Kontrollpopulation signifikant erniedrigt.

Wie in Abb. 15 zu sehen, zeigte sich am Tag 8 eine signifikant erniedrigte TREC-Ratio der überlebenden Schlaganfallprobanden gegenüber der altersabgeglichenen TREC-Ratio aus der errechneten Thymusfunktionskurve in allen betrachteten Kompartimenten (PBMC: $p = 0.05$, $CD4^+$: $p = 0.01$ und $CD8^+$: $p = 0.01$). In der Signifikanzanalyse zwischen der TREC-Ratio von überlebenden Schlaganfallprobanden und der Nullkontrollgruppe kann in der Rangsummentestung kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Die Fallzahlen unterscheiden sich hierbei stark und können daher in der konservativen Rangsummentestung zu einem Fehler 1. Art führen.

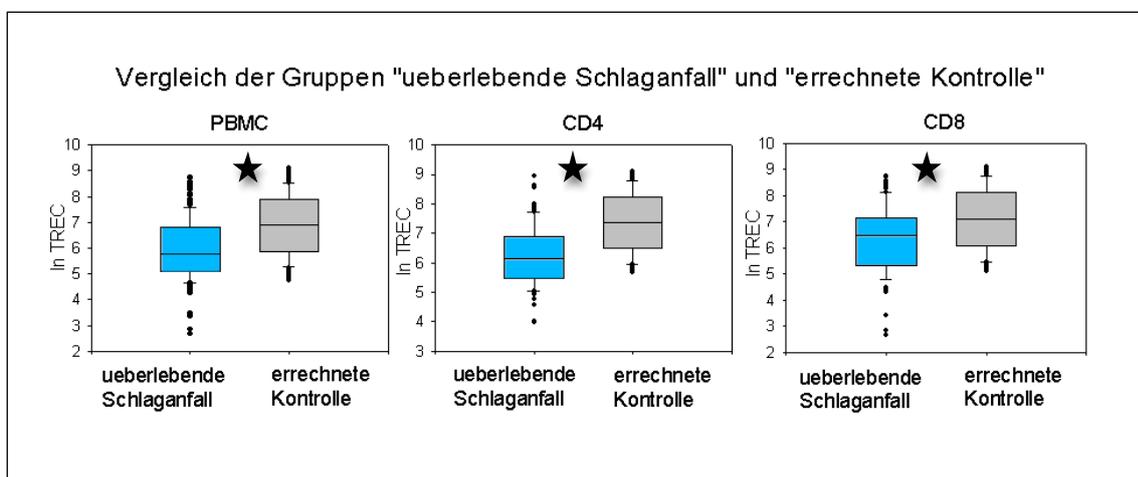


Abb. 15: Rangsummenvergleich der Gruppen „überlebende Schlaganfall Tag 8“ und „errechnete Kontrollen“.

Zur Boxplot Darstellung wurden die Daten logarithmiert. In allen Fraktionen zeigt sich eine signifikante Verminderung der TREC-Ratio von überlebenden Schlaganfallprobanden gegenüber der Kontrollgruppe.

Um die Hemmung des Thymusexports durch kurzfristige homöostatische Effekte zu bereinigen, wurden die TREC-Daten der Untersuchungszeitpunkte Tag 90 - Tag 180 mit der errechneten Thymusfunktionskurve verglichen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob es eine persistierende Thymushemmung nach Abklingen der

postischämischen homöostatischen Immunreaktion gibt. Wie in Abb.16 zu sehen, zeigte sich in den Fraktionen CD4⁺ ($p = 0.005$) und CD8⁺ ($p = 0.01$) eine signifikant erniedrigte TREC-Ratio. In der PBMC-Fraktion wurde das Signifikanzniveau knapp verfehlt ($p = 0.054$).

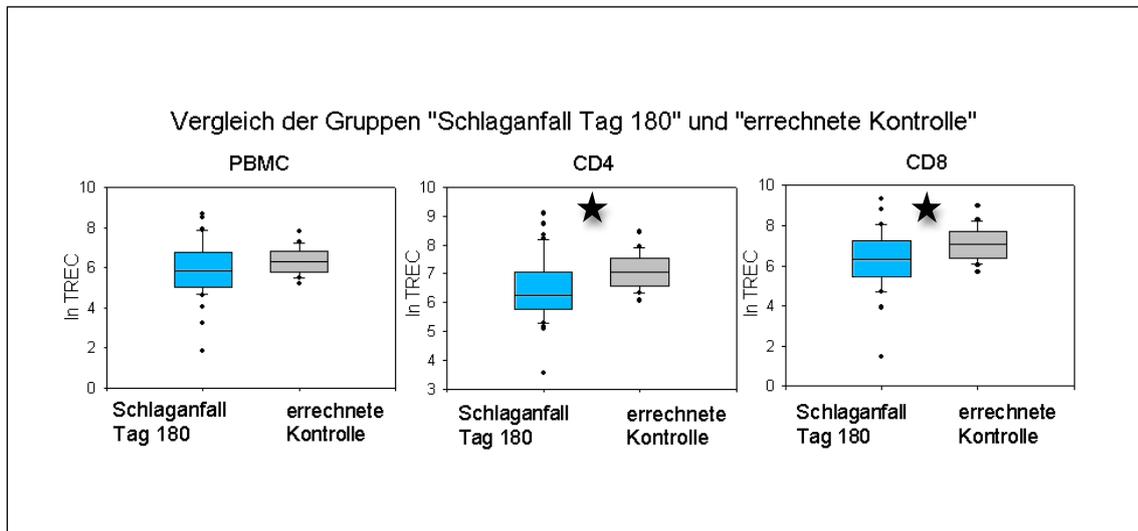


Abb. 16: Rangsummenvergleich der Gruppen „Überlebende Schlaganfall Tag 180“ und „errechnete Kontrollen“.

Zur Boxplot Darstellung wurden die Daten logarithmiert. In den Fraktionen CD4⁺ und CD8⁺ zeigt sich eine signifikante Verminderung der TREC-Ratio von Schlaganfallprobanden der Zeitpunkte Tag 90 und Tag 180 nach Ereigniseintritt gegenüber der Kontrollgruppe. In der Fraktion PBMC ist die TREC-Ratio nicht signifikant verschieden.

4.3.7 Subgruppenbetrachtung: die Verstorbenen

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Subgruppe der verstorbenen Schlaganfallprobanden (s. Tab. 7). Die TREC-Ratio dieser Probanden ist aufgrund der Abweichung gegenüber den Erwartungswerten und der guten Korrelation zum Abfall des HLA-DR (Human Leukocyte Antigen) nach ischämischem Schlaganfall besonders beachtenswert⁹⁹. HLA-DR wird auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und dient zusammen mit dem T-Zell Rezeptor als Immunsynapse, womit es eine Schlüsselfunktion des adaptiven Immunsystems bildet. Eine erniedrigte Expression des monozytären HLA-DR tritt bei intensivpflichtigen Probanden in Zuständen von Immunsuppression auf und wird als Marker von Infektionsanfälligkeit und schlechter Prognose interpretiert¹⁰⁰.

Die Infektionsrate unserer Probanden in den ersten drei Untersuchungszeitpunkten betrug 25 %, die Mortalitätsrate lag bei 13,5 %, was sich mit Literaturangaben deckt^{16,17,20}. In der Subgruppe der Verstorbenen zeigte sich, im Gegensatz zur Subgruppe der Infizierten, eine signifikant erhöhte TREC-Ratio in allen untersuchten Zellpopulationen.

Tab. 7: Einzelbetrachtung der Subgruppe „Verstorbene Schlaganfall“.

Die Tabelle zeigt Details der verstorbenen Probanden. Keiner der Probanden verstarb unter initialer antibiotischer Behandlung. Es zeigen sich zudem Parallelen zwischen Anstieg der TREC-Ratio und Abfall des HLA-DR

Pat	Infekt	Verum	Alter	Tod	NIH SS	Erhöhte TREC-Ratio	TREC-Ratio /10 ⁵ Zellen	HLA-DR Abfall	Kommentar
FB	Tag 8	Ja	68	Tag 12	14	Tag 1: CD8 Tag 8: alle	PBMC: 1044 (+136 %) CD4: 2444 (+192 %) CD8: 1806 (+147 %)	Tag 8	Pneumonie nach Ende Antibiose
HS	Tag 3	Nein	75	Tag 11	14	Tag 1: alle	PBMC: 1086 (+272 %) CD4: 4034 (+454 %) CD8: 3761 (+473 %)	Tag 1	Pneumonie
MG	Nein	Ja	81	Tag 28	19	nicht erhöht		kein	Hinweis für Antibioseschutz
MR	Nein	Ja	72	Tag 39	17	Tag 1: alle	PBMC: 1581 (+342 %) CD4: 6404 (+630 %) CD8: 8388 (+876 %)	kein	Hinweis für Antibioseschutz
SG	Tag 3	Nein	57	Tag 30	13	Tag 1: PBMC Tag 3: CD4	PBMC: 1371 (+142 %) CD4: 4711 (+236 %)	Tag 3	Pneumonie

In der Gruppe der verstorbenen Schlaganfallprobanden (zwei Placebo, drei Verum) verstarben vier an septischen Komplikationen, dabei entwickelten die Placeboprobanden ab Tag 3 eine Sepsis. Ein Verumproband entwickelte zwei Tage nach Ende der Moxifloxacingabe eine Sepsis, zwei weitere verstarben während der Rehabilitation. Bei Probanden mit letaler Sepsis ist neben einer hohen TREC-Ratio gleichzeitig ein erniedrigtes HLA-DR festgestellt worden. Kein Verumproband verstarb während der antibiotischen Behandlung.

