

1. Einleitung

1.1 Das Gehirn	1
1.1.1 Die Zellen des Nervensystems	3
1.1.1.1 Neuronen.....	3
1.1.1.2 Glia-Zellen.....	4
1.1.1.3 Mikroglia-Zellen.....	4
1.2 Das Immunsystem	5
1.2.1 Evolution des Immunsystems	5
1.2.2 Zellen des Immunsystems	6
1.2.2.1 Makrophagen und Dendritische Zellen.....	7
1.2.2.2 B- und T-Zellen.....	8
1.2.3 Die Immunantwort	10
1.2.4 Arten der Regulation	12
1.3 Gehirn und Immunität	13
1.3.1 Stellung des Gehirns im Immunsystem	13
1.3.2 Immunzellen des Gehirns	14
1.4 Der Mannose-Rezeptor	16
1.4.1 Aufbau des Mannose-Rezeptors	16
1.4.1.1 Die Cystein-reiche Domäne (Cr-Domäne).....	17
1.4.1.2 Die Kohlenhydrat-erkennenden und -bindenden Domänen (CRD's).....	18
1.4.1.3 Fibronectin Typ-II-Domäne.....	19
1.4.1.4 Transmembran- und intrazelluläre Domäne.....	19

1.4.1.5 Die lösliche Form des Mannose-Rezeptors.....	19
1.4.2 Funktion des Mannose-Rezeptors.....	20
1.4.2.1 Liganden des Mannose-Rezeptors.....	20
1.4.2.2 Über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose und Phagozytose.....	21
1.4.2.3 Rolle des Mannose-Rezeptors bei der Immunabwehr.....	23
1.4.2.4 Regulation der Expression und Funktion des Mannose-Rezeptors durch Zytokine....	24
1.4.2.5 Aktivierung der Zellen über den Mannose-Rezeptor.....	25
 1.5 Fragestellung.....	 26
 2. Material und Methoden	
 2.1 Material.....	 27
2.1.1 Tiere.....	27
2.1.2 Reagenzien, Lösungen und Medien.....	27
2.1.2.1 Reagenzien.....	27
2.1.2.2 Lösungen und Puffer.....	29
2.1.2.3 Medien.....	32
2.1.3 Antikörper.....	35
2.1.4 Allgemeine Geräte.....	36
2.1.5 Zellkulturmaterialien.....	38
 2.2 Methoden.....	 40
2.2.1 Zell- und Gewebekultur.....	40
2.2.1.1 Poly-L-Lysin (PLL)-Beschichtung von Zellkulturflaschen oder Deckgläsern.....	40
2.2.1.2 Gemischte Astrozyten / Mikroglia-Primärkulturen.....	40
2.2.1.3 Sekundärkulturen.....	41

2.2.1.4 Umsetzen der Mikrogliazellen (Trypsinierung).....	42
2.2.1.5 Gewebekultur von Schnitten aus Mäusehirn.....	43
2.2.1.6 Kultur von <i>Candida albicans</i> und Gewinnung der Candida-Stocks.....	43
2.2.1.7 Gewinnung von aktivierten Makrophagen.....	44
2.2.2 Biochemische Methoden.....	44
2.2.2.1 Präparation von Zell-Lysaten.....	44
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay).....	45
2.2.2.3 Bestimmung der spezifischen HRP-Aktivität (TMB-Assay).....	45
2.2.2.4 Western-Blot Analyse.....	46
2.2.2.4a Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.2.2.4b Proteintransfer durch Western-Blot.....	47
2.2.2.4c Proteinnachweis durch Ponceau S-Färbung.....	48
2.2.2.4d Immundetektion	48
2.2.2.5 Affinitäts-Aufreinigung von IgG Antikörpern.....	49
2.2.2.6 Ermittlung der Proliferation von Mikrogliazellen nach Zytokin-Stimulation.....	51
2.2.2.7 Gewinnung der Zellkultur-Überstände für den ELISA-Assay.....	52
2.2.2.8 ELISA-Assay.....	52
2.2.2.9 Etablierung der Zelldichte für die Durchführung des HRP-Assays in 96-Well Platten.....	53
2.2.2.10 Protokoll zur Ermittlung der durch den Mannose-Rezeptor bedingten HRP-Aufnahme in Mikrogliazellen (HRP-Assay).....	54
2.2.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	55
2.2.3.1 Fixierung und Färbung von isolierten Zellen für die Immunfluoreszenz- Mikroskopie.....	55
2.2.3.2 Fixierung und Färbung von Schnittkulturen.....	56
2.2.3.3 Perfusion von Mäusen.....	56
2.2.3.4 Anfertigen von Kryoschnitten aus Mäusehirn.....	57
2.2.3.5 Färbung von Hirnschnitten.....	57

