

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die potentielle Immunkompetenz von Mikroglia-Zellen untersucht werden. Diesen intrinsischen Zellen des Gehirns wird allgemein eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort im Gehirn zugesprochen. Hierfür spricht ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren, immunomodulatorische Stoffe zu produzieren und ihre nahe Verwandtschaft mit den Makrophagen.

In dieser Arbeit wurde im besonderen der Mannose-Rezeptor und seine Funktion in den Mikroglia-Zellen untersucht. Dieser Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle als Muster-erkennender Rezeptor, der in Makrophagen und Dendritischen Zellen der spezifischen Aufnahme von Pathogenen dienen kann (Stahl und Ezekowitz, 1998).

Die Expression des Mannose-Rezeptors und seine Rolle bei der Endozytose in Mikroglia-Zellen wurde bereits nachgewiesen (Zimmer, 1998). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich Mikroglia-Zellen und der Mannose-Rezeptor in „immunologischen“ Situationen verhalten. Hierzu wurden die Zellen zum einen mit Zytokinen stimuliert, zum anderen wurde die Hefe *Candida albicans* als Modell genutzt, um die Aufnahme potentieller Pathogene zu simulieren. Als Zytokine dienten die beiden „Prototypen“:

- IFN- γ (pro-inflammatorisch)
- IL-4 (anti-inflammatorisch)

Da Mikroglia-Zellen nach einer Stimulation selbst Zytokine produzieren und ausschütten können, ist nicht eindeutig zu sagen, ob die beobachteten Effekt nur durch das Zytokin selbst hervorgerufen wurden, oder ob es sich um sekundäre Effekte handelt, die durch die Stimulation ausgelöst wurden. Dieses Problem ist immer vorhanden, wenn die Wirkungsweise von Zytokinen untersucht werden soll. In den nachfolgenden Ergebnissen wird der Effekt einer Stimulation immer so beschrieben, als wäre er direkt durch das jeweilige Zytokin hervorgerufen worden.

4.1 Proliferative Antwort der Mikroglia-Zellen auf Zytokin-Stimulation

Mikroglia-Zellen machen 5-20 % der gesamten Glia-Zellen des Gehirns aus, es gibt somit mindestens 10 x mehr Mikroglia-Zellen, als Neurone (Streit, 1995). Im normalen adulten Gehirn liegen die Zellen in einer inaktiven, ruhenden Form vor und müssen erst aktiviert werden, um funktionell aktiv werden zu können.

In histologischen Schnitten kann beobachtet werden, dass Mikroglia-Zellen nicht dicht gedrängt vorliegen, sondern jede Zelle einen gewissen Abstand zur nächsten Mikroglia-Zelle aufweist. Auch wenn sich die Anzahl der Zellen erhöht, ist dies der Fall (Lawson et al., 1990; Perry, 1994). Außerdem kann eine unterschiedliche Verteilung dieser Zellen in verschiedenen Bereichen des Gehirns beobachtet werden. In besonders hoher Konzentration liegen die Zellen als sog. perivaskuläre Mikroglia im Bereich von Blutgefäßen vor. Diese Zellen weisen andere Eigenschaften als die parenchymalen Mikroglia-Zellen auf. Einige Befunde weisen darauf hin, dass die perivaskulären Mikroglia-Zellen entweder Makrophagen sind oder zumindest eine Subpopulation, die sich von den anderen Mikroglia-Zellen unterscheidet. Sie stellen die erste Verteidigungslinie dar, die Pathogene überwinden müssen.

Sollte ein Pathogen allerdings in parenchymale Bereiche des Gehirns vorgedrungen sein, dann trifft es auf relativ wenige Mikroglia-Zellen. Über die Ausschüttung von Chemokinen kann es zur Rekrutierung von Mikroglia-Zellen aus benachbarten Bereichen kommen (Cross und Woodrooffe, 2001). Eine andere Strategie besteht darin, dass die Mikroglia-Zellen in dem betreffenden Bereich selbst proliferieren und so ihre Zahl erhöhen.

Da bekannt ist, dass aktivierte Lymphozyten und Mikroglia-Zellen selbst Zytokine ausschütten, wurden kultivierte Mikroglia-Zellen mit einem pro- und einem anti-inflammatorischen Zytokin in verschiedenen Konzentrationen stimuliert und beobachtet, ob es zu einer Proliferation der Zellen kommt.

Wie sich zeigte, führt die Stimulation mit IFN- γ zu einer leichten Proliferation der Zellen (Abb. 3.1). Es ist eine maximale Proliferation um ~22 % zu beobachten. Im Falle von IFN- γ ist nur am Tag 3 ein zeitabhängiger Effekt zu sehen, zwischen Tag 1 und Tag 2 ist kein Unterschied zu detektieren. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist nur am Tag 3 und bei einer Zytokin-Konzentration von 50 U/ml und 100 U/ml zu sehen, die anderen Zytokin-Konzentrationen weisen keine Unterschiede auf. Dieser Effekt von IFN- γ ist bei Makrophagen nicht zu beobachten (Xaus et al., 1999). In Makrophagen kommt es entweder zu keiner Änderung der Zellzahl, oder die Zellzahl geht leicht zurück (Kloss et al., 1997). Eine Möglichkeit wäre natürlich, dass IFN- γ zu einer verstärkten Expression von Dehydrogenasen in Mikroglia-Zellen führt. Dies würde mit dem verwendeten Assay als Zunahme der Zell-Zahl interpretiert werden. Da Grau et al. (1997) auch eine Proliferation von Mikroglia-Zellen (*in vivo*) feststellten konnten, wenn die Zellen mit IFN- γ stimuliert wurden und hier die Proliferation mittels BrdU ermittelt wurde, ist diese Möglichkeit allerdings auszuschließen.

