

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Zur Herstellung der primären Zellkulturen wurden BALB/c Mäuse verwendet, deren Gehirne am Tage der Geburt bzw. bis zu 2 Tagen nach der Geburt präpariert wurden.

Zur Herstellung der Gehirnschnitte wurden BALB/c Mäuse im Alter von 4 bis 8 Tagen bzw. adulte Tiere verwendet.

Die Mäuse stammten aus dem Tierstall der Universität Heidelberg.

2.1.2 Reagenzien, Lösungen und Medien

2.1.2.1 Reagenzien

BSA (Rinderserum Albumin Fraktion V)

Nr. 160069; ICN Biomedicals, Ohio

Cyanacrylat-Klebstoff

Roti-Coll 1, Nr. 0258.1; Carl Roth, Karlsruhe

DNase (aus Rinderpankreas)

0.05 % in HBSS⁻; pH 6.8; bei -20°C gelagert;

Boehringer Mannheim

ELISA-Kit

TNF- α , Nr. 558874, Pharmingen

IL-12, Nr. 555256, Pharmingen

IFN- γ , Nr. 555138, Pharmingen

Einbettmedium für Gefrierschnitte

Nr. 020108926; Leica Instruments, Nussloch

Glucose:

Nr. 19002-013; Gibco BRL

Glyzin

Nr. 1.04201; Merck, Darmstadt

Mannan (aus *Saccharomyces cerevisiae*)

Nr. M-7504; Sigma, München

Mannosyliertes Albumin-FITC

Nr. A-7790; Sigma, München

Meerrettichperoxidase (HRP, 486 U/ml)

Nr. 31942; Serva, Heidelberg

Mowiol 40-88

Nr. 32,4549-0; Aldrich, Steinheim

Poly-L-Lysin (PLL)

Hydrobromide Degree of Polymerisation 450000;
0.1 % (w/v) in H₂O; bei -20°C gelagert; Sigma
München

Ponceau S Lösung (0.2 % in 3 % TCA)

Nr. 33427; Serva Heidelberg

Triton X-100 (TX-100)

Nr. 1.08603.1000; Merck, Darmstadt

Tris -(hydroxymethyl)-aminomethan

Nr. 4855.2; Roth, Karlsruhe

Trypsin

1 % in HBSS⁻; pH 7.8; bei -20°C gelagert; Gibco

Trypsin / EDTA

10 mM EDTA (Tetraplex III) in PBS; Roth,
Karlsruhe, 0.05 % Trypsin in CMF/PBS zugefügt

Tween-20 (Polyethylenesorbitan Monolaurate)

Nr. P-1379; Sigma, München

Die allgemeinen Laborchemikalien wurden von Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

Es wurde entsalztes und zweifach destilliertes Wasser verwendet, welches mit Hilfe des Plus Ultra-Pure Water System der Firma Millipore hergestellt wurde.

2.1.2.2 Lösungen und Puffer

Acrylamid

Wässrige Lösung aus 30 % (w/v)
Acrylamid / Bisacrylamid (37.5 : 1) , Mix 4K,
(AGS GmbH), bei RT gelagert

Chemoluminiszenz-Reagenz

(Western blotting detection reagents)

ECL (Amersham LIFE SCIENCE)

DMEM/BSA (DB)

DMEM
0.1 % BSA

DMEM/BSA/Azid

DMEM
0.1 % (w/v) BSA
0.02 % (v/v) NaN₃

Fixanz für Perfusion

2 % Paraformaldehyd

PBS

Interleukin-4 (IL-4)

Rekombinantes Maus IL-4; R&D-Systems, Nr.404-ML

Interferon- γ (IFN- γ)

Rekombinantes Maus IFN- γ ; R&D-Systems, Nr. 485-MI

10 x Laufpuffer

0.25 M Tris/HCl, pH 8.8

1.9 M Glyzin

1 % (w/v) SDS

Lysepuffer (TX-100 / Doc)

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

150 mM NaCl

100 mM EDTA-NaOH, pH 7.8

1 % (w/v) TX-100

0.1 % (v/v) Natrium Deoxycholat (NaDoc)

Vor Gebrauch 1 mM PMSF zugeben

Molekulargewichts-Marker

Full Range Rainbow; RPN 800; Molekulargewicht von
10 - 250 kDa (Amersham LIFE SCIENCE)

PBS

150 mM NaCl

80 mM Na₂HPO₄

17 mM NaH₂PO₄

pH 7.4 mit HCl eingestellt

PBS/Milch (PM)

PBS

5 % (w/v) Milchpulver (Reformhaus)

PBS/Milch/Tween 20 (PMT)

PBS

5 % (w/v) Milchpulver

0.1 % (w/v) Tween 20

PBS/BSA/Azid (PBA)

PBS

0.1 % (w/v) BSA

0.04 % (v/v) NaN₃

Polymerisationskatalysatoren

TEMED research grade

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

3 x Probenpuffer

9 % (w/v) SDS

187.5 mM Tris/HCl, pH 6.8

30 % Glyzerin

1 Spatelspitze Bromphenolblau

Proteinaseinhibitor

100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in

Methanol

Proteinbestimmungsreagenz

BCA Protein Assay Reagent (Pierce)

Proliferationsassay

CellTiter 96[®] Two Solutions Cell Proliferation Assay
(Promega)

Reagenz zu Ermittlung
der HRP-Aktivität

ImmunoPureTMB Substrate Kit
Lösung 1: TMB Lösung (TMB, 0.4 g/l)
Lösung 2: Peroxid Lösung (H₂O₂, 0.02 %
in Zitronensäure); gelagert bei 4°C (Pierce)

Sammelgelpuffer

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 0.4 % (w/v) SDS,
bei 4°C gelagert

Transferpuffer für Elektrobplot

150 mM Glyzin
200 mM Tris, pH 8.5
20 % (v/v) Methanol
0.1 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer

1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 0.4 % (w/v) SDS,
bei 4°C gelagert

Trypsin/EDTA/NH₄Cl

0.05 % Trypsin
10 mM EDTA
10 mM NH₄Cl

2.1.2.3 Medien

BME

Basal Medium Eagle mit Earle Salzen ohne Glutamin,
Gibco

DMEM

Dulbecco's Modified Eagles's Medium, Sigma,
München

cDMEM (Medium für Primär-
und Astrozyten-Sekundärkulturen)

DMEM
10 % FCS (v/v)
100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin
(BIOWHITTAKER)
2 mM Glutamin
sterilfiltriert

HBSS⁻
(Calcium- und Magnesiumfrei)

KCl	4.0 g/l
KH ₂ PO ₄	0.6 g/l
NaCl	80.0 g/l
Na ₂ HPO ₄	0.9 g/l
Glukose	10.0 g/l

HBSS⁺

98.5 ml HBSS⁻ mit 1.5 ml 10 % MgSO₄ versetzt

Hefemedium

20 g Peptone
10 g Hefeextrakt
mit H₂O auf 950 ml auffüllen, pH auf 5.8 justieren
Autoklavieren und auf 55°C abkühlen lassen, dann 50 ml
einer 40 % Glukose-Lösung zugeben (steril)

Konditioniertes Medium

(für Mikroglia-Sekundärkultur)

50 % (v/v) cDMEM

50 % (v/v) Überstand von Astrozyten-Sekundärkultur

(nach einer Woche Inkubation)

Medium für Schnittkulturen

25 ml MEM

25 ml H₂O (steril)

25 ml BME

25 ml Pferdeserum

2 mM Glutamin

0.65 % Glucose

pH auf 7.2-7.4 einstellen

MEM

Minimum Essential Medium mit Hank's Salzen,

25 mM HEPES, L-Glutamin, ohne Natriumbicarbonat,

Gibco

Präparationsmedium

für Schnittkulturen

50 ml MEM (2 x)

1 ml Glutamin

49 ml H₂O (Steril)

pH auf 7.35 einstellen

Fetales Kälber Serum

Fetales Kälberserum (FCS), Nr. F7524, Sigma,

München, hitzeinaktiviert (56°C für 30 min)

Pferdeserum

Hitzeinaktiviert, Mycoplasmen frei, Gibco

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper*:

Epitop	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
CD45-PE	Ratte- α -Maus	Pharmingen	1 : 2
F4/80	Ratte- α -Maus	Überstand von Zelllinie (BMA)	Unverdünnt
GFAP	Maus- α -Rind	Pharmingen, Nr. 60341D	1 : 200
GFAP	Kanninchen- α -Rind	Dako, Nr. Z 0334	1 : 200
IgG Isotypkontrolle-PE	Ratte	Cymbus, Nr. CBL 606 R-PE	1 : 10
Mac-1	Ratte- α -Maus	Überstand von Zelllinie M1/70	Unverdünnt
Mannose-Rezeptor	Kanninchen- α -Maus	Eigenherstellung	1 : 400 (IF) 1 : 6000 (WB)
MAP-2	Maus- α -Rind	Sigma, Nr. M4403	1 : 250
MHC-II	Maus- α -Maus	Zelllinie MKD6	Unverdünnt