2.2.4 FACS-Analyse von Mikroglia-Zellen	58
2.2.4.1 Ermittlung der Oberflächenexpression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen mittels FACS-Analyse.....	59
2.2.4.2 Ermittlung der mAlbumin/FITC Konzentration für die FACS-Analyse von Mikroglia-Zellen.....	60
2.2.4.3 Ermittlung der mAlbumin/FITC Aufnahme in stimulierten Mikroglia-Zellen durch FACS-Analyse.....	61
2.2.4.4 Nachweis der Aufnahme von mAlbumin/FITC durch den Mannose- Rezeptor in Mikroglia-Zellen durch Färbung gegen CD45.....	61
2.2.4.5 FACS-Analyse der Expression von MHC-II in Mikroglia-Zellen.....	62
 2.2.5 Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen	 63
2.2.5.1 Phagozytose-Assay und Färbeprotokoll zur Ermittlung der Lokalisation von <i>Candida albicans</i> (Standardprotokoll).....	63
2.2.5.2 Analyse der Aufnahme von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	64
2.2.5.3 Ermittlung der Kinetik der Aufnahme von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	65
2.2.5.4 Ermittlung der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> nach Addition von Inhibitoren.....	65
2.2.5.5 Ermittlung der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in stimulierten Mikroglia-Zellen.....	66
 3. Ergebnisse	
 3.1 Proliferation von Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen	 67
 3.1.1 Proliferation nach Stimulation mit IFN-γ	 68
 3.1.2 Proliferation nach Stimulation mit IL-4	 69
3.1.2.1 Stimulation mit IL-4 (0 U/ml bis 500 U/ml).....	69
3.1.2.2 Stimulation mit IL-4 (0 U/ml bis 100 U/ml).....	70

3.1.3 Vergleich der Proliferation von Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IFN-γ und IL-4	71
3.2 Mannose-Rezeptor Expression in Mikroglia-Zellen nach Zytokin-Stimulation	72
3.2.1 Analyse der gesamten Expression (intrazellulär und auf der Zelloberfläche)	72
3.2.1.1 Analyse der Mannose-Rezeptor Expression nach Stimulation mit IFN- γ	72
3.2.1.2 Analyse der Mannose-Rezeptor Expression nach Stimulation mit IL-4.....	74
3.2.1.3 Vergleich der Expression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ und IL-4.....	76
3.2.2 Ermittlung der Konzentration des Mannose-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Mikroglia-Zellen und Makrophagen	77
3.3 Rezeptor-vermittelte Endozytose in Mikroglia-Zellen	78
3.3.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose von HRP in Mikroglia-Zellen	78
3.3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose von mannosyliertem Albumin-FITC in Mikroglia-Zellen	79
3.3.2.1 Titration der mAlbumin-FITC Konzentration.....	80
3.3.2.2 Verifikation des Zelltyps, der mAlbumin-FITC in den verwendeten Zellkulturen aufnimmt.....	82
3.3.3 Regulation der Endozytose in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit Zytokinen	84
3.3.3.1 mAlbumin-FITC Aufnahme in Mikroglia-Zellen nach der Stimulation mit IFN γ	84
3.3.3.1a Die gesamte Endozytose.....	84
3.3.3.1b Die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose.....	86
3.3.3.1c Aktivität des Mannose-Rezeptors.....	88
3.3.3.2 mAlbumin-FITC Aufnahme in Mikroglia-Zellen nach der Stimulation mit IL-4.....	91
3.3.3.2a Die gesamte Endozytose.....	91