IL-4 führt hingegen im beobachteten Zeitraum zu einer ständigen Zunahme der Proliferation. In diesen Zellen kann eine maximale Proliferation von ~94 % erreicht werden (Abb. 3.2). Diese Proliferation konnte bereits in Makrophagen und Mikroglia beobachtet werden (Suzumura et al., 1994). Auch bei der Stimulation mit IL-4 ist es so, dass der größte Effekt nach drei Tagen Stimulation erreicht wird. Zwischen den Zytokin-Konzentrationen von 250 U/ml und 500 U/ml ist keine Zunahme der Proliferation mehr zu beobachten. Hier kann es zu einem leichten Abfall der Zellzahl kommen. Dies kann entweder durch experimentelle Variationen erklärt werden, oder es kann auch sein, dass hier ein leichter zytotoxischer Effekt des IL-4 einsetzt. Die Stimulation mit geringeren IL-4 Konzentrationen (12.5 U/ml => 100 U/ml) zeigte eine direkte Abhängigkeit der Proliferationsrate von der Zytokin-Konzentration (Abb. 3.3). In diesem Fall konnte innerhalb der ersten beiden Tage kein zeitabhängiger Effekt der Zytokin-Stimulation beobachtet werden.

Die Mikroglia-Zellen reagieren sowohl auf einen pro-, als auch auf einen anti-inflammatorischen Stimulus mit Proliferation. Die Zellen sind somit befähigt ihre Anzahl auf ein immunologisches Signal hin zu erhöhen. Da vermutet wird, dass Mikroglia-Zellen beide Zytokine selbst herstellen und sekretieren können, könnten sie so sich somit selbst und ihre direkten Nachbarn beeinflussen (auto- und parakrines Feedback).

Durch die Erhöhung der Zellzahl wäre es denkbar, dass die Mikroglia-Zellen dazu fähig sind auch mit einer größeren Menge an Pathogenen effektiv umgehen zu können. Dies könnte zum einen dazu dienen eine weitere Ausbreitung so lange zu verhindern, bis „professionelle“ Immunzellen von außerhalb eingewandert sind. Auf der anderen Seite könnte dies auch ein Schutzmechanismus sein. Solange die Mikroglia-Zellen selbst die Ausbreitung eines Pathogens verhindern können, wird die Invasion des Gehirns durch das „periphere“ Immunsystem des Körpers verhindert. Solch eine Invasion kann in dem empfindlichen neuronalen Gewebe zu starken Schädigungen führen, die eventuell schwerwiegender sind, als der durch das Pathogen verursachte Schaden.

Makrophagen proliferieren nach IFN- γ Stimulation nicht. Die Proliferation könnte im Falle der Makrophagen deshalb keine Rolle spielen, da nötigenfalls ständig neue Makrophagen an den Ort der Immunantwort rekrutiert werden können. Im Körper könnte dadurch das Gewebe vor einem Überschießen der Inflammation (= Gewebeschädigung) geschützt werden. Im Gegensatz dazu sind Mikroglia-Zellen in ihrer Zahl limitiert und es können nicht beliebig viele rekrutiert werden. Außerdem herrscht im Gehirn unter normalen Umständen ein anti-inflammatorisches Milieu (Fabry et al., 1994; Abbas et al., 1996). Dadurch würde zum

einen eine inflammatorische Antwort per se viel geringer ausfallen. Zum anderen könnte durch die Limitation der Zellzahl (trotz Proliferation) eine massive Inflammation automatisch verhindert werden.

4.2 Regulation der Expression des Mannose-Rezeptors durch Stimulation mit IFN- γ und IL-4

Die Expressionsrate von Molekülen, die immunologische Funktionen übernehmen können, wird oftmals durch Zytokine direkt beeinflusst. Durch diese Modulationen kann die Funktion einer Zelle an die entsprechenden Erfordernisse angepasst werden. Durch Zytokine aktivierte Makrophagen können Pathogene nicht nur effektiver aufnehmen, sondern diese auch leichter degradieren und die Abbauprodukte effektiver präsentieren. Welchen Effekt pro- und anti-inflammatorische Zytokine dabei jeweils haben, lässt sich nicht generell sagen.

Von Makrophagen ist bekannt, dass die Expressionsrate des Mannose-Rezeptors durch eine Stimulation der Zellen mit Zytokinen verändert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Stimulation von Mikroglia-Zellen mit IFN- γ bzw. IL-4 auf die Expressionsrate des Mannose-Rezeptors untersucht.