4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Experimenteller Schlaganfall:

- Zum Zeitpunkt Tag 3 nach Operation lag die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe in allen gemessenen Fraktionen aus dem Vollblut (PBMC, CD4⁺, CD8⁺) niedriger als in der Sham-Gruppe, wohingegen beide Gruppen zum Zeitpunkt Tag 21 ausgeglichen waren. Diese Daten erreichten nicht das Signifikanzniveau.
- In der Fraktion der Milz Gesamtzellen lag die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe an beiden Zeitpunkten, Tag 3 und Tag 21, höher als in der Sham-Gruppe, zum Zeitpunkt Tag 21 war die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe signifikant erhöht.
- Unter den Milz CD4⁺ Zellen war die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe am Tag 21 nach Operation signifikant höher als in der Sham-Gruppe.
- Die TREC-Ratio der Milz CD4⁺ Zellen nahm im zeitlichen Verlauf von Tag 3 auf Tag 21 in beiden operierten Gruppen MCAO und Sham signifikant ab.
- Die TREC-Ratio der Vollblut CD4⁺ Zellen zeigte im zeitlichen Verlauf von Tag 3 auf Tag 21 in der MCAO-Gruppe einen signifikanten Anstieg und in der Sham-Gruppe einen signifikanten Abfall.
- Im Thymus zeigten beide operierte Gruppen zu allen Zeitpunkten eine höhere TREC-Ratio als die Nullkontrolle, die MCAO-Gruppe zeigte dabei die höchsten Werte, ein signifikanter Unterschied zwischen der MCAO- und Sham-Gruppe konnte im Thymus nicht beobachtet werden.

Thymektomie:

- Die Thymektomiegruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant verminderte TREC-Ratio im Vollblut ($p = 0.001$).

Klinischer Schlaganfall

- Ein Abfall der TREC-Ratio mit steigendem Alter wurde bestätigt.
- Die TREC-Ratio im Vollblut von Probanden nach akutem ischämischen Schlaganfall war, verglichen mit der altersabgeglichenen Kontrollgruppe, tendenziell vermindert.
- Post-hoc: Die TREC-Ratio von Probanden nach überlebtem ischämischen Schlaganfall am Tag 8 zeigte im Vergleich mit der altersabgeglichenen Kontrollgruppe in allen gemessenen Fraktionen eine signifikante Verminderung (PBMC: $p = 0.05$, $CD4^+$: $p = 0.01$ und $CD8^+$: $p = 0.01$).
- Post-hoc: Die TREC-Ratio von Probanden nach überlebtem ischämischen Schlaganfall am Tag 180 war, verglichen mit der altersabgeglichenen Kontrollgruppe, in den Fraktionen $CD4^+$ und $CD8^+$ signifikant vermindert ($CD4^+$: $p = 0.005$ und $CD8^+$: $p = 0.01$).
- Innerhalb der untersuchten Population mit ischämischem Schlaganfall bestand kein Zusammenhang zwischen der TREC-Ratio und der Schlaganfallschwere, der Schlaganfallseite, der prophylaktischen Antibiosegabe, der Infektinzidenz und der Prognose.
- Der zeitliche Verlauf erzielte bei keinem der Modelle einen signifikant nachweisbaren Effekt, womit keine signifikante Änderung der TREC-Ratio im Verlauf der Erkrankung gezeigt werden konnte. Anzumerken ist, dass nur Messdaten nach Eintritt des Schlaganfalls vorlagen.
- Probanden, welche in der Akutphase des ischämischen Schlaganfalls verstarben, hatten in allen untersuchten Fraktionen (PBMC, $CD4^+$, $CD8^+$) eine signifikant höhere TREC-Ratio als Probanden der Kontrollgruppe (PBMC: $p = 0.031$, $CD4^+$: $p = 0.037$ und $CD8^+$: $p = 0.001$). Dabei lag das Durchschnittsalter der verstorbenen Probanden (71 Jahre) höher als das Durchschnittsalter aller untersuchten Probanden (68 Jahre).
- In der Subgruppe der verstorbenen Probanden verliefen die erhöhte TREC-Ratio bzw. der Anstieg derselben zeitgleich zum Abfall von HLA-DR.

Vergleich der Ergebnisse:

Vergleiche zwischen experimentellen und klinischen Arbeiten gestalten sich trotz ähnlichem Studienaufbau oft schwierig. In unserem Fall bezog sich der experimentelle Studienentwurf auf Querschnittsdaten junger Tiere, der klinische Entwurf hingegen auf Longitudinaldaten von älteren, multimorbiden Probanden. Die Longitudinaluntersuchungen ermöglichten auch den Einschluss von Daten verstorbener Probanden, während die Querschnittsuntersuchungen nur an überlebenden Tieren möglich waren. Wissenschaftlich korrekt bleibt somit lediglich ein Vergleich der Daten aus dem Vollblut von überlebenden Probanden bzw. Tieren.

Im experimentellen Teil war die TREC-Ratio von PBMC in MCAO-Tieren tendenziell erniedrigt. In den Fraktionen CD4⁺ und CD8⁺ ergibt sich ein signifikanter Abfall der TREC-Ratio in MCAO-Tieren. Die TREC-Ratio in der Fraktion CD4⁺ der MCAO-Gruppe ist zum Zeitpunkt Tag 3 signifikant kleiner als in der Gruppe CD4⁺ Sham.

Im klinischen Teil zeigt sich die TREC-Ratio überlebender Probanden in den Fraktionen PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 3 und Tag 8 signifikant erniedrigt.

Die Betrachtung der Versuchsergebnisse von Studienteilnehmern und Versuchstieren nach ischämischem Schlaganfall unter den oben genannten Vergleichskriterien ergibt eine gute Übereinstimmung der Dynamik der TREC-Ratio im Vollblut.

5 DISKUSSION

Das letzte Kapitel beginnt mit einer kritischen Betrachtung der Hauptmethode, der quantitativen PCR und einer Analyse der Ergebnisherleitung. Darauffolgend wird eine Interpretation der Versuchsergebnisse und ihre Einbettung in die aktuelle wissenschaftliche Debatte vollzogen. Den Abschluss bildet ein Umriss der weiteren Forschungsaussichten in Bezug zu den TREC-Untersuchungen sowie eine Zusammenfassung der Dissertationsschrift.

5.1 DIE ECHTZEIT - PCR

Der quantitative Ansatz der Echtzeit-PCR ermöglicht die relative und absolute Quantifizierung von PCR-Substraten. Dabei wird die Menge des Zielgens anhand einer bekannten Menge des Kontrollgens in einem Untersuchungsschritt ermittelt. Die Echtzeit-PCR bietet den Vorteil der Kontaminationsminimierung durch Arbeiten im geschlossenen Röhrchen sowie Wegfall der post-PCR Manipulation¹⁰¹. Dadurch besitzt der Assay eine sehr gute Reproduzierbarkeit bei breitem Messbereich. Die Fluoreszenzmessung und die computerisierte quantitative Analyse über eine Standardkurvenberechnung und Schmelzkurvenanalyse ermöglicht eine exakte Messung und trägt zur exzellenten Wiederholbarkeit bei. Übereinstimmende Ergebnisse der Messung von TREC-DNA mittels fluoreszierender Echtzeit-PCR sind auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben^{102,103}.

Im Rahmen der Etablierung einer Methode zur indirekten Messung der Thymusfunktion anhand der TREC-Evaluation im Vollblut oder im Gewebeextrakt gelang es, verschiedene zellbiologische und molekulargenetische Techniken zu einer validen, wiederholbaren und zeitlich annehmbaren Methode herauszuarbeiten. Die einzelnen Prozessschritte konnten dabei gut aufeinander abgestimmt werden und wurden durch eine Qualitätskontrolle nach jedem Arbeitsschritt ergänzt.

5.2 ERGEBNISDISKUSSION

Auf Grund des Charakters dieser Arbeit als explorative Analyse im Sinne eines hypothesengenerierenden Ansatzes wurden Fallzahlen erforderlicher Größe nicht erreicht. Die hier gewonnenen Ansätze müssen somit in konfirmativer Untersuchung bestätigt werden. Die geringe Fallzahl hat Auswirkungen auf den gesamten statistischen Analyseprozess. Die statistische Trennschärfe ist in den hier beschriebenen TREC-Untersuchungen sowohl bei der Maus als auch beim Menschen niedrig. Die Ursachen dafür liegen sowohl am kleinen Stichprobenumfang als auch an der geringen Effektgröße. Die Sensitivität und Spezifität der Datengewinnung sind durch viele Testläufe in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Team, der Stabilität und Wiederholbarkeit der Messmethode sowie valider ROC-Analyse als hoch anzusehen. Somit ist bei niedriger Fallzahl die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Ergebnisses (β -Fehler) hoch, wohingegen die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses (α -Fehler) gering.

Die Nullhypothese konnte durch die Untersuchungen der TREC-Ratio nicht widerlegt werden, ausser in der Subgruppe der überlebenden Probanden.

Maßgeblich muss hier neben einer geringen Effektgröße und großer individueller Variabilität das Vorhandensein von Subgruppen mit deutlich unterschiedlicher Dynamik als ursächlich gesehen werden: in der Subgruppe von Probanden mit postischämisch erworbener Infektion zeigte sich eine unveränderte TREC-Ratio, in der Subgruppe der Überlebenden eine signifikant erniedrigte TREC-Ratio und in der Subgruppe der Verstorbenen eine signifikant erhöhte TREC-Ratio.

Unter der Prämisse einer postischämischen Lymphopenie^{29,30,91} kann die signifikante Erhöhung der TREC-Ratio bei verstorbenen Probanden als Ausdruck einer massiven Depletion des T_{mem} -Kompartimentes gesehen werden. Eine schwere Immunsuppression mit Depletion des T_{mem} -Kompartimentes führt klinisch zu einer lebensbedrohlichen Infektion bei einem relativen Anstieg des TREC enthaltenden T_{nav} -Kompartimentes.

Bei den Mausproben ist auf Grund der Stichprobengröße die Nullhypothese ebenfalls nicht zu verwerfen. Die Untersuchung der Milz hat in erster Linie Hinweise auf eine Verschiebung innerhalb der Kompartimente von immunkompetenten Zellen ergeben. Dabei erweist sich die TREC-Ratio in der Milz bei MCAO-Tieren signifikant höher als in der Sham-Gruppe. Dies ist als Hinweis einer aktiven Depletion des T_{mem} -

Kompartimentes zu werten. Die Annahme deckt sich mit bereits veröffentlichten tierexperimentellen Arbeiten^{28,90}, welche eine massive Apoptose von Milzlymphozyten nach MCAO festgestellt haben. Diese Daten sind insbesondere interessant, da in dem hier beschriebenen Studiendesign eine Untersuchung der menschlichen Milz *in vivo*, eines der Hauptorgane der Lymphozytenhomöostase, nicht möglich war.