3.3.3.2b Die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose.....	94
3.3.3.2c Aktivität des Mannose-Rezeptors.....	96
3.4 Charakterisierung der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	99
3.4.1 Charakterisierung der konstitutiven Phagozytose von <i>Candida albicans</i> durch Mikroglia-Zellen.....	100
3.4.1.1 Ermittlung der Kinetik der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	100
3.4.1.2 Ermittlung der Rolle des Mannose- und der β -Glucan-Rezeptoren bei der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	102
3.4.1.2a Inhibition der Aufnahme von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen durch verschiedene Konzentrationen des Inhibitors Mannan.....	102
3.4.1.2b Vergleich des inhibitorischen Effekts von Mannan und Laminarin auf die Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	104
3.4.1.2c Analyse der über den Mannose-Rezeptor und der nicht über den Mannose- Rezeptor vermittelte Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen.....	105
3.4.2 Ermittlung der Auswirkungen einer Stimulation mit Zytokinen auf die Phagozytose von <i>Candida albicans</i> durch Mikroglia-Zellen.....	108
3.4.2.1 Modulation der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ	109
3.4.2.2 Modulation der Phagozytose von <i>Candida albicans</i> in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IL-4.....	110
3.5 Aktivierung von Mikroglia-Zellen durch ein Pathogen.....	112
3.5.1 Ermittlung der MHC-II-Expression in Mikroglia-Zellen.....	112
3.5.2 Zytokin-Ausschüttung durch Mikroglia-Zellen nach Inkubation mit <i>C. albicans</i> bzw. Mannan.....	113

3.6 Etablierung der Kultur von Hirnschnitten	114
4. Diskussion	
4.1 Proliferative Antwort der Mikroglia-Zellen auf Zytokin-Stimulation	117
4.2 Regulation der Expression des Mannose-Rezeptors durch Stimulation mit IFN-γ und IL-4	120
4.3 Endozytose in Mikroglia-Zellen	121
4.3.1 Ermittlung der über den Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose von HRP in stimulierten Zellen	121
4.3.2 Ermittlung der Endozytose mittels FACS-Analyse	122
4.3.3 Auswirkungen einer Stimulation mit Zytokinen auf die Endozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen	123
4.4 Phagozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen	127
4.4.1 Allgemeine Charakterisierung der Phagozytose	128
4.4.1.1 Kinetik der Phagozytose von <i>C. albicans</i> durch Mikroglia-Zellen.....	128
4.4.1.2 Ermittlung des Anteils des Mannose-Rezeptors und der β -Glucan Rezeptoren an der Aufnahme von <i>C. albicans</i>	129
4.4.1.3 Kinetik der <i>C. albicans</i> Aufnahme nach Inhibition durch Mannan.....	130
4.4.2 Auswirkungen einer Stimulation durch Zytokine auf die Phagozytose von <i>C. albicans</i> durch Mikroglia-Zellen	131
4.5 Aktivierung von Mikroglia-Zellen durch ein Pathogen	133
4.5.1 Modulation der MHC-II-Expression	133
4.5.2 Freisetzung von Zytokinen nach Zugabe von Mannan und <i>C. albicans</i>	134

4.6 Etablierung der Kultur von Hirnschnitten	136
4.7 Schlußwort	137
5. Zusammenfassung	138
6. Anhang	139
6.1 Abbildungsverzeichnis	139
6.2 Abkürzungsverzeichnis	142
6.3 Literaturverzeichnis	145