Die Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- γ führt in Makrophagen zu einer geringeren Expression des Mannose-Rezeptors. Die Verringerung der Rezeptorkonzentration ist zum Teil auf eine Reduktion der Transkription des Mannose-Rezeptor Gens zurückzuführen (Harris et al., 1992).

Wie bereits Abb. 3.4 zeigt, kommt es auch in Mikroglia-Zellen zu einer Reduktion der Menge an Mannose-Rezeptor, wenn diese Zellen mit IFN- γ stimuliert werden. Das Ausmaß der Reduktion ist der Zytokin-Konzentration direkt proportional. Mit steigender Zytokin-Konzentration ist eine stärkere Abnahme der Rezeptor-Konzentration zu verzeichnen (Abb. 3.5). Die Reduktion ist über drei Tage zu beobachten, es kommt innerhalb dieses Zeitraums zu keiner Erhöhung der Expression. Es ist keine Zeitabhängigkeit des Effektes von IFN- γ zu sehen. Die Reduktion scheint innerhalb des beobachteten Zeitraums auf einem vergleichbaren Niveau zu bleiben.

Wie sich zeigte, führt die Stimulation mit IL-4 zu einer massiven Zunahme der Expressionsrate des Mannose-Rezeptors (Abb. 3.6). Dieser Effekt konnte auch in Makrophagen nachgewiesen werden (Stein et al., 1992). Die Zunahme der Expressionsrate ist

zeitabhängig. Dies konnte bereits daran erkannt werden, dass die Exposition der Filme für Tag 1 und Tag 2 bzw. Tag 3 nicht gleich lang erfolgen konnte. Während das Signal von Tag 1 für die digitale Quantifizierung noch zu schwach war, war es in den beiden anderen Fällen schon zu stark.

In Bezug zur unstimulierten Kontrolle ist für alle eingesetzten Zytokin-Konzentrationen eine Zeitabhängigkeit zu beobachten, da die Zellen nach Stimulation mit fortschreitender Stimulationsdauer mehr Mannose-Rezeptor exprimieren. Alle eingesetzten Zytokin-Konzentrationen führten zu einer massiven Zunahme der Mannose-Rezeptor Konzentration. Die Stimulation mit 125 U/ml und 250 U/ml führte zu keinen signifikanten Unterschieden über den beobachteten Zeitraum. Wurden die Zellen hingegen mit 500 U/ml stimuliert, dann war ein zeitabhängiger Effekt zu sehen (Abb. 3.7).

In Bezug auf die Regulation der Expressionsrate des Mannose-Rezeptors durch Zytokine verhalten sich die Mikroglia-Zellen, wie es für Makrophagen beschrieben wurde. Das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ führt zu einer Abnahme der Rezeptor-Konzentration, während das anti-inflammatorische Zytokin IL-4 zu einer starken Zunahme der Rezeptor-Konzentration führt. Es ist nicht bekannt, weshalb die Rezeptor-Konzentration aufgrund einer Aktivierung der Zelle heruntergefahren wird. Wie allerdings bekannt ist und sich auch in dieser Arbeit zeigte (vgl. Abschnitt 4.3.3), kann man aufgrund der Konzentration eines Rezeptors keine Aussagen über dessen Aktivität treffen.

4.3 Endozytose in Mikroglia-Zellen

4.3.1 Ermittlung der über den Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose von HRP in stimulierten Zellen

Im Labor von A. Régnier-Vigouroux wurde ein Protokoll etabliert (Zimmer, 1998), mit dem die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose untersucht werden kann. Dabei macht man es sich zu Nutze, dass das Enzym HRP mannosyliert ist und daher spezifisch an den Mannose-Rezeptor bindet.

Nach dem Standardprotokoll sollte die Endozytose in mit Zytokin stimulierten Zellen untersucht werden. Wie sich allerdings nach mehreren Versuchen zeigte, konnten mit diesem Protokoll keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden. Da in diesen Ansätzen die Zellkultur-Schalen direkt verwendet wurden, fiel es besonders ins Gewicht, dass die Zellen

von Schale zu Schale eine unterschiedliche „Grundaktivierung“ aufwiesen. Daher wurde versucht eine Homogenisierung der Zellpopulationen zu erreichen, indem mehrerer Schalen abtrypsiniert und gepoolt wurden. Wie sich zeigte, löste sich der Großteil der Zellen während der extensiven Waschschriffe in den eingesetzten 96-Well Platten ab. Es wurde versucht, dieses Problem durch den Einsatz verschiedener Methoden zu umgehen, was allerdings nicht gelang. Daraufhin wurden die Zellen in 24- bzw. 4-Well Platten ausplattiert, da hier kein Ablösen der Zellen zu beobachten war. Es wurden wiederum mehrere Experimente durchgeführt, die ebenfalls zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen führten. Daher wurde der Ansatz prinzipiell geändert und die Endozytose nicht über die Internalisierung von HRP ermittelt.