Tab. 2.1: **Primärantikörper**

*Die angegebenen Antikörper-Konzentrationen beziehen sich auf Immunfluoreszenz-Färbungen (IF), falls nicht anders angegeben. (WB= Western Blot)

Sekundärantikörper:

Gekoppelt an	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
FITC	Ziege- α -Ratte	Jackson (Dianova), Nr. 112-096-008	1 : 100
Biotin	Ziege- α -Kanninchen	Dianova	1 : 500
Cy-2	Ziege- α -Maus (IgG)	Jackson (Dianova), Nr. 115-225-100	1 : 100
Cy-3	Ziege- α -Ratte (IgG)	Jackson (Dianova), Nr. 112-165-102	1 : 100
DTAF	Ziege- α -Maus	Jackson (Dianova), Nr. 115-016-062	1 : 100
HRP	Ziege- α -Kanninchen	Sigma, Nr. A0545	1 : 16000 (WB)
Streptavidin-Red670		LifeTechnologies	1 : 25
Texas-red	Ziege- α -Kanninchen	Jackson (Dianova), Nr. 11-075-003	1 : 100

Tab. 2.2: **Sekundärantikörper**

2.1.4 Allgemeine Geräte

Analyse- und Feinwaagen

Sartorius 3716, handy H110 (Sartorius)

Chemolumineszenz-Film-Entwickler

M35 X-Omat Processor (Kodak)

Elektroblot

Mini-Genie Elektrolotter (Idea Scientific,
Corvallis)

FACS-Scanner

FACSort (Beckton Dickenson)

Heizblock

Ori-Block DB-1 (Techne)

HiTrap Protein A-Säule

Amersham (Pharmacia Biotech Europe)

Hyperfilm

Hyperfilm MP; 18 x 24 cm; Amersham (LIFE
SCIENCE)

Kryostat

Leica

Lesegerät für Mikrotiterplatten (96-Well)

Titertek Multiskan Plus MK II

Magnetrührer

MR 3001 (Heidolph)

Mikroskop

ID 03 (Zeiss, Germany)

Nadel

1 Vasocan, 11.7 mm/16G O.D. x 50 mm

Nitrocellulose

Protran (Nitrocellulose Transfer Membran);
0.45 μm Porengröße (Schleicher + Schuell)

Parafilm

(American National Can.)

PD-10 Säule

Sephadex® G-25 M (Pharmacia Biotech)

Perfusionsbesteck

Intrafix Air-matic, Braun

pH-Meter

Teta pH Meter (Beckman)

Photometer

Pharmacia LKB Ultrospec III (Pharmacia)
Plastikküvetten: 10 x 4 x 45 mm; (Sarstedt No.
67.742)

Stereoskop

Stemi SV 11 (Zeiss, Germany)

Sterilfilter

Steritop (Millipore); 500 ml; 0.22 μm Porengröße

Scanner

Arcus II (AGFA,Germany)

Vibratom

Leica

Zentrifugen

Minizentrifuge DW-41 (Qualitron, Inc.);

Biofuge fresco (Heraeus)

Labofuge 400 R (Heraeus)

Minifuge RF (Heraeus)

Megafuge 1.0 R (Heraeus)

Omnifuge RS2.0 (Heraeus)

2.1.5 Zellkulturmaterialien

CO₂-Inkubatoren

Function line (Heraeus Instruments)

SterilGard II advance (The Baker Company,
Maine)

Deckgläser

Ø 12 mm (Menzel Gläser)

FACS-Röhrchen

5 ml, 12 x 75 mm Rundboden (Falcon)

Filtereinheiten

MILLEX-GV, 0.22 µm (Millipore) Steritop,
Sterilfilter (Millipore)

Kulturflaschen

250 ml (Nunc)

Kulturschalen

90 x 15 mm PS (Sarstedt bacterial grade)

90 x 15 mm PS (Nunc)

60 x 15 mm PS (Sarstedt bacterial grade)

60 x 15 mm PS (Nunc)

Mikrotiterplatten

96 well (Nunc)

24 well (Nunc)

4 well (Nunc)

Millicell CM Biomembran

30 mm Einsätze (Millipore)

Multiwell Gewebekultur-Platten

6-Well, steril verpackt (Falcon)

Neubauer-Zählkammer

Neubauer Improved (0.1 mm / 0.0025mm²)
(HBG Germany)

Objektträger

Mattrand, geschnitten (Menzel Gläser)

Pinzetten

Inox Nr. 5 (neoLab, Heidelberg)

Präparationsbank

SterilGARD (The Baker Company, Maine)

2.2 Methoden

2.2.1 Zell- und Gewebekultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Präparations- und Sterilbänken durchgeführt.

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Inkubationsschritte bei 37°C und 5 % CO₂ in Inkubatoren durchgeführt.

2.2.1.1 Poly-L-Lysin (PLL)-Beschichtung von Zellkulturflaschen oder Deckgläsern :

Um eine bessere Adhäsion der Zellen zu ermöglichen, wurden 250 ml Kulturflaschen (Nunc) bzw. Deckgläser mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet.

Dazu wurde der Boden der Zellkulturflaschen mit 5 ml PLL bedeckt und die Flaschen für 30-60 min inkubiert.

Die Deckgläser wurden in 100 mm Zellkulturschalen zuerst in 100 % Ethanol gewaschen und nach Abnahme des Ethanols mit PLL bedeckt. Danach wurde für 30-60 min inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das PLL abgenommen und die Flaschen bzw. Deckgläser zweimal mit cDMEM gespült, um überschüssiges PLL zu entfernen.

2.2.1.2 Gemischte Astrozyten / Mikroglia-Primärkulturen :

Die durchgeführten Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, mit Mikroglia-Zellen durchgeführt, die aus BALB/c Mäusen isoliert wurden.

Um eine Proliferation der Zellen zu ermöglichen, wurden gemischte Primärkulturen (*in vitro*) angelegt. Diese enthielten alle Zellen des Gehirn-Homogenates und wurde wie folgt angefertigt:

BALB/c Mäuse wurden mit einer Schere dekapiert und die Schädeldecke medial in anterior-posterior Richtung mit einer Pinzette geöffnet.

Die Gehirne wurden mit Hilfe eines Spatels entnommen und in HBSS⁺ überführt.

Unter dem Stereoskop wurden die Hirnhäute und Blutgefäße mit der Pinzette entfernt. Die Gehirne wurden in ein mit 10 ml HBSS⁺ gefülltes 50 ml Falconröhrchen überführt und auf Eis gekühlt.

Bei Raumtemperatur wurden die Gehirne für 3 min mit 3 ml 0.05 % DNase inkubiert und anschließend durch mehrmaliges auf- und absaugen in einer 10 ml Pipette homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 3 ml Trypsin versetzt und für 20 min inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Homogenat für 12 min bei 800 rpm und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in cDMEM resuspendiert (1 ml pro 3 Gehirne).

Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in 9 ml cDMEM in einer PLL-beschichteten Zellkulturflasche aufgenommen und inkubiert. Nach 24 h, 48 h und einer Woche wurde ein Mediumwechsel der gemischten Primärkultur durchgeführt.

Die Herstellung der Sekundärkulturen erfolgte nach Ablauf von zwei Wochen.

2.2.1.3 Sekundärkulturen:

Um die verschiedenen Zelltypen der Primärkultur zu trennen und eine Proliferation der Mikroglia-Zellen zu erreichen, wurden nach Ablauf von zwei Wochen Sekundärkulturen angelegt. Bei dem verwendeten Protokoll macht man sich die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften der Mikroglia-Zellen und der Astrozyten zu nutze. Mikroglia-Zellen können sich auf den Kulturschalen von Sarstedt (bacterial grade) adherieren, während Astrozyten dazu nicht fähig sind. Somit werden in den ersten beiden nachfolgend beschriebenen Inkubationsschritten die Mikroglia-Zellen von den Astrozyten getrennt. Astrozyten adherieren auf den Kulturschalen von Nunc. Da Mikroglia-Zellen hier auch adherieren können, ist der zweite Inkubationsschritt nötig, bei dem die Schalen verworfen werden. Nur so kann eine größtmögliche Reinheit der Astrozyten-Kulturen gewährleistet werden.s

Dazu wurden Oligodendrozyten und abgestorbene Zellen durch kräftiges Schütteln der Zellkulturflaschen und anschließendes Absaugen des Mediums entfernt.

Die Flaschen wurden einmal mit 10 ml cDMEM gespült und mit je 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3 min inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt, es wurden erneut 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen wurden mittels einer Pasteurpipette vom Boden der Kulturflasche gespült und in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml cDMEM und 0.5 ml 0.05 % DNase überführt. Die Flasche wurde nochmals mit 5 ml cDMEM gespült und die Flüssigkeit in das 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend bei 1000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 6 ml cDMEM resuspendiert.