5.3 INTERPRETATION

5.3.1 Die Interpretation der TREC-Daten

Nachdem die Methode zur Messung der Thymusaktivität durch TREC-Analyse zunächst viel Aufmerksamkeit erfahren hat, reduzierte sich in den letzten Jahren die Zahl diesbezüglicher Neuveröffentlichungen. Ein Grund dafür ist die schwierige Interpretation der erhaltenen TREC-Daten. Während viele Arbeitsgruppen die TREC-Analyse zur Quantifizierung der Thymusfunktion ohne Vorbehalte anwenden, beurteilen Andere das indirekte Messverfahren kritisch¹⁰⁴. Thymusfunktionsanalysen anhand einer Volumenmessung mittels Thorax-CT haben sich als insuffizient herausgestellt¹⁰⁵, eine MRT-Untersuchung des Mediastinums erfordert kooperative Probanden, welche mehrmals für mindestens 8 sec. die Luft anhalten können¹⁰⁶. Auch die Messung der Thymusaktivität anhand von FACS-Analysen mit Markern naiver Lymphozyten wie CD45RA, CD62L oder CD27 erwies sich bei Beginn dieser Arbeit als unzureichend⁵⁹. Ein Fluoreszenzmarker von Rezenten Thymischen Emigranten (RTE) für alle humanen Alterspopulationen ist bislang unbekannt. Lymphozyten mit einer hohen Expression von CD31 werden mit einer signifikant hohen TREC-Zahl bei jungen Individuen assoziiert^{79,107}. Aktuelle Untersuchungen bei älteren Individuen konnten ebenfalls eine gute Korrelation zwischen TREC und der Expressionsrate von CD31 herausarbeiten^{108,109,110}. Kohler et al. wiesen eine hohe Expression von CD31 auf allen RTE nach, umgekehrt waren nicht alle Zellen mit hoher CD31-Expression RTE¹⁰⁹. Die nur in thymischen Emigranten vorkommenden TREC-Fragmente boten zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchungen die beste Möglichkeit zur Evaluierung der Thymusfunktion unter der Bedingung einer konservativen Interpretation^{56,104}. Eine Quantifizierung von TREC innerhalb der CD31⁺-Population könnte zukünftig die Evaluation der Thymusfunktion optimieren.

Der Thymusexport von RTE bestimmt nicht allein die TREC-Ratio. Modifikationen der immunologischen Homöostase, z.B. über eine Änderung der Zellteilungsrate oder der

Zelllebensdauer, führen zur Unschärfe in der Interpretation von TREC-Daten¹¹¹. Dies ist insbesondere in Situationen wie einer Lymphopenie oder Wiederauffüllung depletierter Kompartimente bedeutsam. So ist beispielsweise während der Immunrestitution nach *HAART* (High Active Anti Retroviral Therapy) oder Knochenmarktransplantation anhand der TREC-Analysen von einem *Thymusrebound* berichtet worden⁵⁶. Diese Interpretation ist unter der Annahme therapiebedingter fluktuierender Kompartimente als spekulativ zu werten^{111,112}. Die Quantifizierung der TREC-DNA stellt eine indirekte Messmethode der thymischen Aktivität dar und wird durch verschiedene periphere Faktoren beeinflusst. Der schwierigen Interpretation liegen ursächlich drei Parameter zugrunde: erstens die Lebensdauer der RTE, zweitens die Dilution von TREC durch Zellteilung und drittens die homöostatische Änderung von T-Zell-Kompartimenten^{104,112,113}.

Die homöostatische Fluktuation der T-Zell-Kompartimente wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt. In erster kommt es aufgrund eines Akutereignisses zur Immunantwort. T_{mem} -Zellen teilen sich und bilden den T_{eff} -Pool, welcher in kurzer Zeit bis zu 90 % der gesamten T-Zell-Population erreichen kann¹¹⁴. Während einer Lymphopenie, z.B. nach viraler Infektion, erfolgt eine rasche Depletion des T_{mem} -Pools und konsekutiv eine Konversion des T_{nav} -Pools in den leeren T_{mem} -Pool¹¹⁵. Das bewirkt große Veränderungen der T-Zell-Homöostase in kurzer Zeit, welche mit der Entstehung von Autoimmunphänomenen assoziiert werden^{116,117,118}.

Die chronische Form der homöostatischen Änderung von T-Lymphozyten ist durch verringerten Thymusexport bei alternden Individuen im Rahmen der Immunseneszenz hervorgerufen. Aufgrund sinkenden Thymusexports kommt es zur peripheren Auffüllung des T_{nav} -Kompartimentes durch Zellteilung innerhalb des Kompartimentes¹¹⁵.

In der Literatur wird das naive T-Zell-Kompartiment des jungen Menschen auf etwa 10^{10} T-Zellen bei einem Thymusexport von 10^7 bis 10^8 T-Zellen pro Tag geschätzt⁵⁹. Dies entspricht einer Lebensdauer der naiven T-Zellen von etwa 100 bis 1.000 Tagen. Eine akute Veränderung der thymischen Migration bringt somit nicht sofort eine messbare Änderung der peripheren TREC-Ratio. Dadurch wird die zeitlich verzögerte Senkung des naiven T-Zell-Pools nach Thymektomie erklärt^{56,119}. Die zeitnahe Änderung der TREC-Ratio wäre somit als homöostatische Verschiebung innerhalb der T-Zell-Kompartimente zu interpretieren. Um die längerfristigen Effekte zu erfassen, erfolgten in der hier vorgestellten Arbeit Nachuntersuchungen drei und sechs Monate nach Studieneinschluss. Hier war die TREC-Ratio gegenüber der Nullkontrolle signifikant

erniedrigt, was für die vermutete Hemmung des Thymusexportes nach ischämischem Schlaganfall spricht.

Periphere Effekte wie Zellteilung, Lebensdauer oder Kompartimenttransfer sollten bei der TREC-Auswertung optimalerweise berücksichtigt werden. Beispielsweise tritt eine Vermehrung der T_{eff} -Populationen im Rahmen einer Entzündungsreaktion häufig mit einem relativen Abfall der naiven Zellen im Vollblut auf. Dilutionseffekte sind auch bei HIV-Patienten beschrieben^{111,120}.

In Versuchen an älteren Probanden fanden Harris et al. eine gute Korrelation zwischen der TREC-Ratio im Vollblut und der RTE-Fraktion sowie dem T_{nav} -Kompartiment; diese Korrelation konnte bei jungen Individuen nicht gezeigt werden¹¹². Da die TREC-Ratio lymphozytabgeglichen ist, kann die Erhöhung der TREC-Ratio im Blut außer bei vermehrter Thymusausschüttung auch bei Lymphopenie oder homöostatisch bedingter längerer Persistenz von TREC-Zellen im Blut auftreten. Während einer Lymphopenie kann eine erhöhte TREC-Ratio trotz gleichbleibenden Thymusexports eine Steigerung der Thymusfunktion suggerieren. Letzteres ist ein Erklärungsansatz der erhöhten TREC-Ratio bei Probanden, welche im Verlauf des akuten ischämischen Schlaganfalls verstarben. Warum die erhöhte TREC-Ratio unserer Probanden mit höherer Sterblichkeit und nicht mit postischämischer Infektion korreliert, bedarf weiterer Untersuchungen. Trotz der schwierigen Interpretation von TREC-Daten bietet die TREC-Analyse als Verlaufsparemeter oder Aktivitätsmarker bei vorsichtiger Interpretation interessante Einsatzmöglichkeiten in der immunologischen Forschung.

Aus den vorhergehend beschriebenen Untersuchungen und Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen lässt sich eine gute Reproduzierbarkeit und Validität der TREC-Untersuchungen aus der PBMC-Fraktion herausarbeiten^{102,103}. Wann immer möglich sollte eine vorausgehende Zellseparation mit den T-Zell-Markern CD4, CD8 und CD31 vor der molekularbiologischen TREC-Untersuchung durchgeführt werden.

5.3.2 TREC im MCAO-Modell

Die These der Immunsuppression nach einem ischämischen Schlaganfall erfreut sich infolge des fortschreitenden Wissens einer zunehmenden Akzeptanz^{121,122}. Die meisten immunologischen Untersuchungen nach ischämischen Schlaganfall stellen direkte Vorgänge im ZNS in den Fokus^{7,123}, nur wenige Studien haben sich bislang mit den Immunvorgängen in der Peripherie befasst. Der bedeutendste Effekt einer zentralen Immunmodulation nach experimentellem ischämischen Schlaganfall besteht,

vereinfacht ausgedrückt, in einer Hemmung der proinflammatorischen Th1-Antwort und Induktion einer antiinflammatorischen Th2-Antwort der CD4⁺-Lymphozyten^{28,30,89,124}. Prass et al. konnten neben dem Th1/Th2-Shift eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der Einleitung der postischämischen Immunreaktion zeigen. In der Studie entwickelten MCAO-Mäuse bereits bei minimaler bakterieller Beimischung eine Pneumonie, wobei sich eine Blockade des sympathischen Systems durch β -Blocker als infektvorbeugend erwies²⁹. Diese Experimente zeigen eindrücklich eine erhöhte Infektuszeptibilität nach ischämischem Schlaganfall. Weiterhin ergab sich in MCAO-Experimenten ein apoptotischer Abfall der Lymphozytenzahl im Blut, in der Milz und im Thymus⁹¹. Offner et al. konnten am MCAO-Modell einen Anstieg von IL-6 und IFN- γ im Blut und in lymphatischen Organen eine Stunde nach Ischämieeintritt nachweisen⁹⁰. Im Rattenmodell der MCAO zeigten Gendron et al. einen Abfall der Milzleukozyten am 7. postischämischen Tag sowie eine Normalisierung im Untersuchungsverlauf⁸⁹. Der experimentell erhobene Befund einer monozytären Dysfunktion nach Schlaganfall konnte auch bei Probanden der PANTHERIS-Studie bestätigt werden (s. Kap 4.3.4)⁹⁹. Das bedeutendste Ergebnis der hier vorgestellten MCAO-Untersuchungen war der Nachweis einer signifikanten Änderung der TREC-Ratio in Thymus, Milz und Vollblut nach einem ischämischen Schlaganfall. Dabei ist die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe im Blut zum Zeitpunkt Tag 3 niedriger und in der Milz zu beiden Zeitpunkten höher als die der Sham-Gruppe. Ein Erklärungsansatz wäre hier die Mobilisierung des T_{mem}-Kompartimentes im Blut mit einem relativen Abfall der TREC-Ratio. Setzt man eine schlaganfallbedingte Apoptose der Milzlymphozyten voraus, ist ein Anstieg der TREC-Ratio in der Milz nach einem Schlaganfall hinweisend auf eine verstärkte Apoptose und Ausschwemmung des T_{mem}-Kompartimentes. Im Thymus zeigte sich ein Anstieg von reifen Thymozyten nach TREC-Rekombination in den Gruppen MCAO und Sham. Zu beiden Messzeitpunkten war die TREC-Ratio der MCAO-Gruppe höher als die der Sham-Gruppe, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Dies kann als Hinweis einer zentralen Suppression von Thymozytenreifung oder Thymozytenausschwemmung nach Stressbelastung gewertet werden. Zusammenfassend ergeben sich aus der Messung der TREC-Ratio in der vorliegenden murinen Studie sowohl Hinweise für eine Hemmung des Thymusexports als auch Hinweise für eine Verschiebung von Lymphozytenpopulationen in der Peripherie nach ischämischem Schlaganfall. Diese Untersuchungen stärken die Annahme einer zentral gesteuerten Immunsuppression^{28,89,90,124}.