4.3.2 Ermittlung der Endozytose mittels FACS-Analyse

Nachdem die Internalisierung von HRP als Modell der Rezeptor-vermittelten Endozytose mit stimulierten Zellen nicht genutzt werden konnte, sollte die Endozytose mittels eines FACS-Scanners bestimmt werden. Als Ligand für den Mannose-Rezeptor wurde mannosyliertes Albumin/FITC (mAlbumin/FITC) verwendet, das über die Mannose-Reste spezifisch an den Mannose-Rezeptor bindet. Um diese Bindung spezifisch zu inhibieren, wurde Mannan eingesetzt und eine Titration des mAlbumin/FITC durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.8 und 3.9 zu sehen ist, kommt es bei allen getesteten Liganden-Konzentrationen zu einer Aufnahme des Liganden, die teilweise durch Mannan inhibiert werden kann. Es zeigte sich, dass die Zellen unterschiedliche Anteile der Gesamtaufnahme über den Mannose-Rezeptor aufnehmen. Je höher die eingesetzte Liganden-Konzentration, desto geringer wird der Anteil, der durch die Zugabe von Mannan inhibiert werden kann. Dies bedeutet, dass die Zellen den Liganden zu immer geringeren Anteilen über den Mannose-Rezeptor aufnehmen. Auch wenn eine Aufnahme über andere Rezeptoren denkbar wäre, an die das Albumin direkt bindet, wird dieser Anteil als unspezifische Aufnahme betrachtet.

Da der Mannose-Rezeptor eine hohe Affinität zu seinem Liganden aufweist, ist er dazu in der Lage auch geringe Mengen an Ligand zu einer Aufnahme in die Zelle zu konzentrieren. Bei sehr niedrigen Konzentrationen erfolgt die Aufnahme dann fast ausschließlich über den Mannose-Rezeptor. Bei hohen Liganden-Konzentrationen nehmen die Zellen mehr Ligand unspezifisch (über Pinozytose) auf. Dies bedeutet, dass die Mikroglia-Zellen eine hohe unspezifische endozytotische Aktivität aufweisen. Die verwendeten Mikroglia-Zellen können somit, auch ohne vorherige Stimulation mit Zytokinen, große Mengen an Stoffen aufnehmen.

Inwieweit dieser *in vitro* Befund die *in vivo* Verhältnisse widerspiegelt ist unklar. Es ist klar, dass die verzweigten, inaktiven Mikroglia-Zellen im gesunden Gehirn nicht oder nur schwach endozytotisch und phagozytotisch aktiv sind (Gehrmann et al., 1995). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroglia-Zellen sind leicht/teilweise aktiviert (vgl. auch MHC-II und TNF- α Expression). Deshalb wäre es denkbar, dass die Mikroglia-Zellen auch *in vivo* bereits sehr schnell nach einer Aktivierung bzw. nach teilweiser Aktivierung die Fähigkeit zur Aufnahme von Stoffen aus der Umgebung erhalten.

Auch wenn die verwendeten Mikroglia-Zellen einen hohen Reinheitsgrad aufweisen, so wäre es denkbar gewesen, dass auch die vorhandenen Astrozyten mAlbumin/FITC aufnehmen. Daher wurden die Zellen nach der mAlbumin/FITC Aufnahme gegen den Makrophagen/Mikroglia Marker CD45 gefärbt. Wie die Analyse der Zellen ergab (Abb. 3.10), sind alle Zellen, die mAlbumin/FITC aufnehmen CD45 positiv und somit keine Astrozyten. Wenn auch bekannt ist, dass die Astrozyten zu einer Endozytose über den Mannose-Rezeptor fähig sind (Burudi et al., 1998), so spielt diese Aufnahme hier keine Rolle. Dies könnte sowohl am hohen Reinheitsgrad der verwendeten Mikroglia-Zellen liegen, als auch an der geringen eingesetzten Liganden-Konzentration. Die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose in Mikroglia-Zellen konnte somit auch mit einer anderen Methode, als der HRP-Aufnahme (Zimmer, 1998), bewiesen werden.

4.3.3 Auswirkungen einer Stimulation mit Zytokinen auf die Endozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen

Die Immunantwort muss durch Zytokine sehr stark reguliert werden, da es nicht nur darauf ankommt, die Pathogene so schnell als möglich zu eliminieren. Die körpereigenen Zellen müssen zudem vor einem Überschießen der Immunantwort geschützt werden, da es ansonsten zu massiven Gewebeschäden kommen kann. Bedenkt man, dass Neuronen entweder gar nicht, oder nicht ausreichend regenerieren können, so wird deutlich, dass Zytokine im Gehirn eine zentrale Rolle spielen. Die Mikroglia-Zellen, als intrinsische Immunzellen des Gehirns, sollten dazu fähig sein ihre Aktivität aufgrund einer Stimulation mit Zytokinen zu verändern. In diesen Experimenten wurde die gesamte Endozytose und der Anteil der Endozytose, der durch die Zugabe von Mannan nicht inhibiert wird, betrachtet. Durch einfache Subtraktion der beiden Werte, kann so der Anteil bestimmt werden, der durch Mannan inhibiert werden kann. Dieser Anteil entspricht dem Teil der Endozytose, der über den Mannose-Rezeptor vermittelt

wird. Die Inhibition des Mannose-Rezeptors kann nicht zu 100% erfolgen. So wird auch nach der Zugabe des Inhibitors immer noch eine geringe Menge des Liganden über den Mannose-Rezeptor aufgenommen. Da die Größe dieses Anteils allerdings nicht ermittelt werden kann, wird dieser Teil hier vernachlässigt und nur der inhibierbare Teil als über den Mannose-Rezeptor aufgenommene Anteil bezeichnet.