Je 1 ml der Lösung wurde in 2 ml cDMEM in einer 10 cm Petrischale (Sarstedt bacterial grade) aufgenommen. Die Schalen wurden für 20 min inkubiert. Aufgrund ihrer Adhäsionseigenschaften können sich dabei nur die Mikrogliazellen festsetzen.

Die Astrozyten wurden durch Abnahme des Mediums entfernt. Der Überstand von je 6 Schalen wurde in einer Schale gesammelt und für 90 min inkubiert. Dadurch sollte erreicht werden, dass eventuell noch vorhandene Mikroglia sich absetzen. Die „gereinigten“ Astrozyten wurden zu gleichen Teilen auf 4 Zellkulturschalen (Nunc) mit jeweils 5 ml cDMEM verteilt.

Zu den Mikroglia wurden 6 ml konditioniertes Medium zugegeben, das von den Astrozyten gebildete Wachstumsfaktoren enthielt. Diese nicht näher definierten Wachstumsfaktoren ermöglichten eine verstärkte Proliferation der Mikroglia-Zellen.

Nach einer Woche wurde ein Mediumwechsel mit konditioniertem Medium und nach zwei Wochen ein erneuter Mediumwechsel mit cDMEM durchgeführt.

Dem cDMEM waren keine Wachstumsfaktoren mehr zugesetzt, wodurch die Mikroglia-Zellen in einen nicht-aktivierten Zustand („resting state“) überführt wurden.

Die sekundären Mikroglia-Zellkulturen standen somit nach drei Wochen zur Verfügung.

2.2.1.4 Umsetzen der Mikrogliazellen (Trypsinierung):

Das Medium wurde vollständig abgesaugt und es wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden 3 ml cDMEM zugegeben, um das Trypsin zu verdünnen und somit zu „inaktivieren“.

Die Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit einer Pipette abgelöst und in ein 15 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Pro Röhrchen wurde das Medium von 2 Schalen überführt und es wurden 5 ml cDMEM zugegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 12 min bei 800 rpm und 4°C pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml cDMEM aufgenommen.

Um die Zellen in einer definierten Dichte ausplattieren zu können, wurden die gesamten gewonnenen Zellsuspensionen zusammengeführt. Von der Zellsuspension wurden 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypan-Blau-Lösung versetzt. Mittels einer Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Die Zellen wurden bis zur gewünschten Dichte verdünnt und dann ausplattiert.

Im Falle der 96 well Zellkulturplatten wurden die Zellen für 1 h in 50 µl cDMEM inkubiert. Danach wurden weitere 50 µl cDMEM zugegeben. Dadurch konnte verhindert werden, dass sich die Zellen auch an den Seitenwänden des Napfes (wells) festsetzten und sich später ablösten. In allen anderen Fällen konnten die Zellen direkt im gewünschten Endvolumen ausplattiert werden.

2.2.1.5 Gewebekultur von Schnitten aus Mäusehirn

Um ein System nutzen zu können, das näher an der *in vivo* Situation liegt als die verwendeten *in vitro* Kulturen, wurden Gewebeschnitte aus Gehirnen von P4-8 BALB/c Mäusen angefertigt und in Kultur genommen.

Dazu wurden die Mäuse dekapiert und die Gehirne entnommen. Die Gehirne wurden mit Hilfe eines Acrylat-Klebers auf dem Objekteller eines Vibratoms fixiert und in Präparationspuffer überführt. Mittels des Vibratoms wurden Schnitte einer Dicke von 400 µm angefertigt. Diese wurden auf die Millicell CM Filter in 6-Well Platten transferiert. Die Wells enthielten je 1.2 ml Kulturmedium mit pH 7.2. Das Medium wurde nach einstellen des pH-Wertes nach jeweils 2 Tagen gewechselt.

2.2.1.6 Kultur von *Candida albicans* und Gewinnung der Candida-Stocks

Candida albicans wurden aus einem gefrorenen Stock mit einer gelben Spitze abgekratzt und damit wurden 200 ml Hefemedium angeimpft. Das Medium wurde auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Trübung zu beobachten war. Die Hefe wurde dann autoklaviert und anschließend 2 x mit PBS gewaschen. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und durch Verdünnung mit PBS auf 1×10^7 eingestellt. Die Hefe wurde in 500 µl Stocks bei -20°C gelagert.

Bei Bedarf wurde die Hefe aufgetaut, mittels mehrfachen pipettierens mit einer 200 ml Pipette oder in einem Ultraschallbad dissoziiert. 100 µl der Hefesuspension wurde dann in 10 ml DMEM gegeben und in den Experimenten eingesetzt. Dieser Vorgang wurde vor jedem Experiment wiederholt.

2.2.1.7 Gewinnung von aktivierten Makrophagen

Es wurde eine 3 %ige Lösung aus Brewer's Thioglycollated Broth hergestellt, die durch autoklavieren sterilisiert wurde.

Von dieser Lösung wurde je 1 ml in das Peritoneum von Mäusen injiziert.

Nach 4-5 Tagen wurden die Mäuse getötet und vorsichtig das Fell auf der Bauchseite entfernt.

Mittels einer Spritze wurden 10-20 ml 10 % FCS/DMEM in den Bauchraum injiziert. Es wurde besonders darauf geachtet, dass die Eingeweide durch die Nadel nicht verletzt wurden.

Die Flüssigkeit wurde durch manuelle Manipulation im Bauchraum bewegt und schließlich mittels der Spritze wieder entnommen.

Die Lösung enthält zum Großteil aktivierte Makrophagen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, resuspendiert und dann wurde die Zellzahl ermittelt.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Zell-Lysaten:

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

Das Medium wurde entfernt, die Zellen wurden 2 x mit eiskaltem DMEM, danach 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen.

Das PBS wurde vollständig abgesaugt und es wurden 200 µl (10 cm Zellkulturschalen) bzw. 50 µl (24/4 well Platten) bzw. 20 µl (96 well platten) Lysepuffer zugegeben.

Die Zellen wurden durch mehrfaches Spülen mit einer 200 µl Pipettenspitze abgelöst und das Lysat wurde in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden für 20 min auf Eis inkubiert, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten.

Danach wurden die Lysate für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge Fresco). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei -28°C weggefroren.

Im Falle der 96 well Platten wurden die Platten nach 20 minütiger Inkubation auf Eis direkt weg gefroren.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay):

Prinzip des BCA-Assays:

Die Protein-Konzentration einer Probe kann mit diesem Assay bestimmt werden, da Proteine in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduzieren (Biuret-Reaktion). Das BCA-Reagenz (Bicinchoninic Acid) bildet mit Cu^{1+} einen lilafarbenen Komplex, in dem zwei Moleküle BCA ein Cu^{1+} -Kation komplexieren. Verantwortlich für die Farbreaktion des BCA sind die makromolekulare Struktur des Proteins, die Anzahl der Peptidbindungen und die vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin.

Der so gebildete Komplex weist bei Licht einer Wellenlänge von 562 nm eine meßbare Absorption auf. Die Absorption ist in einem Bereich von 20 µg/ml bis 2000 µg/ml Protein linear.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Zell-Lysate, wurden 5 µl mit 45 µl H_2O gemischt, mit 1 ml des BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Gemisch in Plastikküvetten überführt und die Absorption mit einem Photometer bei 562 nm gemessen. Als Referenz diente die Absorption von 5 µl Lysepuffer in 45 µl H_2O .

Durch Aufstellen einer Eichgerade (ermittelt mit BSA-Standards) konnte die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt werden.

2.2.2.3 Bestimmung der spezifischen HRP-Aktivität (TMB-Assay):

Prinzip:

Bei der Meerrettichperoxidase (HRP) handelt es sich um eine Peroxidase. Diese Enzymklasse oxidiert verschiedene Substrate und spielt biologisch vor allem in Peroxisomen und Lysosomen eine Rolle. Hier nutzt man die durch HRP verursachte Oxidation dazu das Substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine = TMB) zu oxidieren, das dann seine Absorption bei 450 nm ändert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 2 M H_2SO_4 gestoppt.

Die Menge an oxidiertem Substrat ist somit der Enzymaktivität und Enzymkonzentration proportional. Durch Messung der Absorption bei 450 nm kann unter Bezug auf eine Kontrolle die HRP-Aktivität bestimmt werden.

Protokoll:

Um die HRP-Aktivität zu ermitteln, wurden in Mikrotiterplatten je 10 μl H_2O und 2 μl des Lysates pipettiert (Doppelbestimmung). Als Referenz dienten 2 μl Lysepuffer in 10 μl H_2O . Zu dem Gemisch wurden je 100 μl TMB gegeben.