Der Vergleich der MCAO-Ergebnisse mit Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen zeigt interessante Parallelen. Ein Anstieg der TREC-Ratio in allen untersuchten Zellfraktionen der Milz steht in Übereinstimmung mit der von Offner et al. beschriebenen postischämischen Apoptose von Milzlymphozyten⁹¹. Die Arbeitsgruppen von Prass und Gendron zeigten am MCAO-Modell immunmodulatorische Effekte in der Milz bis zum Tag 42 bei der Maus bzw. Tag 7 bei der Ratte^{28,89}.

In den vorliegenden murinen TREC-Untersuchungen konnte eine signifikante Änderung der Immunreaktion bis zum Tag 21 nach Ischämieeintritt herausgearbeitet werden. Der Nachweis einer Persistenz dieser Effekte als Anhalt einer Verschiebung der T-Zell-Homöostase gelang mit den hier vorgestellten Untersuchungen zum ersten Mal. Die Ergebnisse unterstreichen die Annahme einer langanhaltenden Immunmodulation nach ischämischer Hirnschädigung.

Erwähnenswert ist des Weiteren der Studienausschluss von 44% der MCAO-Tiere am Tag 21 durch vorzeitigen Tod, somit konnten die am schwersten betroffenen Tiere nicht in die Untersuchung aufgenommen werden.

5.3.3 TREC im klinischen Schlaganfall

Der klinische Teil der vorgelegten Arbeit basiert auf der PANTHERIS-Studie, welche die Präsenz einer zentralgesteuerten Immunsuppression nach ischämischem Schlaganfall beim Menschen zeigen konnte^{99,125}. Die monozytäre Expression von HLA-DR als Immunkompetenzmarker bei kritisch Kranken^{126,127} war bei Probanden der Placebogruppe, welche im Verlauf eine Infektion entwickelt hatten, ab dem ersten Untersuchungstag signifikant erniedrigt. Ein niedriger HLA-DR Wert zeigt sich dabei als unabhängiger Prädiktor einer postischämischen Infektion¹²⁸. Da der Abfall des HLA-DR vor einer klinisch manifesten Infektion auftrat, ist dies als Hinweis einer immunsuppressiv begünstigten Infektion zu werten⁹⁹. Interessanterweise stieg die TREC-Ratio ab dem ersten Untersuchungstag sowohl bei Placebo- als auch bei Verumprobanden in der Frühmortalitätsgruppe und korrelierte negativ mit einem Abfall des HLA-DR. Eine hohe TREC-Ratio wäre somit ein prognostischer Marker eines erhöhten Mortalitätsrisikos nach ischämischem Schlaganfall beim Menschen.

Parallel zu den im Tierexperiment gezeigten Effekten einer Apoptose und Depletion der Lymphozyten in lymphatischen Organen und im peripheren Blut nach einem ischämischen Schlaganfall^{123,129} wurde im Rahmen der PANTHERIS-Studie eine CD4⁺-Lymphopenie herausgearbeitet¹²⁵. Gleichzeitig konnte eine Korrelation zwischen dem

Grad der Lymphopenie und dem Auftreten einer schlaganfallbedingten Infektion gezeigt werden¹³⁰. Klehmet et al. interpretierten die hierbei aufgetretene T-Zell-Dysfunktion als ein Überwiegen der Th2-Antwort¹²⁵. Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Plasmaspiegels von IL-6 an Tag 3 bei Probanden, welche nach Schlaganfall eine Infektion entwickelt haben. Ein Anstieg von IL-6 wurde bereits zuvor mit einem schweren ischämischen Schlaganfall und schlechter Prognose in Zusammenhang gebracht^{131,132,133}.

Die Annahme erhöhter Infektionsraten nach ischämischem Schlaganfall aufgrund gesteigerter sympathischer Aktivität wurde durch die PANTHERIS-Studie bekräftigt. In der Infektgruppe zeigten sich in den ersten zwei Tagen nach Studieneinschluss erhöhte Noradrenalinpiegel im Urin¹²⁵. Diese Untersuchungen sind übereinstimmend mit früheren Publikationen^{28,132}. Katecholamine begünstigen zudem über Inhibition der Th1-Antwort eine Promotion des Th1/Th2-Shift^{124,134,135}. Interessanterweise konnte in einer retrospektiven klinischen Studie ein protektiver Effekt von β -Blockern hinsichtlich des Auftretens von Pneumonien nach ischämischem Schlaganfall gezeigt werden¹³⁶.

Bei Betrachtung der hier vorgestellten Probandendaten ist zu erinnern, dass der Immunstatus des Individuums sowohl bezüglich der immunologischen Anamnese als auch der externen Einflussfaktoren, gerade im Hinblick auf die individuelle immunmodulatorische Potenz nicht bekannt war. Eine immunsuppressive Wirkung von Moxifloxacin wird diskutiert¹³⁷. Die intensivmedizinische Behandlung mit Noradrenalin, Glukokortikoiden oder künstlicher Ernährung beeinflusst die Immunantwort. Im Rahmen des hier behandelten Studienansatzes wird das Fehlen von immunmodulatorisch wirksamen externen Faktoren postuliert.

Die Infektionsgefährdung oder die Prognose nach einem ischämischen Schlaganfall anhand der TREC-Ratio im Blut ließ sich in der vorgelegten Untersuchung nur teilweise beurteilen. Interessanterweise zeigte sich eine signifikant erhöhte TREC-Ratio bei Probanden, welche innerhalb von 40 Tagen nach dem Schlaganfallereignis verstarben. Die TREC-Ratio der Verstorbenen war zudem entgegengesetzt der TREC-Alterskurve erhöht, was eine aktive Rolle von Immunprozessen nahelegt. Der signifikante Anstieg der TREC-Ratio bei verstorbenen Studienteilnehmern korrelierte negativ mit dem signifikanten Abfall von HLA-DR. Die erhöhte TREC-Ratio kann man hierbei als eine massive Lymphopenie deuten.

Ein Überblick der menschlichen T-Zell-Homöostase in vivo nach ischämischem Schlaganfall ist derzeit aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten nicht

zufriedenstellend realisierbar. Tierexperimentell konnte in der vorgelegten Arbeit eine erniedrigte TREC-Ratio im Vollblut bei erhöhter TREC-Ratio in der Milz gezeigt werden. Neben der Antwort des angeborenen Immunsystems auf einen ischämischen Schlaganfall werden zunehmend Arbeiten veröffentlicht, welche eine zusätzliche Rolle des adaptiven Immunsystems herausstellen^{28,33,91}. Beim Menschen beeinflusst die T-Zell gesteuerte Immunantwort nach einem ischämischen Schlaganfall sowohl die Pathogenese als auch die Prognose der Erkrankung⁴¹. Die Induktion einer T-Zell-Toleranz gegenüber Hirngewebsantigenen kann einen postischämischen Hirnschaden reduzieren³⁵. Es wird vermutet, dass eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke zur Exposition von Hirnantigenen führen kann, welche eine Autoimmunantwort auslösen. Eine zentrale immunsuppressive Reaktion auf eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke über die sympathische neuroendokrine Achse erscheint für den Schutz des ZNS sinnvoll. Ein denkbare entwicklungsgeschichtliches Szenario für einen entsprechenden hirnischämischen Reiz läge beispielsweise in der Evolution protektiver Mechanismen während einer Geburtshypoxie.

5.3.4 Analogien: TREC und SIRS

Zum Schluss des Kapitels wird noch ein Bogen zur Immunreaktion während eines *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) gespannt. Dieses ist definiert als systemische Entzündungsreaktion des Organismus auf einen endo- oder exogenen Reiz. SIRS-Reaktionen sind nach Trauma, Infektion, Pankreatitis und Myokardinfarkt bekannt^{138,139,140,141,142,143}.

Der Verlauf der Immunreaktion nach ischämischem Schlaganfall zeigt Parallelen zur Immunreaktion bei SIRS. Eine initial überschießende Reaktion des Immunsystems mündet durch Hochregulation des sympathischen Nervensystems nachfolgend in einer Immundiskrimination. Dies korreliert auf T-lymphozytärer Ebene mit einem Th1/Th2-Shift¹⁴⁴. Unter diesem Aspekt wäre ein Anstieg der TREC-Ratio ein Hinweis für eine bedeutende Immunsuppression. Gleichsinnig kann die Immunsuppression nach einem ischämischen Schlaganfall als Reaktion aus dem Formenkreis des SIRS begriffen und die TREC-Ratio als SIRS-Marker betrachtet werden.

Während eines SIRS besteht 48 Stunden nach Schädigungseintritt eine negative Korrelation zwischen der Expression von HLA-DR und der Mortalität^{127,145}. Die Untersuchung der TREC-Ratio in unseren Versuchen hat einen Anstieg innerhalb von zwölf Stunden nach Schlaganfall in vier von fünf verstorbenen Probanden ergeben.

Die hier untersuchte Subpopulation der verstorbenen Probanden war sehr klein und bezüglich Alter, Behandlung und Infarktschwere heterogen.

Es bleibt zu prüfen, ob die Bestimmung der TREC-Ratio als prognostischer Marker der Erkrankungsschwere nach ischämischem Schlaganfall oder bei Immunpathologien die nötige Sensitivität und Praktikabilität aufweist. Dennoch bietet die TREC-Analyse interessante Ansätze für weitere Untersuchungen in der Neurowissenschaft und im Bereich der SIRS-Forschung.