Für die Stimulation wurde wiederum IFN- γ , als Prototyp eines pro-inflammatorischen, und IL-4 als Prototyp eines anti-inflammatorischen Zytokins gewählt. In dieser Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Mikroglia-Zellen auf eine Stimulation mit diesen Zytokinen reagieren (vgl. 4.1 und 4.2). Wir waren daran interessiert, welche Auswirkungen die Stimulation auf die endozytische Aktivität der Mikroglia-Zellen hat.

Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, führt die Stimulation mit IFN- γ in Mikroglia-Zellen zu einer Reduktion der Endozytose. Diese Reduktion nimmt über die drei analysierten Tage ab und die Zellen, die mit 25 U/ml IFN- γ stimuliert wurden, erreichen fast wieder die Endozytose-Aktivität der unstimulierten Kontroll-Zellen. Nach der Stimulation mit 100 U/ml ist hingegen über den beobachteten Zeitraum eine Reduktion der Aufnahme zu sehen, auch wenn diese mit Fortdauer der Stimulation abnimmt (vgl. auch Abb. 3.12).

Inhibiert man die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose, so ist eine noch stärkere Reduktion der Endozytose zu beobachten (Abb. 3.13). Dieser Effekt ist abhängig von der Zytokin-Konzentration, da er nach einer Stimulation mit 100 U/ml stärker ausfällt. Die nicht inhibierbare Endozytose bleibt über die drei beobachteten Tage konstant reduziert. Es ist keine Rückkehr zu den Verhältnissen der unstimulierten Kontroll-Zellen zu sehen (vgl. auch Abb. 3.14). Verrechnet man die erhaltenen Werte, so ergibt sich der Teil der Aufnahme, der direkt über den Mannose-Rezeptor vermittelt wird. In Abbildung 3.15 ist zu sehen, dass dieser Teil der Endozytose durch die Stimulation mit IFN- γ erhöht wird. Es kommt über die drei Tage zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität des Mannose-Rezeptors. Es ist zu beobachten, dass eine positive Korrelation der Zytokin-Konzentration und der Aktivierung des Mannose-Rezeptors besteht. Am dritten Tag ist die höchste Steigerung zu beobachten, es ist eine klare Zeitabhängigkeit zu beobachten (vgl. auch Abb. 3.16). Auf den ersten Blick mag es überraschend erscheinen, dass die Endozytose über den Mannose-Rezeptor zunimmt, während die nicht-inhibierbare und die totale Endozytose durch die Stimulation mit IFN- γ reduziert wird. Da die nicht-inhibierbare Endozytose allerdings über die drei Tage reduziert bleibt, während die gesamte Endozytose wieder ansteigt, ist klar, dass die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose ansteigen muss. Das dieser Effekt von anderen Gruppen in

Makrophagen nicht beschrieben werden konnte, kann daran liegen, dass die Aufnahme über den Mannose-Rezeptor anders bestimmt wurde (so wurde z.B. die gesamte Aufnahme von mannosylierten Liganden als über den Mannose-Rezeptor vermittelt betrachtet). Denkbar ist auch, dass die Steigerung der Endozytose über den Mannose-Rezeptor nach Stimulation mit IFN- γ nur in Mikroglia-Zellen beobachtet werden kann.

Von Makrophagen ist bekannt, dass die Stimulation mit IL-4 zu einem Anstieg der über den Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose führt (Stein et al., 1992). Wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, führt die Stimulation mit IL-4 auch in Mikroglia-Zellen zu einem starken Anstieg der Endozytose. Der Effekt nimmt über den beobachteten Zeitraum deutlich zu, wobei keine konzentrationsabhängigen Unterschiede zu beobachten sind (Abb. 3.18). Die nicht durch Mannan inhibierbare Endozytose steigt ebenfalls an (Abb. 3.19 und 3.20). Dieser Anstieg ist allerdings eher gering im Vergleich zum Anstieg der gesamten Endozytose. Die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose nimmt deutlich zu, auch wenn am Tag 1 nur eine geringe bzw. keine Zunahme zu sehen ist (Abb. 3.21). Am Tag 2 und 3 ist kein großer Unterschied zwischen den beiden Zytokin-Konzentrationen zu beobachten (Abb. 3.22). Auch im Falle der Stimulation mit IL-4 erfolgt die verstärkte Endozytose zum größeren Teil über den Mannose-Rezeptor.