Zu dem Zeitpunkt da in allen Vertiefungen eine bläuliche Verfärbung des Gemisches zu beobachten war, bzw. bevor in einer der Vertiefungen ein grünlicher Farbton erreicht wurde, wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl 2M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Die maximale Inkubationszeit betrug 20 min, wodurch sichergestellt war, dass die Reaktion noch im linearen Bereich lag.

Die spezifische HRP-Aktivität wurde pro μg Protein angegeben.

2.2.2.4 Western-Blot Analyse

2.2.2.4a Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Prinzip:

Um die in den Lysaten vorhandenen Proteine aufgrund ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteingemische getrennt und die relativen Molekularmassen bestimmt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das stark an Proteine bindet und sie gleichzeitig denaturiert. Im Überschuß an SDS binden etwa 1.4 g Detergens pro g Protein, so dass alle Proteine eine beständige negative Ladung pro Masseneinheit tragen; deshalb wandern während der Elektrophorese alle Protein-SDS-Komplexe zur Anode. Infolge der Molekularsiebeigenschaften des Gels sind die Beweglichkeiten dem \log_{10} der relativen Molekularmasse (M_r) umgekehrt proportional. Die relative Molekularmasse der zu untersuchenden Proteine kann dann durch Vergleich mit Wanderungsgeschwindigkeiten von Proteinen mit bekannter Größe bestimmt werden (Laemmli, 1970).

Die Auflösung der einzelnen Proteinbanden wird erhöht, wenn man über das Trenngel ein Sammelgel legt; Unterschiede im pH-Wert und der Konzentration beider Gele führen dazu, daß die Proteine in engen Banden konzentriert werden, bevor die weitere Trennung im Hauptgel (Trenngel) erfolgt.

Protokoll:

Trenngel 6 % (für 4 Minigele):

7.5 ml Trenngelpuffer

6 ml Acrylamid

16.5 ml H₂O

100 µl TEMED

100 µl APS

Sammelgel:

7.5 ml Sammelgelpuffer

5 ml Acrylamid

17.5 ml H₂O

75 µl TEMED

75 µl APS

Die verwendeten Gele wurden jeweils mittels Mini-PROTEAN II-Elektrophoresezellen hergestellt.

Es wurden 6 %-ige Trenngele gegossen, über die 5 %-ige Sammelgele gelegt wurden.

Die Lysate wurden mit 1/2-Volumen 3x Probenpuffer versetzt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Gel-Lauf wurde bei 60 - 100 mV durchgeführt, wobei eine Stromstärke von 50 mA nicht überschritten wurde.

Als Größenmarker wurde der Full Range Rainbow Marker von Amersham verwendet.

2.2.2.4b Proteintransfer durch Western-Blot:

Prinzip:

Nach der gel-elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, wurden die Proteine durch das Western-Blot-Verfahren auf Nitrocellulose übertragen.

Hierbei werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine polymere Membran übertragen. Das so erhaltene Bandenmuster spiegelt die Verteilung der Proteine im Original-Gel exakt wider (Burnette, 1981). Die erhaltenen Membranen können nun direkt immunologischen Analyseverfahren unterworfen werden oder sie können getrocknet und über längere Zeiträume hinweg gelagert werden.

Die verwendeten Nitrocellulose-Membranen zeichnen sich durch eine hohe Bindungskapazität, niedrigen unspezifischen Hintergrund und hohe mechanische Stabilität aus.

Protokoll:

Eine Transferkammer wurde mit drei Schwammtüchern ausgelegt, auf die zwei 3MM Whatman-Papier gelegt wurden. Darauf wurde das Gel gelegt, dann die Nitrocellulose,

gefolgt von zwei weiteren Whatman-Papieren, auf die drei weitere Schwammtücher gelegt wurden. Es wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen zwischen Gel, Nitrocellulose und Whatman-Papier befanden, ebenso wurden alle Materialien mit Transferpuffer feucht gehalten.

Der Transfer wurde bei einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von 0.5 - 0.6 A für 90 min durchgeführt.

Die Nitrocellulose wurde danach in PBS überführt und die Proteine durch eine Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht.

2.2.2.4c Proteinnachweis durch Ponceau S-Färbung:

Um den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose überprüfen zu können, wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt.

Dazu wurde die Nitrocellulose 5 min in Ponceau S inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden.

Zur Verwendung für Immundetektionen, wurde die Membran durch Waschen mit PBS entfärbt.

2.2.2.4d Immundetektion :

Prinzip:

Durch die Immundetektion ist es möglich das Vorhandensein eines bestimmten Proteins qualitativ und quantitativ zu erfassen. Dazu bedient man sich Antikörpern, die spezifisch an Epitope des gewünschten Proteins binden. Durch Einsatz von primären oder sekundären Antikörpern, die an Enzyme gekoppelt sind, ist es möglich, über das Fortschreiten der katalysierten Reaktion Aussagen über die Menge gebundener Antikörper und somit auch der Epitope Aussagen zu treffen.

Die verstärkte Chemilumineszenz-Immundetektion (ECL) ist eine Licht-emittierende nicht-radioaktive Methode zur Detektion immobilisierter spezifischer Antigene, welche indirekt oder direkt mit einem HRP-konjugierten Antikörper markiert sind. Das Prinzip der Chemolumineszenz beruht auf der Anregung von Elektronen bestimmter Moleküle durch eine enzymatische Reaktion. Kehren die Elektronen nun in ihren Grundzustand zurück, so geben sie Energie ab, die im Bereich des sichtbaren Spektrums liegt. Hier wird HRP-Wasserstoffperoxid-katalysierte Oxidation von Luminol (im basischen Milieu) genutzt. Die

Lichtemission liegt bei 428 nm, wodurch eine Schwärzung eines photographischen Films erfolgt.

Protokoll:

Die Nitrocellulose wurde entweder für 2 x 30 min bei Raumtemperatur in PBS/Milch (PM), oder über Nacht bei 4°C in PM blockiert.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS/Milch/Tween 20 (PMT), entweder bei 4°C über Nacht oder für 2 h bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation wurde 5 x 5 min mit PMT gewaschen.

Anschließend wurden die Membranen mit einem an HRP gekoppelten sekundären Antikörper in PMT für 1 h inkubiert.

Danach wurde je 2 x 5 min in PMT, anschließend in PM gewaschen, gefolgt von mehreren kurzen Waschschritten in PBS.

Die Membran wurde für 1 min in der ECL-Lösung inkubiert, zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und dann in einer Filmkassette für verschiedene Zeiträume exponiert.

Zur Detektion des Mannose-Rezeptors wurde als Primärantikörper Kaninchen- α -Mannose-Rezeptor (1:6000) und als Sekundärantikörper ein Ziege- $\tilde{\alpha}$ -Kaninchen-HRP-Antikörper (1:16000) verwendet.

Die erhaltenen Aufnahmen wurden digital gescannt, im Computer mit Hilfe der NIH Image-Software quantifiziert und die so erhaltenen Werte in Excel weiter verarbeitet.

2.2.2.5 Affinitäts-Aufreinigung von IgG Antikörpern

Die Aufreinigung der IgG-Antikörper wurde mittels einer HiTrap Protein-A Säule durchgeführt.

Prinzip:

Die Säule besteht aus Polypropylen, das inert gegenüber biologischen Materialien ist. Gefüllt ist die Säule mit einer Matrix aus Agarose-Kügelchen, an die Protein A gekoppelt ist. Das Protein A wurde aus *Staphylococcus* gewonnen und besitzt ein Molekulargewicht von 42 kDa. Es besteht aus sechs verschiedenen Domänen, von denen fünf sehr hohe Affinität für den Fc-Teil von IgG-Molekülen besitzen. Pro Molekül Protein-A können mindestens zwei IgG-Moleküle gebunden werden. Diese Bindung ist pH-Wert sensitiv, wodurch die gebundenen IgG-Moleküle gezielt gelöst werden können, nachdem die anderen

ungebundenen Proteine ausgewaschen wurden. Somit ist eine Aufreinigung von IgG leicht zu erreichen.

Vor Durchführung der Aufreinigung waren anzusetzen:

Start-Puffer: 20mM Na₂HPO₄, pH 7.0

Elutions-Puffer: 0.1M Zitronensäure, pH 3.6

Eppendorf Reaktionsgefäße mit 60-100 µl: 1 M Tris-HCl, pH 9.0

Der pH-Wert des Proteingemisches wurde bestimmt und falls nötig auf pH 7.0 eingestellt. Das Oberteil der Säule wurde abgeschraubt und einige Tropfe Start-Puffer wurden auf die Säule pipettiert, um zu verhindern, dass sich Luftblasen bilden. Dann wurde der untere Teil der Säule geöffnet.

Der Schlauch einer Pumpe wurde angeschlossen und die Säule wurde mit 6 ml Start-Puffer gespült, um das Ethanol auszuwaschen. Dann wurde die Probe mittels der Pumpe vollständig auf die Säule geladen. Die Säule wurde mit 5 ml Start-Puffer gewaschen, um das ungebundene Protein zu entfernen. Der Durchfluß wurde gesammelt.