5.4 EXTERNE VALIDITÄT

Die TREC-Bestimmung aus Vollblut- oder Gewebeproben stellt eine schnelle, sensitive und reproduzierbare Methode der erweiterten Laboratoriumsmedizin dar. Als möglicher Kontrollparameter kann die TREC-Messung die Identifikation und Verlaufsbeobachtung immunsuppressiver Zustände oder der Thymusaktivität komplettieren.

In Zukunft könnte die TREC-Untersuchung der Vervollständigung der Gesamtinformation beim Erstellen eines individuellen immunologischen Profils dienen. Weitere Anwendungen finden sich in der experimentellen Forschung bei der Untersuchung systemischer regulatorischer Immunmechanismen. In der Neurowissenschaft bestehen Ansatzpunkte zusätzlicher Untersuchungen zur TREC-Dynamik nach hirnschädigenden Ereignissen wie Trauma, zerebraler Hämorrhagie oder ischämischem Schlaganfall. Die supplementäre TREC-Analyse kann dabei der Feststellung einer homöostatischen Änderung der Immunreaktion sowie der Quantifizierung der Immunaktivität dienen. Eine Messung der TREC-Ratio kann der Verlaufsbeobachtung neurologischer Autoimmunerkrankungen dienen. Vielseitige Einsatzmöglichkeiten bieten sich in der immunologischen Forschung. Die TREC-Ratio kann zum erweiterten Verständnis des Thymus als Teil eines neuroimmunologischen Netzwerkes bei Individuen aller Altersstufen beitragen. Eine Änderung der TREC-Ratio im Blut kann die homöostatischen Verschiebungen im Verlauf einer pathologischen Immunreaktion verdeutlichen. Die Verwendung der TREC-Ratio zur Verlaufsbeobachtung von systemischen Autoimmunerkrankungen wäre zu prüfen. Die TREC-Analyse wird aktuell erfolgreich zur Therapiekontrolle von HIV-Infektionen oder nach Knochenmarktransplantationen eingesetzt. Des Weiteren wären Erfolgskontrollen nach Organtransplantationen hinsichtlich der Frage einer Transplantatabstoßung denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Mit dieser Dissertationsarbeit wurde eine Methode zur indirekten Messung der Thymusfunktion anhand der Quantifizierung von TREC-DNA beim Menschen und im Mausmodell etabliert. Die Untersuchungsmethode zeigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität bei mäßigem Prozessierungsaufwand.

Die Studie umfasste Versuche an 29 Tieren nach experimentellem ischämischen Schlaganfall, eine sechsmonatige Verlaufsbeobachtung von 36 Probanden nach ischämischem Schlaganfall und eine Nachuntersuchung von 13 thymektomierten Probanden.

- Die Untersuchungen bestätigten den bekannten Abfall der TREC-Ratio mit zunehmendem Lebensalter sowie nach Thymektomie.
- Die Hypothese einer postischämischen Inhibition der Thymusfunktion deutet sich im Tiermodell an und kann beim Menschen in der Subgruppe der überlebenden Probanden signifikant bestätigt werden.
- Im Tierexperiment kam es postinterventionell zu einem signifikanten Anstieg der TREC-Ratio in der Milz und zum Abfall der TREC-Ratio im Blut, analog zu bekannten Phänomenen einer postischämischen Lymphopenie und eines Th1/Th2-Shift von T-Lymphozyten.
- Überraschend fand sich bei frühverstorbenen Schlaganfallprobanden ein signifikanter Anstieg der TREC-Ratio als Hinweis einer Immunsuppression.

Die vorliegende Arbeit gibt Einblicke in einen Teilaspekt des Schlaganfallinduzierten Immundepressionssyndroms (SIDS) hinsichtlich der thymischen und T-lymphozytären Reaktion und stützt die Hypothese einer schlaganfallinduzierten Neuroimmunmodulation. Sie zeigt die Rolle der TREC-Ratio im Kontext von SIDS auf und stellt diese als immunologischen Marker vor. Des Weiteren eröffnet sie Parallelen zwischen einem SIRS und dem ischämischen Schlaganfall unter dem Gesichtspunkt der Immundepression als weiteren Schritt auf dem Weg zum Verständnis der komplexen neuroimmunologischen Interaktion.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kolominsky-Rabas, P.L. *u. a.* Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* 37, 1179 – 1183 (2006).
2. Wolf, P.A. *u. a.* Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke* 23, 1551 –1555 (1992).
3. Astrup, J., Siesj, B.K. & Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723 –725 (1981).
4. Candelario-Jalil, E., Yang, Y. & Rosenberg, G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 983 – 994 (2009).
5. Nakamura, H. *u. a.* Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain* 133, 1994 – 2006 (2010).
6. Niizuma, K. *u. a.* Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1802, 92 – 99 (2010).
7. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391 – 397 (1999).
8. Lakhan, S.E., Kirchgessner, A. & Hofer, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7, 97 (2009).
9. ESO 2008 Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc. Dis.* 25, 457 – 507 (2008).
10. Saver, J.L. Time is brain--quantified. *Stroke* 37, 263 – 266 (2006).
11. Collaboration, S.U.T. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* CD000197 (2007).
12. Barer, D. Interpretation of IST and CAST stroke trials. International Stroke Trial. Chinese Acute Stroke Trial. *Lancet* 350, 440; author reply 443 – 440; author reply 444 (1997).
13. NINDS: Stroke Proceedings: Furlan Overview : National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS).
<http://www.ninds.nih.gov/news_and_events/proceedings/stroke_proceedings/furlan.htm>
14. Hacke, W. *u. a.* Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 359, 1317 – 1329 (2008).
15. Furlan, A. *u. a.* Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA* 282, 2003 – 2011 (1999).
16. Castillo, J., Duvalos, A., Marrugat, J. & Noya, M. Timing for fever-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 29, 2455 – 2460 (1998).

17. Georgilias, K., Plomaritoglou, A., Dafni, U., Bassiakos, Y. & Vemmos, K. Aetiology of fever in patients with acute stroke. *J Intern Med* 246, 203 – 209 (1999).
18. Grau, A.J. *u. a.* Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 32, 2559 – 2566 (2001).
19. Hénon, H. *u. a.* Early predictors of death and disability after acute cerebral ischemic event. *Stroke* 26, 392 – 398 (1995).
20. Johnston, K.C. *u. a.* Medical and neurological complications of ischemic stroke: experience from the RANTTAS trial. RANTTAS Investigators. *Stroke* 29, 447 – 453 (1998).
21. Emmerson, A.M., Enstone, J.E., Griffin, M., Kelsey, M.C. & Smyth, E.T. The Second National Prevalence Survey of infection in hospitals – overview of the results. *J Hosp Infect* 32, 175 – 190 (1996).
22. Kampf, G. *u. a.* Analysis of risk factors for nosocomial infections—results from the first national prevalence survey in Germany (NIDEP Study, Part 1). *J Hosp Infect* 37, 103 – 112 (1997).
23. Howard, R.J. & Simmons, R.L. Acquired immunologic deficiencies after trauma and surgical procedures. *Surg Gynecol Obstet* 139, 771 – 782 (1974).
24. Marik, P.E. Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl J Med* 344, 665 – 671 (2001).
25. Becker, K., Kindrick, D., McCarron, R., Hallenbeck, J. & Winn, R. Adoptive transfer of myelin basic protein-tolerized splenocytes to naive animals reduces infarct size: a role for lymphocytes in ischemic brain injury? *Stroke* 34, 1809 – 1815 (2003).
26. Elenkov, I.J., Papanicolaou, D.A., Wilder, R.L. & Chrousos, G.P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 108, 374 – 381 (1996).
27. Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. & Vizi, E.S. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52, 595 – 638 (2000).
28. Prass, K. *u. a.* Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198, 725 – 736 (2003).
29. Prass, K., Braun, J.S., Dirnagl, U., Meisel, C. & Meisel, A. Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia in a model of cerebral ischemia. *Stroke* 37, 2607 – 2612 (2006).
30. Meisel, C. *u. a.* Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke* 35, 2 – 6 (2004).
31. Hallenbeck, J.M., Hansson, G.K. & Becker, K.J. Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack. *Trends Immunol* 26, 550 – 556 (2005).
32. Saino, O. *u. a.* Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J Neurosci Res* 88, 2385 – 2397 (2010).
33. Yilmaz, G., Arumugam, T.V., Stokes, K.Y. & Granger, D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 113, 2105 – 2112 (2006).

34. Gee, J.M., Kalil, A., Shea, C. & Becker, K.J. Lymphocytes: potential mediators of postischemic injury and neuroprotection. *Stroke* 38, 783 – 788 (2007).
35. Becker, K.J. *u. a.* Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10873 – 10878 (1997).
36. Liesz, A. *u. a.* The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation. *Stroke* 40, 2849 – 2858 (2009).
37. Planas, A.M. & Chamorro, A. Regulatory T cells protect the brain after stroke. *Nat Med* 15, 138 – 139 (2009).
38. Garlich, C.D. *u. a.* Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 34, 1412 – 1418 (2003).
39. Bornstein, N.M. *u. a.* Antibodies to brain antigens following stroke. *Neurology* 56, 529 – 530 (2001).
40. Dambinova, S.A. *u. a.* Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem* 49, 1752 – 1762 (2003).
41. Nadareishvili, Z.G. *u. a.* Elevated pro-inflammatory CD4+CD28- lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology* 63, 1446 – 1451 (2004).
42. Rosa, S.C.D., Herzenberg, L.A., Roederer, M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 7, 245 – 248 (2001).
43. Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E. & Petrie, H.T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127 – 134 (2001).
44. Petrie, H.T. & Zuniga-Pflucker, J.C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 25, 649 – 679 (2007).
45. Dervovic, D. & Zuniga-Pflucker, J.C. Positive selection of T cells, an in vitro view. *Semin Immunol* 22, 276 – 286 (2010).
46. Michie, A.M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol* 14, 311 – 323 (2002).
47. Minter, L., Osborne, B. Cell death in the thymus—it's all a matter of contacts. *Semin Immunol* 15, 135 – 144 (2003).
48. Weinreich, M.A. & Hogquist, K.A. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* 181, 2265 – 2270 (2008).
49. Anderson, G., Jenkinson, E.J. & Rodewald, H.-R. A roadmap for thymic epithelial cell development. *Eur J Immunol* 39, 1694 – 1699 (2009).
50. Ramsden, D.A., Baetz, K. & Wu, G.E. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res* 22, 1785 – 1796 (1994).
51. Gellert, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71, 101 – 132 (2002).
52. Dongen, J.J. van, Comans-Bitter, W.M., Wolvers-Tettero, I.L. & Borst, J. Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. *Thymus* 16, 207 – 234 (1990).