Die getesteten Zytokine beeinflussen die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose unterschiedlich. Während das pro-inflammatorische IFN- γ zu einer Reduktion der nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose führt, führt das anti-inflammatorische Zytokin IL-4 zu deren Erhöhung. In beiden Fällen kommt es allerdings zu einer Erhöhung der Aktivität des Mannose-Rezeptors. Dies könnte dafür sprechen, dass der Mannose-Rezeptor in beiden Fällen eine Schlüsselposition bei der Immunantwort einnimmt und seine Aktivität durch die entgegengesetzten Stimuli erhöht wird, um in beiden Fällen die Entfernung von potentiellen Pathogenen zu ermöglichen. Ein ähnlicher Effekt wurde im Falle der durch den Mannose-Rezeptor vermittelten Phagozytose beschrieben (Raveh et al. 1998). Auch wenn die Art der Aktivitätserhöhung nicht bekannt ist, wären mehrere Wege denkbar, wie diese erreicht werden könnte. Es ist bekannt, dass nicht alle Mannose-Rezeptoren aktiv an der Aufnahme und intrazellulären Freisetzung von Liganden beteiligt sind (Tietze et al., 1982) und jeweils immer nur ein geringer Teil (~20%) der Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsent ist (Lennartz et al., 1989). Die Aktivität könnte einfach durch Verschieben von Rezeptoren zwischen den Pools erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht die Menge an Mannose-Rezeptor auf der Zelloberfläche zu ermitteln. Trotz mehrerer Versuche konnte dies wegen eines zu schwachen Signals bei der FACS-Analyse nicht erreicht werden. Diese Möglichkeit der Aktivitätssteigerung kann zumindest im Falle der mit IFN- γ stimulierten Zellen ausgeschlossen werden, da es hier zu einer massiven Reduktion der Rezeptor-Konzentration in den Zellen kam.

Die Änderung der Zeit, die ein Rezeptor für einen Zyklus benötigt, könnte ebenfalls zu einer Änderung der Aktivität des Rezeptors führen. Da verschiedene Rezeptoren innerhalb der Zelle mit der gleichen Geschwindigkeit bewegt werden (Ward et al., 1998), wäre solch eine Art der Regulation allerdings nur dann zu erreichen, wenn sich die Verweildauer des Mannose-Rezeptors auf der Zelloberfläche verändert würde. Da diese allerdings davon abhängt, ob ein Ligand gebunden wird oder nicht und wie viele Rezeptoren der Zelle das Signal zur Internalisierung geben, ist dieser Weg eher unwahrscheinlich.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass nicht die Eigenschaft des Rezeptors selbst der ausschlaggebende Punkt ist, sondern die intrazelluläre Signaldomäne des Mannose-Rezeptors bzw. Teile des weiterleitenden molekularen Signalapparates. Durch eine Änderung der Signalstärke innerhalb der Zelle, könnte die Aktivität sehr einfach und effektiv reguliert werden. In Makrophagen konnte beschrieben werden, dass die Endozytose- und die Phagozytose-Aktivität des Mannose-Rezeptors unterschiedlich beeinflusst werden kann (Raveh et al., 1998). Dies bedeutet, das Signal des Rezeptors wird direkt am Rezeptor oder bei der weiteren Übertragung geändert. Geht man davon aus, dass der Rezeptor immer ein gewisses Grundsignal liefert, so führt eine einfache Erhöhung der Rezeptor-Konzentration zu einer Erhöhung des Signals zur Internalisierung. Dies könnte bei der Stimulation mit IL-4 der Fall sein. Hier kommt es durch die Erhöhung der Rezeptor-Menge zu einer Zunahme der Endozytose. Die Stimulation mit IFN- γ führt hingegen zu einer Reduktion der Mannose-Rezeptor Konzentration. Die gesamte Endozytose-Aktivität der Zelle nimmt ab, die über den Mannose-Rezeptors vermittelte Endozytose steigt allerdings an. Das bedeutet, weniger Rezeptor kann mehr Ligand in die Zelle aufnehmen. Dies kann allerdings nicht (wie evtl. im Fall nach IL-4 Stimulation, s.o.) durch die quantitative Erhöhung der Signalstärke erreicht werden. Das Signal am Rezeptor selbst bzw. das weitergeleitete Signal muss verstärkt werden. Da bisher noch nichts über die Art und den Weg des Signals bekannt ist, kann über die Art der Regulation nur spekuliert werden. Es erscheint allerdings sehr wahrscheinlich, dass die Regulation der Aktivität des Mannose-Rezeptors über diese zwei Wege (Quantität und Qualität) erfolgt.

4.4 Phagozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen

S. cerevisiae wird ebenfalls über den Mannose-Rezeptor aufgenommen, jedoch ergab ein Vergleich der Aufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* und *C. albicans*, dass die Mikroglia-Zellen *C. albicans* stärker aufnehmen (nicht dargestellt). Dies kann einfach an der geringeren Größe von *C. albicans* liegen. Aus diesem Grund und der klinischen Relevanz wurde in der vorliegenden Arbeit *C. albicans* als Modell gewählt, um die Phagozytose in Mikroglia-Zellen zu untersuchen.

Die Hefe-Zellen wurden autoklaviert eingesetzt. Dadurch konnten sekundäre Einflüsse durch die Hefen eliminiert werden, die nicht unmittelbar etwas mit der Phagozytose zu tun haben. Durch die Verwendung abgetöteter Hefen wird auch das Problem der starken Proliferation von Hefen umgangen. Eine Möglichkeit wäre gewesen, das Wachstum der Hefen durch Zusatz von Antibiotika wie z.B. Amphotericin B zu behindern. Diese hätte aber auch Einflüsse auf die Aktivität der Mikroglia-Zellen haben können. Da es in der vorliegenden Arbeit nur darum ging die Phagozytose-Aktivität der Mikroglia-Zellen zu untersuchen und nicht die spezifischen Interaktionen dieser Zellen mit *C. albicans* (und umgekehrt), wurde der Weg über Hitze-inaktivierte Hefen gewählt.