Dann wurde das IgG durch Waschen mit 3 ml Elutions-Puffer von der Matrix gelöst. Das Eluat wurde in 500 µl Portionen in Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgenommen. Diese Reaktionsgefäße enthielten Tris-HCl, pH 9.0, um zu verhindern, dass die IgG-Moleküle bei dem niedrigen pH des Elutions-Puffers degradiert wurden.

Die Säule wurde mit 10 ml Startpuffer gewaschen und dann mit 0.03 % Azid/PBS geladen und bei 4°C gelagert.

Das Eluat wurde durch chromatographische Filtration mittels einer PD-10 Säule gereinigt, um das noch vorhandene Natrium zu entfernen. Dazu wurde die Säule mit 25 ml PBS gewaschen. Die Proteinlösung wurde in einem Volumen von 2.5 ml auf die Säule geladen, die dann mit 3.5 ml PBS gewaschen und in 0.5 ml Portionen gesammelt wurden.

Die optische Dichte (OD) der verschiedenen Proben wurde mittels eines Photospektrometers bei 280 nm bestimmt. Aus der OD lässt sich nach folgender Formel die IgG-Konzentration berechnen:

$$\text{IgG (mg/ml)} = \frac{\text{OD} \times \text{Verdünnung}}{1.4}$$

Die Proben mit der höchsten IgG-Konzentration wurden vereinigt und in kleinen Aliquots weggefroren.

2.2.2.6 Ermittlung der Proliferation von Mikrogliazellen nach Zytokin-Stimulation

Prinzip:

Um die Proliferation von Zellen zu ermitteln, gibt es verschiedene Methoden. In dieser Arbeit wurde das CellTiter 96® AQ-System von Promega verwendet.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf dem Umsatz einer Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS) in ein wasserlösliches Formazan. Diese Umsetzung wird von zellulären Dehydrogenasen vermittelt. Formazan kann durch Absorption bei 490 nm nachgewiesen werden. Die Konzentration des Formazan ist dabei direkt der Menge an Dehydrogenasen und somit der Zellzahl proportional. Ein Vergleich mit radioaktiven Methoden zeigte die gleiche Genauigkeit dieses „bequemerer“ Assays.

Protokoll:

In 96-Well Platten wurden je 2×10^4 Mikroglia-Zellen ausplattiert und für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 x mit DMEM gewaschen, um eventuell vorhandene Debris zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit 100 µl DMEM/FCS und Zytokin in entsprechender Verdünnung versetzt. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, denen kein Zytokin zugesetzt wurde. Die Zellen wurden dann für 1–3 Tage inkubiert.

Vor Durchführung des Assays wurden je 2 ml MTS mit 100 µl PMS versetzt. Diese Mischung stellt die aktive Form dar.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit 20 µl MTS/PMS-Reagenz pro Well versetzt. Danach erfolgte die Inkubation für verschiedene Zeiträume. Die Absorption wurde bei 492 nm gemessen, wobei eine Inkubationszeit von 4 h nicht überschritten wurde. Dadurch ist gewährleistet, dass sich die Reaktion noch im linearen Bereich befindet.

Die Messung der Absorption erfolgte in 10 Wells pro Zytokin-Konzentration. Die Auswertung erfolgte am Computer unter Verwendung von MS Excel. Die so erhaltenen Absorptionen wurden gemittelt und in Relation zur Absorption der Kontrolle gesetzt. Die Daten wurden in einem Graphen ausgegeben.

2.2.2.7 Gewinnung der Zellkultur-Überstände für den ELISA-Assay:

Es sollte analysiert werden, wie Mikroglia-Zellen auf den Kontakt mit *Candida albicans* reagieren (in Bezug auf die Ausschüttung von Zytokinen). Um zu sehen, ob auch ein löslicher Ligand des Mannose-Rezeptors die Ausschüttung von Zytokinen bewirken kann, wurden einige Zellen mit *C. albicans* und einige mit Mannan inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die gleich behandelt wurden, denen allerdings nur Medium zugesetzt wurde. Alle Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Die Mikroglia-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 für 24 h auf mit PLL beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Danach wurden die Zellen für 45 min mit *Candida albicans*, 10 mg/ml Mannan oder reinem Medium inkubiert.

Die Deckgläser wurden dann zweimal in mit DMEM gefüllten Bechergläsern gewaschen, um die Hefe vollständig zu entfernen. Alle Deckgläser wurden dabei der gleichen Behandlung unterzogen, um eventuelle Folgen dieser Behandlung in allen Ansätzen zu sehen.

Danach wurden die Zellen in je 400 μ l DMEM in 24-Well Platten überführt. Der Überstand wurde nach 24 h, 48 h und 72 h mittels einer 1 ml Gilson-Pipette abgenommen. Der Überstand von je 4 Wells wurde zusammengefasst und durch einen 0.22 μ m Filter gefiltert.

Die Überstände wurden bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.8 ELISA-Assay

Mittels eines ELISA-Assays kann spezifisch das Vorhandensein bestimmter Moleküle in Lösungen nachgewiesen werden. Dies beruht auf der Interaktion von Antikörpern mit ihrem Epitop. Der Boden einer 96-Well Platte wird dabei mit dem „Capture“-Antikörper beschichtet. Dann wird die Lösung mit dem nachzuweisenden Molekül zugegeben. Dieses bindet an den „Capture“-Antikörper. Danach wird ein anderer Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop auf dem nachzuweisenden Molekül erkennt. Dieser „Detection“-Antikörper ist biotinyliert und kann somit durch ein Avidin-HRP Konjugat gebunden werden. Das Enzym HRP setzt in einer enzymatischen Reaktion ein Substrat (TMB) um. Das entstandene Produkt kann durch seine Absorption bei 450 nm nachgewiesen werden. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Menge des Epitops und somit des nachzuweisenden Moleküls. Durch Anfertigung einer Verdünnungsreihe kann somit die Menge des nachzuweisenden Moleküls bestimmt werden.

Anzusetzende Puffer:

- Beschichtungspuffer: 0.1 M Carbonat-Lösung, pH 9.5
- Assay Diluent: PBS + 10 % FCS
- Waschpuffer: PBS + 0.05 % Tween-20

Je 100 µl des "Capture"-Antikörpers in Beschichtungspuffer wurden in die Wells inkubiert und die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Wells wurden am nächsten Tag 5 x mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit Diluent Puffer für 1h bei RT blockiert.

Je 100 µl der Standards, Kontrollen und experimentellen Ansätze wurden in die Wells pipettiert und dann für 2 h bei RT inkubiert.

Danach erfolgten wieder 5 Waschschritte mit Waschpuffer.

Der „Detection“-Antikörper und das biotinylierte HRP wurden in den vom Hersteller angegebenen Verdünnungen gemischt, je 100 µl wurden in die Wells pipettiert und dann erfolgte die Inkubation bei RT für 1h.

Ungebundene Antikörper und Enzyme wurden in 10 Waschschritten mit Waschpuffer entfernt.

Je 100 µl des TMB-Assays wurden zugegeben, es wurde für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und dann wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm gelesen.

2.2.2.9 Etablierung der Zelldichte für die Durchführung des HRP-Assays in 96-well Platten

Mikroglia-Zellen wurden trypsiniert und in verschiedenen Dichten in 96-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Dann wurden die Zellen 2 x in DMEM und 2 x in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 20 µl Lysepuffer für 20 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Wells wurde mittels des BCA-Assays bestimmt und auf dem PC unter Verwendung von Microsoft Excel analysiert

2.2.2.10 Protokoll zur Ermittlung der durch den Mannose-Rezeptor bedingten HRP-Aufnahme in Mikrogliazellen (HRP-Assay)

Um die Inhibierbarkeit der HRP-Aufnahme über den Mannose-Rezeptor zu dokumentieren, wurde Mannan benutzt. Bei Mannan handelt es sich um ein Mannose-Polymer, das aus Hefe gewonnen wird. Es bindet mit hoher Affinität an den Mannose-Rezeptor und kompetitiert somit mit HRP um die Bindstellen des Rezeptors. Liegt es in hohem Überschuß vor, so kommt es zu einer Inhibition der HRP-Aufnahme über den Rezeptor.

Wurden die Experimente in 24-Well bzw. 96-Well Platten durchgeführt, so wurden die Zellen abtrypsiniert und 1×10^5 bzw. 2×10^4 Zellen für 24 h inkubiert, um eine ausreichende Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. In den 10 cm Schalen wurden die Zellen direkt benutzt.

Die Zellen wurden mit Zytokin in entsprechender Konzentration stimuliert und für 24 h-72 h inkubiert.

Eventuell vorhandene Debris und abgestorbene Zellen wurden dann durch zweimaliges Waschen mit DMEM entfernt.

Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit 0.1 mg/ml HRP bzw. 0.1 mg/ml HRP und 10 mg/ml Mannan für 10 min.

Alle Arbeiten wurden, falls nicht anders angegeben, bei 4°C und mit eiskalten Lösungen durchgeführt.

Um nach der Inkubation eine weitere Aufnahme von HRP zu verhindern, wurden die Zellen bei 4°C 5 x mit 0.5 % BSA/DMEM gewaschen, wodurch gleichzeitig das unspezifisch gebundene HRP ausgewaschen wurde.

Um eventuell gebundenes BSA auszuwaschen, wurde 2 x mit DMEM und 2 x mit PBS gewaschen.

Nun konnten die Zell-Lysate angefertigt werden.

Je nach verwendeten Kulturbedingungen wurden andere Volumina für die Inkubation, die Waschschrte und die Lyse der Zellen verwendet.

	10 cm Schalen	24-/4-Well Platten	96-Well Platten
Volumen für Inkubation + Waschschrte	5 ml	400 µl	100 µl
Volumen für Lyse	200 µl	50 µl	50 µl

Tab. 2.3: Volumina für HRP-Assay

2.2.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet, die bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer definierten Wellenlänge abstrahlen und so im Mikroskop sichtbar und voneinander unterscheidbar sind.

Je nach eingesetztem Antikörper kann so entweder direkt (Primärantikörper an Farbstoff gekoppelt) oder indirekt (Sekundär- oder Tertiärantikörper an Farbstoff gekoppelt) ein Epitop und somit ein bestimmtes Protein sichtbar gemacht werden. Somit ist eine Lokalisation des Moleküls auf mikroskopischer Ebene möglich.

2.2.3.1 Fixierung und Färbung von isolierten Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Zellen wurden auf mit PLL beschichteten Deckgläschen ausplattiert und für 24 h bei 37°C inkubiert.

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte wurden auf Parafilm, bei Raumtemperatur durchgeführt:

Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten in die jeweilig nächste Lösung überführt. Die alte Lösung wurde dann vom Parafilm durch Absaugen und Abwischen entfernt.

Die Zellen wurden 2x in PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Für 10 min wurde mit 50 mM NH₄Cl gequench.

Im Falle einer intrazellulären Färbung wurden die Zellen für 15 min mit 0.1 % TX-100 permeabilisiert, dieser Schritt wurde bei einer Oberflächenfärbung übergangen.

Unspezifische Bindestellen wurden durch 30 min Inkubation in 10 % FCS/DMEM abgeblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern für 1 h.

Überschüssige Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen für je 2 min in 10 % FCS/DMEM entfernt.

Der Sekundärantikörper wurde für 30 min in 10 % FCS/DMEM inkubiert.

Danach erfolgten mehrere kurze Waschschrte in 10 % FCS/DMEM, DMEM und PBS. Vor dem Eindeckeln wurden die Deckgläser kurz in Wasser getaucht um das Salz zu entfernen.

Die in Mowiol eingedeckelten Deckgläser wurden bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.3.2 Fixierung und Färbung von Schnittkulturen

Das Blocken und die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in Blockpuffer.

Blockpuffer: 5 % FCS

1 % BSA

0.2 % Triton-X 100

PBS

Die Schnittkulturen wurden für 1-2 h in 4 % Paraformaldehyd und 4 % Sucrose in PBS fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte durch 3 x 15 min Inkubation in 0.5 % Tween-20/PBS. Es folgten 4 Waschschrte zu je 10 min in PBS. Die Schnitte wurden 3 x 15 min in 50 mM NH₄Cl gequench und anschließend für 3 x 10 min in PBS gewaschen.

Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation im Blockpuffer bei 4°C über Nacht geblockt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte ebenfalls bei 4°C über Nacht.

Ungebundener Antikörper wurde durch 4 Waschschrte zu je 30 min in PBS entfernt. Dann wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert.

Ungebundener Antikörper wurde wiederum durch 4 x 30 min Waschschrte in PBS entfernt. Vor dem Eindeckeln in Mowiol wurden die Schnitte kurz in Wasser gespült.

Die Präparate wurden bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.3.3 Perfusion von Mäusen

In ein Becherglas wurde Trockeneis gegeben und mit mehreren Lagen Zellstofftüchern bedeckt. Dann wurde Wasser zugegeben, wodurch das CO₂ in die Gasphase übergang. Die Maus wurde in das Becherglas gesetzt und das Glas wurde mit einem Deckel verschlossen. Die Maus wurde nach Ablauf einer Minute entnommen und auf einer Styroporunterlage mit Nadeln auf dem Rücken liegend fixiert. Durch Besprühen mit 70 % Ethanol wurde das Tier gesäubert. Der Bauchraum und der Brustkorb wurden vorsichtig mit Hilfe einer Schere geöffnet, um Verletzung der inneren Organe zu vermeiden. Die Rippen wurden seitlich weggebogen, wodurch das Herz leicht zugänglich wurde. In den linken Ventrikel wurde eine Nadel eingeführt, die über einen Schlauch mit einer Tropfflasche verbunden war, die 200 ml 2 % Paraformaldehyd/PBS enthielt. Die Vena cava wurde durchtrennt und der Fluß des Fixanzes wurde gestartet. Durch 150-200 ml Fixanz wurde das Blut ausgewaschen und das

Gewebe gleichzeitig fixiert. Die Effektivität der Perfusion konnte durch das Ausbleichen der Organe und die Fixierung des Tieres überprüft werden.

2.2.3.4 Anfertigen von Kryoschnitten aus Mäusehirn

Nach der Perfusion des Tieres, wurde der Schädel abgetrennt. Das Fell wurde vom Schädel entfernt und die Schädeldecke wurde mittels einer Schere geöffnet. Hierzu wurden zwei laterale Schnitte von posterior nach anterior gesetzt. Nun konnte die Schädeldecke durch Anheben vom restlichen Schädel gelöst und das Gehirn ohne Beschädigung entnommen werden.

Das Gehirn wurde über Nacht bei 4°C in 2 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Am nächsten Morgen wurde das Gehirn in 30 % Sucrose/PBS überführt und bei 4°C gehalten, bis das Hirn auf den Boden abgesunken war. Dadurch wurde das Gewebe entwässert und konnte ohne Schädigung eingefroren werden. Das Hirn wurde nun in der gewünschten Orientierung in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebettet und bei -20°C weggefroren.

Mittels eines Kryostaten wurde der Block getrimmt und dann 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Superfrost Plus Deckgläsern aufgenommen und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

2.2.3.5 Färbung von Hirnschnitten

Die Kryoschnitte wurden mit einem Pap-Pen umrandet, wodurch alle nachfolgenden Schritte direkt auf dem Objektträger durchgeführt werden konnten.

Das Blocken und die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in Blockpuffer.

Blockpuffer: 5 % FCS
1 % BSA
0.2 % Triton-X 100
PBS

Die Schnitte wurden für 15 min in 0.5 % Tween-20/PBS permeabilisiert.

Es folgten drei Waschschrte für je 5 min in PBS. Die fixierten Schnitte wurden für 15 min mit 50 mM NH₄Cl gequenchet. Es erfolgten 3 Waschschrte in PBS für je 5 min.

Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht.

Ungebundene Antikörper wurden durch 3 x 10 min Waschschrte in PBS entfernt.

Mit den Sekundärantikörpern wurde für 1h bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch 3 x 5 min Waschschrte in PBS entfernt. Die Schnitte wurden kurz in H₂O gespült und anschließend in Mowiol eingedeckelt.

Die Präparate wurden bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.4 FACS-Analyse von Mikroglia-Zellen

Prinzip:

Bei der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) werden Zellen einzeln in einem Hüllstrom an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Heute wird als Lichtquelle meist ein Laser mit definierter Wellenlänge genutzt. Die Zellen lenken die Photonen ab und diese werden dann von Kollektoren aufgefangen und mittels eines Computers analysiert. Dadurch können Aussagen über die Größe und Form der Zelle getroffen werden. Durch die Gabe von Fluorochromen oder von an Fluorochrome gekoppelte Antikörper können bestimmte Moleküle oder Teile einer Zelle markiert werden. Die Fluorochrome werden vom Laser angeregt und emittieren dann Licht einer anderen Wellenlänge, das wiederum von den Kollektoren aufgefangen werden kann. Diese Daten können mittels eines Computers ausgewertet werden. So können verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden, Moleküle auf Zellen nachgewiesen werden etc.

In allen nachfolgenden FACS-Protokollen wurden die Waschschrte nach dem Ablösen der Zellen wie folgt durchgeführt:

Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 6 min bei 1300 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde so weit als möglich abgesaugt und die Zellen wurden mit Hilfe eines Vortex wieder in Suspension gebracht. Danach wurden die Zellen wieder in entsprechendem Puffer aufgenommen.