53. Villartay, J.P. de, Hockett, R.D., Coran, D., Korsmeyer, S.J. & Cohen, D.I. Deletion of the human T-cell receptor delta-gene by a site-specific recombination. *Nature* 335, 170 – 174 (1988).
54. Verschuren, M.C., Wolvers-Tettero, I.L., Breit, T.M. & Dongen, J.J. van T-cell receptor V delta-J alpha rearrangements in human thymocytes: the role of V delta-J alpha rearrangements in T-cell receptor-delta gene deletion. *Immunology* 93, 208 – 212 (1998).
55. Hazenberg, M.D., Verschuren, M.C., Hamann, D., Miedema, F. & Dongen, J.J. van T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med* 79, 631 – 640 (2001).
56. Douek, D.C. *u. a.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690 – 695 (1998).
57. Breit, T.M. *u. a.* Human T cell leukemias with continuous V(D)J recombinase activity for TCR-delta gene deletion. *J Immunol* 159, 4341 – 4349 (1997).
58. Livak, F. & Schatz, D.G. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 16, 609 – 618 (1996).
59. Clark, D.R., Boer, R.J. de, Wolthers, K.C. & Miedema, F. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Adv Immunol* 73, 301 – 327 (1999).
60. Felten, D.L. & Felten, S.Y. Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun* 2, 293 – 300 (1988).
61. Savino, W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. *Neuroimmunomodulation* 17, 142 – 145 (2010).
62. Groves, T. *u. a.* In vitro maturation of clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *J Immunol* 154, 5011 – 5022 (1995).
63. Weihe, E. *u. a.* Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int J Neurosci* 59, 1 – 23 (1991).
64. Kawashima, K. & Fujii, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86, 29 – 48 (2000).
65. Kinoshita, Y. & Hato, F. Cellular and molecular interactions of thymus with endocrine organs and nervous system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 103 – 117 (2001).
66. Felten, D.L. Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signaling. *Prog Brain Res* 122, 381 – 389 (2000).
67. Savino, W. & Dardenne, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 21, 412 – 443 (2000).
68. Hannestad, J., Monjil, D.F., Díaz-Esnal, B., Cobo, J. & Vega, J.A. Age-dependent changes in the nervous and endocrine control of the thymus. *Microsc Res Tech* 63, 94 – 101 (2004).
69. Gavazzi, G. & Krause, K.-H. Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2, 659 – 666 (2002).
70. Agarwal, S. & Busse, P.J. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* 104, 183 – 90; quiz 190-2, 210 (2010).
71. Aspinall, R., Pitts, D., Lapenna, A. & Mitchell, W. Immunity in the elderly: the role of the thymus. *J Comp Pathol* 142 Suppl 1, S. 111 – S. 115 (2010).

72. Pinti, M. *u. a.* T cell homeostasis in centenarians: from the thymus to the periphery. *Curr Pharm Des* 16, 597 –603 (2010).
73. Aw, D., Silva, A.B. & Palmer, D.B. The effect of age on the phenotype and function of developing thymocytes. *J Comp Pathol* 142 Suppl 1, S. 45 – S. 59 (2010).
74. Goya, R.G., Cónsole, G.M., Herenú, C.B., Brown, O.A. & Rimoldi, O.J. Thymus and aging: potential of gene therapy for restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models. *Gerontology* 48, 325 –328 (2002).
75. Madden, K.S. & Felten, D.L. Beta-adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 189 – 196 (2001).
76. Almeida, A.R.M., Rocha, B., Freitas, A.A. & Tanchot, C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol* 17, 239 – 249 (2005).
77. Sprent, J., Cho, J.-H., Boyman, O. & Surh, C.D. T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol* 86, 312 – 319 (2008).
78. Hataye, J., Moon, J.J., Khoruts, A., Reilly, C. & Jenkins, M.K. Naive and memory CD4⁺ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* 312, 114 – 116 (2006).
79. Junge, S. *u. a.* Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol* 37, 3270 – 3280 (2007).
80. Michalek, R.D. & Rathmell, J.C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* 236, 190 – 202 (2010).
81. Surh, C.D. & Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848 – 862 (2008).
82. Tan, J.T. *u. a.* IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8732 – 8737 (2001).
83. Tanchot, C. & Rocha, B. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* 186, 1099– 1106 (1997).
84. Freitas, A. A. & Rocha, B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 18, 83–111 (2000).
85. Tanchot, C. *u. a.* Conversion of naive T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool. *J Immunol* 168, 5042 – 5046 (2002).
86. Berzins, S.P., Godfrey, D.I., Miller, J.F. & Boyd, R.L. A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9787 – 9791 (1999).
87. Rückert, J.C., Sobel, H.K., Göhring, S., Einhäupl, K.M. & Müller, J.M. Matched-pair comparison of three different approaches for thymectomy in myasthenia gravis. *Surg Endosc* 17, 711-715 (2003).
88. Sempowski, G.D. *u. a.* Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J Immunol* 164, 2180 – 2187 (2000).
89. Gendron, A. *u. a.* Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats. *Brain Res* 955, 85 – 97 (2002).

90. Offner, H. *u. a.* Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol* 176, 6523 – 6531 (2006).
91. Offner, H., Vandenbark, A.A. & Hurn, P.D. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience* 158, 1098 – 1111 (2009).
92. Hara, H., Huang, P.L., Panahian, N., Fishman, M.C. & Moskowitz, M.A. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 605 – 611 (1996).
93. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231 – 238 (1990).
94. Sanger, F. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett.* 87, 107 – 110 (1978).
95. Mullis, K. *u. a.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263 – 273 (1986).
96. Lind, K., Ståhlberg, A., Zoric N., Kubista, M. Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *BioTechniques* 40, 315 – 319 (2006).
97. Rückert, J. C., Swierzy, M. & Ismail, M. Comparison of robotic and nonrobotic thoracoscopic thymectomy: a cohort study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **141**, 673–677 (2011).
98. Mason, S. J.; Graham, N. E. (2002). Areas beneath the relative operating characteristics (ROC) and relative operating levels (ROL) curves: Statistical significance and interpretation. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* (128): 2145 – 2166.
99. Harms, H. *u. a.* Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One* 3, e2158 (2008).
100. Lukaszewicz, A.-C., Faivre, V. & Payen, D. Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? *Minerva Anesthesiol* **76**, 737–743 (2010).
101. Heid, C.A., Livak, K.J. & Williams, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986 – 994 (1996).
102. Loeffler, J. *u. a.* Quantification of T-cell receptor excision circle DNA using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. *J Immunol Methods* 271, 167 – 175 (2002).
103. Sodora, D.L. *u. a.* Decreased levels of recent thymic emigrants in peripheral blood of simian immunodeficiency virus-infected macaques correlate with alterations within the thymus. *J Virol* 76, 9981 – 9990 (2002).
104. Hazenberg, M.D., Borghans, J.A.M., Boer, R.J. de & Miedema, F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 4, 97 – 99 (2003).
105. Smith, K.Y. *u. a.* Thymic size and lymphocyte restoration in patients with human immunodeficiency virus infection after 48 weeks of zidovudine, lamivudine, and ritonavir therapy. *J Infect Dis* 181, 141 – 147 (2000).
106. Ackman, J. B. & Wu, C. C. MRI of the thymus. *AJR Am J Roentgenol* **197**, W15–20 (2011).
107. Kimmig, S. *u. a.* Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 195, 789–794 (2002).

108. Kilpatrick, R.D. *u. a.* Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J Immunol* 180, 1499 –1507 (2008).
109. Kohler, S. & Thiel, A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* 113, 769 – 774 (2009).
110. Kohler, S. *u. a.* Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol* 35, 1987–1994 (2005).
111. Hazenberg, M.D. *u. a.* Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 6, 1036 – 1042 (2000).
112. Harris, J.M. *u. a.* Multiparameter evaluation of human thymic function: interpretations and caveats. *Clin Immunol* 115, 138 – 146 (2005).
113. Almeida, A.R., Borghans, J.A. & Freitas, A.A. T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J Exp Med* 194, 591 – 599 (2001).
114. Jameson, S.C. T cell homeostasis: keeping useful T cells alive and live T cells useful. *Semin Immunol* 17, 231 –237 (2005).
115. Jameson, S.C., Masopust, D., Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31, 859 – 871 (2009).
116. Barthlott, T., Kassiotis, G. & Stockinger, B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* 197, 451 – 460 (2003).
117. Holländer, G.A. & Peterson, P. Learning to be tolerant: how T cells keep out of trouble. *J Intern Med.* 265(5), 541 – 61 (2009).
118. Marleau, A.M., Sarvetnick, N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J Leukoc Biol* 78, 575 – 584 (2005).
119. Arron, S.T. *u. a.* Impact of thymectomy on the peripheral T cell pool in rhesus macaques before and after infection with simian immunodeficiency virus. *Eur J Immunol* 35, 46 – 55 (2005).
120. Unutmaz, D., Pileri, P. & Abrignani, S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med* 180, 1159 – 1164 (1994).
121. Emsley, H.C.A. & Hopkins, S.J. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol* 7, 341 – 353 (2008).
122. Iadecola, C. & Alexander, M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 14, 89 – 94 (2001).
123. Chamorro, A. *u. a.* Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 252, 29 – 35 (2007).
124. Emsley, H.C.A. & Hopkins, S.J. Post-stroke immunodepression and infection: an emerging concept. *Infect Disord Drug Targets* 10, 91 – 97 (2010).
125. Klehmet, J. *u. a.* Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 158, 1184 – 1193 (2009).
126. Frazier, W.J. & Hall, M.W. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. *Pediatr Clin North Am* 55, 647 – 68, xi (2008).