Als Darstellungsweise der Phagozytose-Aktivität wurde der Aufnahme-Index gewählt. Dieser stellt das Produkt aus dem Mittelwert der Gesamtzahl aufgenommener Hefen und dem prozentualen Anteil der phagozytierenden Mikroglia-Zellen dar. Durch diese Darstellungsweise wird der Anteil der Mikroglia-Zellen berücksichtigt, der keine Hefen aufgenommen hat. Dies ist deshalb von Bedeutung, da in allen experimentellen Ansätzen Mikroglia-Zellen vorhanden waren, die keine Hefen aufgenommen hatten. Inwiefern dies nun allerdings Subpopulationen von Mikroglia-Zellen widerspiegelt, ist nicht zu sagen.

Innerhalb der verschiedenen Experimente können Schwankungen der Aufnahme-Indizes beobachtet werden, auch wenn die Zellen nicht manipuliert wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich um Zellen einer Primärkultur handelt, die sich in einem unterschiedlichen Aktivierungszustand befinden können.

4.4.1 Allgemeine Charakterisierung der Phagozytose

4.4.1.1 Kinetik der Phagozytose von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen

Die Untersuchung der Kinetik der Phagozytose von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen zeigte, dass die Aufnahme der Hefen sehr schnell einsetzt (Abb. 3.23). So konnten bereits nach 15 min Mikroglia-Zellen beobachtet werden, die *C. albicans* aufgenommen hatten. Zwar war dies nur ein geringer Teil der Mikroglia-Zellen, doch bedeutet es, dass Mikroglia-Zellen *C. albicans* in sehr kurzer Zeit nicht nur binden, sondern komplett phagozytieren können. Bei längeren Inkubationszeiten konnten Mikroglia-Zellen beobachtet werden, die sehr große Mengen an Hefen aufgenommen hatten. Diese Zellen erschienen unter dem Mikroskop völlig mit Hefen angefüllt, die in mehreren Schichten übereinander liegen. Neben diesen phagozytisch sehr aktiven Zellen gab es auch Mikroglia-Zellen, die nur sehr wenige oder keine Hefen aufgenommen hatten. Ob diese verschiedenen Zellen funktionelle Subklassen widerspiegeln, kann allerdings nicht gesagt werden. Die Heterogenität der Verteilung der phagozytierten Hefen auf die Mikroglia-Zellen ist gut in Abbildung 3.29 zu sehen.

Im gesunden Gehirn liegen Mikroglia-Zellen in ihrer verzweigten, inaktiven Form vor. Die hier verwendeten Zellen liegen nicht ganz in dieser inaktiven Form vorzuliegen, auch wenn sie nicht mit vollständig aktivierten Zellen gleichgesetzt werden können (siehe unten). Die hier verwendeten Zellen können unter normalen Kulturbedingungen *C. albicans* phagozytieren, auch wenn sie nicht durch die Gabe von Zytokinen stimuliert sind. Das bedeutet, dass es *in vitro* auch in „ruhenden“ Zellen zur Phagozytose kommt. Auch wenn man nicht davon ausgehen kann, dass dies auch *in vivo* der Fall ist, so könnte dies doch ein Hinweis darauf sein, dass Mikroglia-Zellen sehr schnell nach einer (teilweisen) Aktivierung phagozytotisch aktiv werden können. *In vivo* würde dies dann bedeuten, dass die Zellen ohne eine vollständige Aktivierung Pathogene eliminieren können. Es könnte auch bedeuten, dass die Mikroglia-Zellen z.B. apoptotische Zellen bzw. Teile von abgestorbenen Zellen aufnehmen können, ohne dass es zu einer vollständigen Aktivierung der Zellen und damit zu einer eventuellen Schädigung des Gewebes kommt.

4.4.1.2 Ermittlung des Anteils des Mannose-Rezeptors und der β -Glucan Rezeptoren an der Aufnahme von *C. albicans*

Candida albicans und andere Hefen können über verschiedene Rezeptoren in Zellen aufgenommen werden. Von Marodi et al. (1991) konnte bewiesen werden, dass die Phagozytose von *C. albicans* in humanen Makrophagen hauptsächlich über den Mannose-Rezeptor vermittelt wird. Da die Bindung an und damit die Aufnahme eines Liganden über den Mannose-Rezeptor durch Mannan inhibiert werden kann, wurde Mannan in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und der Effekt auf die Phagozytose von *C. albicans* ermittelt. Wie in Abbildung 3.25 zu sehen, kommt es bereits nach einer Zugabe von 2 mg/ml zu einer Inhibition der Aufnahme von *C. albicans*. Eine Steigerung der Inhibitor-Konzentration über 3 mg/ml führt nur noch zu leichten Schwankungen der Inhibitionsrate. Dies spiegelt das Bild wider, das sich auch in Makrophagen bietet. Die verwendeten Mikroglia-Zellen sind somit nicht nur prinzipiell zur Phagozytose von *C. albicans* fähig, sondern diese wird zum Teil über den Mannose-Rezeptor vermittelt.