Für die Analysen wurde die mittlere Fluoreszenz der verschiedenen Ansätze ermittelt. Durch Subtraktion der mittleren Fluoreszenz der Negativkontrollen (ohne Zugabe von Ligand) konnte die Autofluoreszenz der Zellen subtrahiert werden und nur das spezifische Signal wurde berücksichtigt.

2.2.4.1 Ermittlung der Oberflächenexpression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen mittels FACS-Analyse

Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 1.5 mM EDTA/PBS Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels einer Pasteurpipette wurden die Zellen durch mehrfaches Spülen abgelöst und in Sarstedt-Röhrchen überführt.

Die Sarstedt-Röhrchen wurden mit cDMEM aufgefüllt und dann für 6 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in cDMEM resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden je 50.000 Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt und mit PBA versetzt.

Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und danach der Überstand verworfen. Die Zellen wurden resuspendiert und mit 25 µl PBA mit 40 % (v/v) Mäuse-Serum und 40 % (v/v) Ratten- bzw. Ziegen-Serum versetzt, erneut geschüttelt und für 20 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurden die Fc-Rezeptoren blockiert, wodurch die unspezifische Bindung der eingesetzten spezifischen Antikörper verhindert werden kann.

Nach erneutem Mischen wurden 25 µl des entsprechenden Primär-Antikörpers zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zwei Waschschriffe mit je 3.5 ml PBA entfernt.

Nachdem die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen geschüttelt und mit 50 µl des Ziege- α -Kanninchen-Biotin Sekundär-Antikörpers versetzt. Die Inkubation erfolgte für 20 min auf Eis. Danach wurden die Röhrchen mit je 3.5 ml PBA aufgefüllt und der Antikörper durch Zentrifugation und anschließendes Verwerfen des Überstandes ausgewaschen. Dann folgte die Inkubation mit 50 µl Streptavidin-Red für 15 min. Der ungebundene Farbstoff wurde durch mehrfache Waschschriffe in PBA entfernt.

Die Zellen wurden in 100 µl 1 % Paraformaldehyd/PBS aufgenommen und bis zum nächsten Tag bei 4°C dunkel gelagert.

Zur FACS-Analyse wurden die Zellen geschüttelt, die Röhrchen wurden mit 3.5 ml PBS aufgefüllt, zentrifugiert und dann in 150 µl PBA resuspendiert.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde durch die Färbung mit Isotypkontrollen bzw. Sekundär-Antikörpern ermittelt.

Primär-Antikörper:

Kaninchen IgG Isotyp-Kontrolle (Präimmun-Serum)

Kaninchen IgG Isotyp-Kontrolle (Chrompure)

α -Mannose-Rezeptor

Ratte- α -Maus CD45-PE

Ratte Isotyp-PE-Kontrolle

Sekundär-Antikörper:

Ziege- α -Kanninchen-Biotin

Streptavidin-Red

2.2.4.2 Ermittlung der mAlbumin/FITC Konzentration für die FACS-Analyse von Mikroglia-Zellen

Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen (Nunc) ausplattiert. Es folgt eine Inkubation für 24 h, um eine vollständige Adhäsion der Zellen zu gewährleisten.

Nach 24 h wurden die Zellen für die Analyse mittels eines FACS-Scanners vorbereitet. Als Ligand diente mannosyliertes Albumin/FITC (mAlbumin/FITC). Dieses kann über die Mannose-Reste spezifisch an den Mannose-Rezeptor binden und später durch den FACS-Scanner über die Fluoreszenz des konjugierten FITC in den Zellen nachgewiesen werden. Über die Negativkontrolle (Zellen ohne Ligand) wurde die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Diese wurde bei der Analyse von den anderen durchschnittlichen Fluoreszenzen subtrahiert.

Die Zellen wurden 2 x in 0.1 % BSA/DMEM (DB) gewaschen, um tote Zellen und Debris zu entfernen. Anschließend wurden je 2.5 ml DB (Autofluoreszenz), 2.5 ml DB + Albumin/FITC oder 2.5 ml DB + mAlbumin/FITC + 5 mg/ml Mannan zugegeben. Die Konzentration des Liganden (mAlbumin/FITC) wurde variiert. Die Zellen wurden für 20 min inkubiert, um die Aufnahme des Liganden zu erlauben.

Um eine weitere Aufnahme zu vermeiden und unspezifisch gebundenen Liganden zu entfernen, wurden die Zellen 4 x mit je 2.5 ml DB + 0.02 % Azid (DBA) gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit Trypsin/EDTA/NH₄Cl (10 mM) inkubiert. Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt und die Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette abgespült und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden durch zwei Waschstufen mit je 400 μ l PBS/BSA/Azid (0.04 %) (PBA) gereinigt und bis zu Analyse bei 4°C gehalten.

2.2.4.3 Ermittlung der mAlbumin/FITC Aufnahme in stimulierten Mikroglia-Zellen durch FACS-Analyse

Je 5×10^5 Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen (Nunc) ausplattiert. Es folgt eine Inkubation für 16–24 h um eine vollständige Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit cDMEM und Zytokin bzw. nur frischem cDMEM (Kontrolle) inkubiert.

An Tag 1, Tag 2 und Tag 3 nach der Stimulation wurden die Zellen für die Analyse mittels eines FACS-Scanners vorbereitet.

Als Ligand wurde mAlbumin/FITC verwendet. Dieses kann über die Mannose-Reste spezifisch an den Mannose-Rezeptor binden und später durch den FACS-Scanner über die Fluoreszenz des konjugierten FITC in den Zellen nachgewiesen werden. Über die Negativkontrolle (Zellen ohne Ligand) wurde die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Diese wurde bei der Analyse von den anderen durchschnittlichen Fluoreszenzen subtrahiert.

Die Zellen wurden 2 x in DB gewaschen um tote Zellen und Debris zu entfernen. Anschließend wurden je 2.5 ml des entsprechenden Puffers zugegeben. Die Hälfte der Ansätze wurde außerdem mit 10 mg/ml Mannan versetzt, um die Aufnahme über den Mannose-Rezeptor zu inhibieren. Die Zellen wurden für 20 min inkubiert, um die Aufnahme des mAlbumin-FITC zu erlauben.

Um eine weitere Aufnahme des Liganden zu verhindern und unspezifisch gebundenen Liganden zu entfernen, wurden die Zellen 4 x mit je 2.5 ml DBA gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit Trypsin/EDTA/NH₄Cl (10 mM) inkubiert. Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt, die Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette abgespült und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Zellen durch zwei Waschschriffe mit je 400 µl PBA gereinigt und bis zu Analyse bei 4°C gehalten.

2.2.4.4 Nachweis der Aufnahme von mAlbumin/FITC durch den Mannose-Rezeptor in Mikroglia-Zellen durch Färbung gegen CD45

Die Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen (Nunc) mit einer Dichte von 7.5×10^5 ausplattiert und für 24 h inkubiert.

Durch dreimaliges Waschen in DB wurden abgestorbene Zellen entfernt. Dann wurden die Zellen mit mannosyliertem Albumin/FITC für 20 min inkubiert.

Die Zellen wurden 4 x mit DBA gewaschen und anschließend für 5 min mit Trypsin/EDTA/NH₄Cl bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis transferiert, durch mehrfaches Spülen mit einer Pasteurpipette abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Das Trypsin wurde durch Waschen mit PBA entfernt.

Die Zellen wurden geschüttelt und mit 25 µl PBA mit 40 % (v/v) Mäuse-Serum und 40 % (v/v) Ratten-Serum versetzt, erneut geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Mischen wurden 25 µl des entsprechenden Antikörpers zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert.

Die ungebundenen Antikörper wurden durch einen Waschschrift mit PBA entfernt.

Zur FACS-Analyse wurden die Zellen in 300 µl PBA resuspendiert.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde durch die Färbung mit einer Isotypkontrolle bzw. durch Zellen ohne Inkubation mit Man/BSA/FITC ermittelt.

Antikörper:

Ratte- α -Maus CD45-PE

Ratte Isotyp-PE-Kontrolle

2.2.4.5 FACS-Analyse der Expression von MHC-II in Mikroglia-Zellen

Es wurden je 5 x 10⁵ Mikroglia-Zellen in 6 cm Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden 24 h inkubiert, um eine ausreichende Adhäsion der Zellen zu gewährleisten.

Danach wurden die Zellen in reines DMEM (Kontrollen) überführt und entweder mit 100 U/ml IFN- γ , 10 mg/ml Mannan und 1 x 10⁶ C. albicans versetzt. Die Inkubation der verschiedenen Ansätze erfolgte für 1-2 Tage.

Dann wurden die Zellen 2 x in DMEM gewaschen und mit 2.5 mM EDTA/PBS versetzt. Mittels einer Pasteurpipette wurden die Zellen dann in FACS-Röhrchen überführt. Das EDTA/PBS wurde ausgewaschen und die Zellen dann in 50 µl PBA + 10 % Ziegen Serum für 15 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurden die Fc-Rezeptoren der Zellen blockiert und eine unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper verhindert.