127. Monneret, G. *u. a.* Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32, 1175 – 1183 (2006).
128. Asadullah, K. *u. a.* Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med* 23, 1976 – 1983 (1995).
129. Haeusler, K.G. *u. a.* Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis* 25, 50 – 58 (2008).
130. Vogelgesang, A. *u. a.* Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. *Stroke* 39, 237 – 241 (2008).
131. Beamer, N.B. *u. a.* Persistent inflammatory response in stroke survivors. *Neurology* 50, 1722 – 1728 (1998).
132. Chamorro, A., Urra, X. & Planas, A.M. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 38, 1097 – 1103 (2007).
133. Vila, N., Castillo, J., Dévalos, A. & Chamorro, A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 31, 2325 – 2329 (2000).
134. Panina-Bordignon, P. *u. a.* Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 100, 1513 – 1519 (1997).
135. Sanders, V.M. The role of adrenoceptor-mediated signals in the modulation of lymphocyte function. *Adv Neuroimmunol* 5, 283 – 298 (1995).
136. Dziedzic, T., Slowik, A., Pera, J. & Szczudlik, A. Beta-blockers reduce the risk of early death in ischemic stroke. *J Neurol Sci* 252, 53 – 56 (2007).
137. Dalhoff, A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 33 Suppl 2, 55 – 70 (2005).
138. Frangogiannis, N.G. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 58, 88 – 111 (2008).
139. Frantz, S., Bauersachs, J. & Ertl, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res* 81, 474 – 481 (2009).
140. Lenz, A., Franklin, G.A. & Cheadle, W.G. Systemic inflammation after trauma. *Injury* 38, 1336 – 1345 (2007).
141. Meisel, C., Schwab, J.M., Prass, K., Meisel, A. & Dirnagl, U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 775 – 786 (2005).
142. Miller, A.C., Rashid, R.M. & Elamin, E.M. The „T“ in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. *J Trauma* 63, 1407 – 1417 (2007).
143. Singh, V.K. *u. a.* Early systemic inflammatory response syndrome is associated with severe acute pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* 7, 1247 – 1251 (2009).
144. Iwasaka, H. & Noguchi, T. [Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS)]. *Nippon Rinsho* 62, 2237 – 2243 (2004).
145. Monneret, G. *u. a.* The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 95, 193 – 198 (2004).

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	-	Arteria / Arteriae
Ach	-	Acetylcholin
ANOVA	-	Analysis of Variance
ASS	-	Acetylsalicylsäure
BHS	-	Blut-Hirn-Schranke
bp	-	Basenpaar
CCR5	-	Chemokine-Receptor 5
CD	-	Cluster of Differentiation
CFU	-	Colony forming units (Bakterienkolonie-Einheit)
Cp	-	Crossing Point
CT	-	Computertomografie
DN, DP, SP	-	Zustände von T-Lymphozyten während der Thymopoese; doppelt negativ, doppelt positiv, single positiv
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
FACS	-	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	-	Fluorescein-Isothiocyanat
GABA	-	γ -Aminobuttersäure
GF	-	Growth Factor
GH	-	Growth Hormone
HAART	-	High Active Anti Retroviral Therapy
HLA	-	Human Leukocyte Antigen
IGF-1	-	Insuline like Growth Factor 1
IL	-	Interleukin
IFN- γ	-	Interferon γ
konst.	-	konstant
LPS	-	Lipopolysaccharid
MACS	-	Magnetic Activated Cell Sorting
MBP	-	Myelin-basisches Protein
MCAO	-	Middle cerebral artery occlusion
MHC	-	Haupthisto-kompatibilitätskomplex
MRT	-	Magnetresonanztomografie
MW	-	Mittelwert
Nachunters.	-	Nachuntersuchung
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information
NIH-SS	-	National Institute of Health Stroke Scale
NK	-	Nullkontrolle
NTP	-	Nukleosidtriphosphat
OG	-	oberer Grenzwert

PBMC	-	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	-	Phosphate Buffered Sialine
p	-	Signifikanzniveau ($p = 0.05$)
PCR	-	Polymerase Kettenreaktion
PE	-	Phycoerythrin
PerCP	-	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PRL	-	Prolactin
RAG	-	Recombinase Activating Gene
REML	-	Restricted Maximum Likelihood
ROC	-	Receiver Operating Characteristic
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
RSS	-	Rekombinations Signal Sequenz
rtPA	-	rekombinanter Plasminogenaktivator
RT	-	Raumtemperatur
RTE	-	Recent Thymic Emigrant
SCID	-	Severe Combined Immunodeficiency
Sham	-	OP-Kontrolle
SIDS	-	Schlaganfallinduziertes Immundepressions Syndrom
SIRS	-	Systemic Inflammatory Response Syndrom
StDev	-	Standarddeviation
T_{eff}	-	effector T-Zell Pool
T_{mem}	-	memory T-Zell Pool
T_{nav}	-	naiver T-Zell Pool
T_{reg}	-	regulatorischer T-Zell Pool
TCR	-	T Cell Receptor
TEC	-	Thymic Epithel Cell
TGF β	-	Transforming Growth Factor
Th1 / Th2	-	T-Zell Shift
Th1	-	T-Zell Aktivierungszustand: proinflammatorisch-zellulär
Th2	-	T-Zell Aktivierungszustand: tolerierend/supprimierend
TIA	-	transitorischer ischämischer Anfall
TLR	-	Toll-Like-Receptor Komplex
TNF	-	Tumor Nekrose Faktor
TOLL2	-	Toll-Like-Receptor 2
TREC	-	T Cell Receptor Excision Circle
UG	-	unterer Grenzwert
ZNS	-	Zentralnervensystem

8.2 Verbrauchsmaterialien und Instrumente

Lichtmikroskope Leica DMIL, KL1500	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Gelelektrophorese Kammer DNA subCell	BioRad, München
Elektroporationskammer	Invitrogen, Karlsruhe
Thermocycler Hybaid®	Hybaid Ltd, Ashford, UK
Thermocycler Light Cycler 1.5®	Roche, Mannheim
Typhoon 8600® Gel Imaging System	GE Healthcare, München
Photometer	Eppendorf, Hamburg
MACS Zellseparations Modul	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Zytometer FACS Calibur	BD Bioscience, Heidelberg
Zentrifuge Eppendorf R1804	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge SIGMA 3K30	Sigma Aldrich, München
Tischschüttler (Vortexer) MS3	VWR Scientific, Darmstadt
Inkubator Gallenkamp plus II	Gallenkamp, Loughborough, (UK)
ALF2® Sequencer	Amersham Pharmacia, Nümbrecht
Mikrotom Microm HM350	Thermo Fisher, Karlsruhe (UK)

Chemikalien:

Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Toluidinblau (Zellzählen)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Polymerase Taq	Stratagene, LaJolla (USA)
DNA-Polymerase Pfu	Stratagene, LaJolla (USA)
Bacto Agar	BD Bioscience, Heidelberg
Bacto Trypton	BD Bioscience, Heidelberg
Orange G® Ladepuffer-Farbstoff	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP, ddNTP	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll Paque	Amersham Pharmacia, Nümbrecht
Ethanol, Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Ladder (1 kb plus, SMART)	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
PCR Puffer (Taq, Pfu)	Stratagene, LaJolla (USA)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Carl Roth, Karlsruhe
Primer Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
QIAGEN Plasmid Extraction Kit®	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit®	Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit®	Qiagen, Hilden
Restriktive Endonukleasen EcoRI, BamHI	New England Biolabs, Frankfurt/M.
TOPO ZeroBlunt Cloning Kit®	Invitrogen, Karlsruhe
TRIS Puffer (pH 8,0)	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Antikörper FACS	BD Bioscience, Heidelberg
Antikörper MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
MACS Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
RPMI Medium	Biochrom, Berlin

Media:

TBE Puffer:	Trishydroxymethylaminomethan 0,5 M, Borsäure 0,5 M, EDTA 20 mM
TRIS-Puffer:	Tris-HCl (pH 8) 1 M, EDTA (pH 8) 0,5 M, NaCl 5 M
ALF-Ladepuffer:	Glycerol 87 %, Bromphenolblau 7,2 M
SOC Medium:	Tryptone 20 g, Hefe 5 g, NaCl 0,5 g, 1M KCl 2,5 ml, H ₂ O 1l
FACS Puffer:	BSA 10 % 5 ml, Na-Azid 10 % 1 ml, EDTA 4 ml, 1xPBS 490 ml
Zellysepuffer:	Tris/HCl 20 mM, EDTA 10 mM, Titrieren bis pH 8,0
EDTA 0,5 M:	EDTA 16,81 g, H ₂ O 95 ml, Titrieren bis pH 7
LB Medium:	Tryptone 10 g, Hefe 5 g, NaCl 5 g, Agar 13 g, H ₂ O 1l

Vektoren und Bakterien:

pcr Blunt II TOPO® Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrokompetente Bakterien (TOP10®)	Invitrogen, Karlsruhe

Tiere:

Maus C57/Bl 6, Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin (Projektnummer: G0063/04)

Software

ALF Sequencing Software, CellQuest, ImageQuant 5.1, Light Cycler 3 Data Analysis, PrimerPremier, SPSS Statistical Analysis Software, SIGMA Statistical Analysis Software

8.3 Berechnung der TREC-Ratio:

Anzahl der TREC-DNA im Verhältnis zur Anzahl der Referenzgen-DNA, multipliziert mit 2,22 (45% TREC-Zellen mit TCRD-Rekombinationen s. S.13).

$$TREC-Ratio = 2,22 \times [n(TREC) / n(CCR5)]$$

8.4 Tabellen

Tab. 8: Tests der Haupteffekte der Modelle.

Gezeigt sind Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse der murinen Untersuchungen. Die signifikanten Unterschiede bezüglich des Faktors Gruppe (Nativkontrolle, Sham und MCAO) sind rot markiert. Die Spalte „P-Wert“ enthält die Signifikanzen der einfaktoriellen Varianzanalyse. Zwischen welchen der drei Gruppen im Einzelnen signifikante Unterschiede nachweisbar sind, ergibt sich aus der Tab.5).