Außer zu den Negativkontrollen wurde dann der Primärantikörper + 10 % Ziegen Serum zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Primärantikörper wurde ausgewaschen. Dann folgte die Inkubation aller Ansätze mit dem Sekundärantikörper (1:100 in PBA + 10 % Ziegen Serum) für 20 min auf Eis. Ungebundener Antikörper wurde ausgewaschen und die

Zellen in wurden in 500 µl PBA resuspendiert. Es folgte die Analyse der Ansätze mittels eines FACS-Scanners. Die durchschnittliche Fluoreszenz wurde ermittelt und die Autofluoreszenz der Kontrolle von den anderen Ansätzen subtrahiert.

Antikörper.

MKD-6 (Primärantikörper)

Ziege- α -Maus DTAF (Sekundärantikörper)

2.2.5 Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

2.2.5.1 Phagozytose-Assay und Färbeprotokoll zur Ermittlung der Lokalisation von *C. albicans* (Standardprotokoll)

Nach Inkubation von Mikroglia-Zellen mit *Candida albicans* war es schwierig zu entscheiden, ob Candida-Zellen sich innerhalb oder außerhalb von Mikroglia-Zellen befanden. Dadurch hätte es zu einer Verfälschung der Quantifikation kommen können.

Durch Anwendung eines speziellen Färbeprotokolls konnten autoklavierte Candida-Zellen aufgrund ihrer Lokalisation differentiell gefärbt werden. Das Protokoll wurde von Giaimis et al. (1992) übernommen und leicht modifiziert.

Alle nachfolgenden Phagozytose-Experimenten werden auf dieses Protokoll bezogen, weshalb es als Standardprotokoll bezeichnet wird.

Protokoll:

Mikroglia-Zellen wurden in 4-Well Platten auf Deckgläsern, die mit PLL beschichtet waren ausplattiert. Es wurden 1×10^5 Zellen pro Well ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, um eine ausreichende Adhäsion zu erlauben.

Die Zellen wurden 2 x mit kaltem DMEM gewaschen und anschließend mit 1×10^7 Candida-Zellen in DMEM inkubiert. Dadurch kann eine eventuelle Opsonisierung der Hefen und eine damit einhergehende Aufnahme über den Fc-Rezeptor verhindert werden.

Nach der Inkubation wurden die Zellen 5 x mit eiskaltem DMEM gewaschen, um nicht aufgenommene Hefe zu entfernen. Danach wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und dann für 5 min in 1 % Tannin (in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Das Tannin wurde 2 x mit PBS ausgewaschen. Auf die Deckgläschen wurde je ein Tropfen FCS gegeben und diese dann getrocknet.

Die Zellen wurden für 4 min mit May-Grünwald-Lösung inkubiert, die dann durch die Zugabe von Wasser verdünnt wurde. Nun wurden die Zellen für 25 min in einer 5 % Giemsa-Lösung (in H₂O) inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen mehrfach in H₂O gewaschen und dann in Mowiol eingedeckelt.

Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert und dann am Mikroskop analysiert.

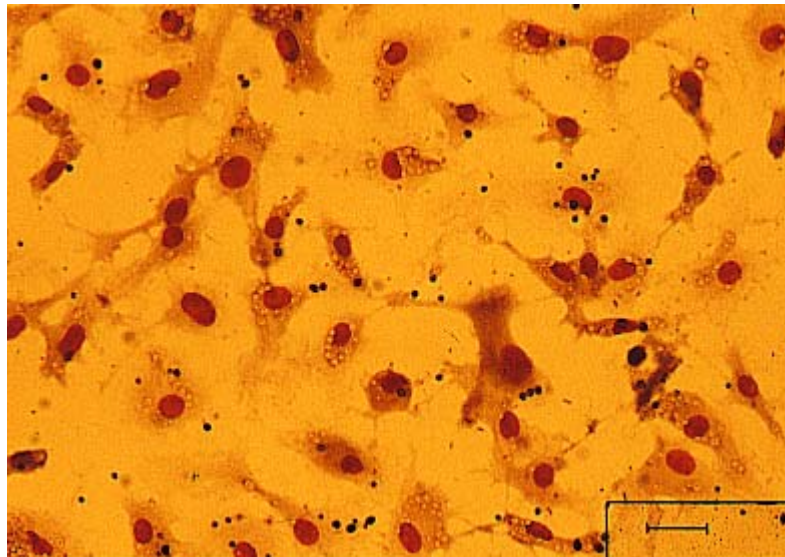


Abb. 2.1: ***C. albicans* in Mikroglia-Zellen.** Mikroglia-Zellen wurden mit *C. albicans* inkubiert und nach dem Standardprotokoll gefärbt. Die dunklen Zellen sind extrazelluläre Hefen, während die Hefen in den Mikroglia hell erscheinen. Die Nuclei der Mikroglia sind stark gefärbt, während die Zellmembran der Mikroglia leicht gefärbt erscheint.

2.2.5.2 Analyse der Aufnahme von *Candida albicans* in Mikroglia-Zellen:

Die Analyse der Aufnahme von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen wurde mittels eines Mikroskops durchgeführt. Eingedeckelte Präparate wurden bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden je 196-212 Mikroglia-Zellen ausgezählt, wobei jeweils die Zellen in einem sichtbaren Feld gezählt und dann eine neue Stelle des Präparats analysiert wurde. Dabei wurde zum einen darauf geachtet, dass keine Zellen doppelt analysiert wurden, zum anderen wurden Gebiete auf dem ganzen Deckglas quantifiziert.

Es wurden jeweils nur die Hefen gezählt, die innerhalb von Mikroglia-Zellen lagen. Diese konnten eindeutig durch die leicht rötliche Färbung identifiziert werden. Mit Mikroglia assoziierte Hefen waren hingegen an ihrer eindeutig blauen Färbung zu erkennen.

Die erhaltenen Einzelwerte wurden mit Hilfe von MS Excel analysiert.

Der Aufnahme-Index wurde wie folgt ermittelt:

Es wurde das Produkt aus dem Mittelwert der aufgenommenen Hefen in allen Zellen und dem Prozentsatz der phagozytierenden Zellen gebildet.

2.2.5.3 Ermittlung der Kinetik der Aufnahme von *Candida albicans* in Mikroglia-Zellen

Jeweils 1×10^5 Mikroglia-Zellen wurden auf PLL-beschichteten Deckgläschen ausplattiert.

Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, um eine ausreichende Adhäsion zu garantieren.

Die Zellen wurden 2 x mit reinem DMEM gewaschen, wodurch die im Kulturmedium vorhandenen Immunglobuline entfernt wurden. Dadurch kann eine Aufnahme über den Fc-Rezeptor ausgeschlossen werden.

Die Zellen wurden mit *Candida albicans* im 100-fachen Überschuß für verschiedene Zeiträume inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte die Färbung der Zellen nach dem Standardprotokoll (siehe 2.).

Die Analyse erfolgte, wie in 2.2.5.2 beschrieben.

2.2.5.4 Ermittlung der Phagozytose von *Candida albicans* nach Addition von Inhibitoren

Nach 24 h Adhesion wurden 1×10^5 Mikroglia-Zellen 2 x mit DMEM gewaschen, um eventuell im Kulturmedium vorhandene Immunglobuline zu entfernen. Danach wurden die Zellen für 15 min mit dem Inhibitor in entsprechender Verdünnung versetzt und inkubiert.

Standardmäßig wurde für Mannan und Laminarin eine Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt. Zur Titration von Mannan wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt.

Nach der Präinkubation mit dem Inhibitor für 15 min, wurde *C. albicans* in einem 100-fachen Überschuss zu den Zellen gegeben und inkubiert. Standardmäßig erfolgte eine Inkubation für 45 min. Zur Ermittlung der Kinetik erfolgte die Inkubation allerdings für verschiedene Zeiträume.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll behandelt und anschließend analysiert.

2.2.5.5 Ermittlung der Phagozytose von *Candida albicans* in stimulierten Mikroglia-Zellen

Auf PLL-beschichteten Deckgläschen wurden jeweils 1×10^5 Mikroglia ausplattiert und für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden dann mit dem Zytokin in entsprechender Verdünnung versetzt und für 1-3 Tage inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin versetzt wurden.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen 2 x gewaschen. Dadurch wurde das Zytokin und eventuell vorhandene Immunglobuline entfernt.

Die Zellen wurden dann für 15 min mit 10 mg/ml Mannan oder in reinem DMEM inkubiert. Nach der Präinkubation folgte die Inkubation mit den Hefen (100 x Überschuss) für 45 min. Danach erfolgte die Färbung und Analyse nach Standardprotokoll (siehe 2.2.5.1 + 2.2.5.2).