Zeit	Kompartiment	n	Faktor	F-Wert	P-Wert	Power
T1	Blut-gesamt	13	Gruppe	0,631	0,552	0,128
T1	Blut-CD4	13	Gruppe	2,149	0,173	0,329
T1	Blut-CD8	13	Gruppe	3,764	0,065	0,533
T1	Milz-gesamt	13	Gruppe	4,620	0,042	0,624
T1	Milz-CD4	13	Gruppe	0,103	0,903	0,061
T1	Milz-CD8	13	Gruppe	6,216	0,020	0,759
T1	Thymus	13	Gruppe	2,289	0,172	0,320
T2	Blut-gesamt	9	Gruppe	0,010	0,990	0,051
T2	Blut-CD4	9	Gruppe	1,342	0,305	0,225
T2	Blut-CD8	9	Gruppe	9,579	0,005	0,926
T2	Milz-gesamt	9	Gruppe	5,964	0,018	0,770
T2	Milz-CD4	9	Gruppe	47,617	0,000	1,000
T2	Milz-CD8	9	Gruppe	0,137	0,873	0,066
T2	Thymus	9	Gruppe	5,047	0,034	0,665

Tab. 9: Paarvergleiche der Gruppen. Diese Tabelle enthält die paarweisen Vergleichstests zwischen den Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse. Ist die Differenz positiv, dann ist der Wert von „Gruppe 1“ größer als der von Gruppe 2. Zu beachten ist, dass die paarweisen Vergleiche nur dann von Interesse sind, wenn der globale Test (Tab. 3) auch eine Signifikanz aufweist, was in unserem Fall immer zutrif. Die signifikanten Unterschiede zwischen MCAO und Sham sind gesondert hervorgehoben.

Zeit	Kompartiment	Gruppe 1	Gruppe 2	DIFF	STDF	P	UG	OG
Tag 3	Blut-gesamt	Naiv	Sham	-0,091	0,184	0,950	-0,617	0,435
Tag 3	Blut-gesamt	Naiv	MCAO	0,126	0,184	0,882	-0,401	0,652
Tag 3	Blut-gesamt	Sham	MCAO	0,217	0,194	0,642	-0,338	0,771
Tag 21	Blut-gesamt	Naiv	Sham	-0,024	0,179	0,999	-0,527	0,479
Tag 21	Blut-gesamt	Naiv	MCAO	-0,019	0,169	0,999	-0,493	0,456
Tag 21	Blut-gesamt	Sham	MCAO	0,005	0,179	1,000	-0,498	0,508
Tag 3	Blut-CD4	Naiv	Sham	0,188	0,442	0,967	-1,102	1,479
Tag 3	Blut-CD4	Naiv	MCAO	0,870	0,442	0,222	-0,421	2,160
Tag 3	Blut-CD4	Sham	MCAO	0,682	0,442	0,401	-0,609	1,972
Tag 21	Blut-CD4	Naiv	Sham	0,570	0,395	0,447	-0,559	1,699
Tag 21	Blut-CD4	Naiv	MCAO	0,532	0,375	0,461	-0,540	1,603
Tag 21	Blut-CD4	Sham	MCAO	-0,038	0,375	0,999	-1,110	1,033
Tag 3	Blut-CD8	Naiv	Sham	0,263	0,258	0,706	-0,492	1,017
Tag 3	Blut-CD8	Naiv	MCAO	0,701	0,258	0,070	-0,054	1,455
Tag 3	Blut-CD8	Sham	MCAO	0,438	0,258	0,327	-0,316	1,192
Tag 21	Blut-CD8	Naiv	Sham	0,655	0,178	0,013	0,145	1,165
Tag 21	Blut-CD8	Naiv	MCAO	0,670	0,169	0,008	0,186	1,154
Tag 21	Blut-CD8	Sham	MCAO	0,015	0,169	1,000	-0,469	0,499
Tag 3	Milz-gesamt	Naiv	Sham	-0,474	0,266	0,291	-1,253	0,304
Tag 3	Milz-gesamt	Naiv	MCAO	-0,728	0,245	0,046	-1,442	-0,013
Tag 3	Milz-gesamt	Sham	MCAO	-0,253	0,278	0,769	-1,067	0,561
Tag 21	Milz-gesamt	Naiv	Sham	0,219	0,149	0,427	-0,199	0,637
Tag 21	Milz-gesamt	Naiv	MCAO	-0,289	0,140	0,179	-0,683	0,105
Tag 21	Milz-gesamt	Sham	MCAO	-0,508	0,149	0,017	-0,926	-0,090
Tag 3	Milz-CD4	Naiv	Sham	-0,027	0,095	0,990	-0,303	0,250
Tag 3	Milz-CD4	Naiv	MCAO	-0,038	0,087	0,964	-0,292	0,216
Tag 3	Milz-CD4	Sham	MCAO	-0,012	0,099	0,999	-0,301	0,277
Tag 21	Milz-CD4	Naiv	Sham	0,497	0,051	0,001	0,354	0,641
Tag 21	Milz-CD4	Naiv	MCAO	0,207	0,048	0,004	0,072	0,342
Tag 21	Milz-CD4	Sham	MCAO	-0,290	0,051	0,001	-0,434	-0,147
Tag 3	Milz-CD8	Naiv	Sham	-0,283	0,146	0,233	-0,709	0,144
Tag 3	Milz-CD8	Naiv	MCAO	-0,466	0,134	0,021	-0,858	-0,075
Tag 3	Milz-CD8	Sham	MCAO	-0,184	0,153	0,594	-0,630	0,262
Tag 21	Milz-CD8	Naiv	Sham	0,006	0,104	1,000	-0,288	0,299
Tag 21	Milz-CD8	Naiv	MCAO	0,048	0,098	0,952	-0,229	0,325
Tag 21	Milz-CD8	Sham	MCAO	0,042	0,104	0,972	-0,252	0,335
Tag 3	Thymus	Naiv	Sham	-0,257	0,178	0,474	-0,811	0,298
Tag 3	Thymus	Naiv	MCAO	-0,351	0,166	0,204	-0,869	0,168
Tag 3	Thymus	Sham	MCAO	-0,094	0,166	0,931	-0,613	0,424
Tag 21	Thymus	Naiv	Sham	-0,305	0,151	0,206	-0,747	0,136
Tag 21	Thymus	Naiv	MCAO	-0,458	0,144	0,034	-0,880	-0,036
Tag 21	Thymus	Sham	MCAO	-0,153	0,133	0,624	-0,541	0,235

Tab. 10: Test der Haupteffekte der Modelle.

Im Vergleich zum Schritt 1 wurde jetzt in einem gemeinsamen Modell der Zeitfaktor berücksichtigt. Dafür wurde die Nativkontrolle aus dem Faktor Gruppe ausgeschlossen. Der Faktor Zeit umfasst zwei Faktorstufen (Tag 3 und Tag 21), ebenso der Faktor Gruppe (Sham und MCAO). Die Signifikanz der beiden Faktoren im Modell einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ergibt sich aus der Spalte „P-Wert“. Jedes Modell besteht aus drei Zeilen. Die erste Zeile steht für den Faktor Gruppe, die zweite Zeile für den Faktor Zeit und die dritte Zeile für die Wechselwirkung zwischen dem Faktor Gruppe und dem Faktor Zeit. Die Wechselwirkung berücksichtigt eine mögliche unterschiedliche Wirkung der Zeit in den beiden Gruppen Sham und MCAO. Die signifikanten Parameter sind rot markiert.

Zielgröße	Parameter	F-Wert	P-Wert	Power
Blut-gesamt	Gruppe	2,285	0,155	0,288
Blut-gesamt	Zeit	0,275	0,609	0,078
Blut-gesamt	Gruppe * Zeit	2,075	0,173	0,267
Blut-CD4	Gruppe	7,812	0,015	0,734
Blut-CD4	Zeit	0,036	0,853	0,054
Blut-CD4	Gruppe * Zeit	9,789	0,008	0,824
Blut-CD8	Gruppe	4,117	0,063	0,468
Blut-CD8	Zeit	2,627	0,129	0,324
Blut-CD8	Gruppe * Zeit	3,584	0,081	0,418
Milz-gesamt	Gruppe	7,410	0,019	0,705
Milz-gesamt	Zeit	16,384	0,002	0,960
Milz-gesamt	Gruppe * Zeit	0,830	0,380	0,134
Milz-CD4	Gruppe	9,452	0,010	0,806
Milz-CD4	Zeit	61,362	0,001	0,988
Milz-CD4	Gruppe * Zeit	8,035	0,015	0,740
Milz-CD8	Gruppe	0,955	0,348	0,147
Milz-CD8	Zeit	30,686	0,001	0,988
Milz-CD8	Gruppe * Zeit	2,421	0,146	0,299
Thymus	Gruppe	1,232	0,289	0,176
Thymus	Zeit	0,491	0,497	0,099
Thymus	Gruppe * Zeit	0,070	0,796	0,057

Tab. 11: Schätzung der Modellkoeffizienten anhand der REML Methode.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der linearen Modellschätzung der einzelnen Subgruppen im Zeitverlauf. Bei den geschätzten Mittelwerten handelt es sich um Mittelwerte über alle Zeitpunkte hinweg, wobei der Zeiteffekt im Modell mitberücksichtigt wurde. Die signifikanten Ergebnisse sind rot markiert.

Modell	Fraktion	Parameter	F-Wert	P
Modell 1	PBMC	Zeit	0,190	0,943
Modell 1	PBMC	Verum	0,006	0,939
Modell 2	PBMC	Zeit	0,195	0,940
Modell 2	PBMC	Geschlecht	0,386	0,537
Modell 3	PBMC	Zeit	0,273	0,894
Modell 3	PBMC	Alter	7,060	0,011
Modell 4	PBMC	Zeit	0,186	0,945
Modell 4	PBMC	Seite	0,553	0,461
Modell 5	PBMC	Zeit	0,182	0,947
Modell 5	PBMC	Schweregrad	0,244	0,623
Modell 6	PBMC	Zeit	0,401	0,807
Modell 6	PBMC	Prognose	3,566	0,066
Modell 7	PBMC	Zeit	0,240	0,788
Modell 7	PBMC	Tod	4,987	0,031
Modell 8	PBMC	Zeit	0,181	0,947
Modell 8	PBMC	Infekt	1,121	0,295
Modell 1	CD4	Zeit	0,186	0,945
Modell 1	CD4	Verum	0,004	0,949
...
Modell 7	CD4	Zeit	0,047	0,954
Modell 7	CD4	Tod	4,641	0,037
Modell 8	CD4	Zeit	0,164	0,956
Modell 8	CD4	Infekt	2,279	0,139
Modell 1	CD8	Zeit	0,661	0,622
Modell 1	CD8	Verum	0,017	0,898
...
Modell 7	CD8	Zeit	0,368	0,694
Modell 7	CD8	Tod	12,318	0,001
Modell 8	CD8	Zeit	0,647	0,631
Modell 8	CD8	Infekt	0,073	0,788

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Michael Josef Richter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung zur Immundepression nach ischämischem Schlaganfall anhand der fortlaufenden Analyse der Thymusfunktion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, 05.04.2013

Michael Josef Richter

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.