Es ist bekannt, dass Hefen auch über β -Glucan-Rezeptoren aufgenommen werden können. Aufgrund seiner Expression in den Mikroglia-Zellen, könnte es sich hierbei um den CR3 (Complement-Rezeptor 3) handeln. Dieser Rezeptor ist auch als Mac-1 bekannt und dient als ein klassischer Marker für Makrophagen und Mikroglia-Zellen. Marodi et al. (1993) konnte allerdings zeigen, dass die Aufnahme von *C. albicans* über den CR3 in Makrophagen keine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb neben dem Inhibitor Mannan auch Laminarin als Inhibitor eingesetzt. Dadurch ist es möglich zu ermitteln, ob neben dem Mannose-Rezeptor (Mannan) auch β -Glucan Rezeptoren (Laminarin) eine Rolle spielen. Wie sich zeigte (Abb. 3.26), kommt es durch die Zugabe von Laminarin zu einer leichten Inhibition der Phagozytose von *C. albicans*. Dies könnte auf eine Rolle eines β -Glucan-Rezeptors hindeuten. Die durch Laminarin bedingte Inhibition der Phagozytose von *C. albicans* ist im Vergleich zu der von Mannan ausgelösten Inhibition jedoch relativ gering. In Experimenten mit Makrophagen wurde festgestellt, dass beide Rezeptor-Typen zusammen arbeiten, d.h. dass die höchste Inhibition durch eine Kombination von Mannan und Laminarin ausgelöst werden kann (Giaimis et al., 1993). Im Falle der Mikroglia war dieser Effekt allerdings nicht zu beobachten. Hier führte eine gleichzeitige Gabe beider Inhibitoren zu keiner höheren Inhibition der Phagozytose. Die Phagozytose von *C. albicans* läuft somit in Mikroglia-Zellen hauptsächlich über den Mannose-Rezeptor ab. Kommt es zu einer

Aufnahme über Glucan-Rezeptoren, so wird diese jedoch auf jeden Fall von der Aufnahme über den Mannose-Rezeptor überdeckt und verhält sich nicht additiv. Dies spricht dafür, dass die Phagozytose über den/die β -Glucan-Rezeptor(en) in den verwendeten Mikroglia-Zellen nur eine geringe, oder wahrscheinlicher keine Rolle spielt (im Gegensatz zu Makrophagen). Denkbar wäre auch, dass das Laminarin zu einem gewissen Grad an den Mannose-Rezeptor bindet, da dieser Rezeptor mit geringer Affinität auch Glucose-Reste binden kann (Kéry et al. 1992). Dies würde das geringe Ausmaß der durch Laminarin bedingten Inhibition erklären, die nach Zugabe von Mannan nicht mehr zu beobachten ist.

Für die restlichen Experimente wurde deshalb nur Mannan als Inhibitor eingesetzt.

4.4.1.3 Kinetik der *C. albicans* Aufnahme nach Inhibition durch Mannan

Wird die Aufnahme der Hefen durch die Zugabe von Mannan inhibiert und die Aufnahme über verschiedene Zeiträume analysiert, so zeigt sich, dass das Ausmaß der Inhibition mit steigender Inkubationsdauer abnimmt (Abb. 3.27 und 3.28). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Zellen das Mannan über Pinozytose und über den Mannose-Rezeptor selbst aus dem Medium aufnehmen und so die Konzentration an freiem Inhibitor absenken. Diese Möglichkeit ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da Mannan mit 10 mg/ml in einer sehr hohen Konzentration eingesetzt wurde. Die Zellen können diese Menge an Mannan in der getesteten Zeit nicht komplett aufnehmen. Da die Aufnahme durch Mannan nicht zu 100% inhibiert werden kann, bedeutet dies, dass *C. albicans* nicht nur über den Mannose-Rezeptor aufgenommen wird, sondern auch über andere Wege. Blockiert man nun die Aufnahme über den Mannose-Rezeptor, so läuft die Aufnahme über die anderen Mechanismen trotzdem weiter. Mit fortschreitender Dauer der Inkubation kommt es so zu einer steigenden Zahl an Hefen, die über die alternativen Wege aufgenommen werden. Die Zellen nehmen Hefen nur bis zu einem gewissen Grad auf, danach erfolgt keine weitere Aufnahme mehr. Diesen maximalen Wert an aufgenommenen Hefen streben die Zellen bei längerer Inkubation auch über die anderen Wege an, auch wenn dies vergleichsweise langsamer erfolgt. Deshalb geht mit der Zunahme der Inkubationsdauer auch eine Abnahme des Unterschiedes zwischen den Zellen einher, die mit bzw. ohne Inhibitor mit der Hefe inkubiert wurden.

Nach 45 min Inkubation nehmen Mikroglia-Zellen, deren Aufnahme von *C. albicans* nicht durch die Zugabe von Mannan inhibiert wurde, bevorzugt mehr als zehn Hefen auf (Abb. 3.29). Die Zugabe von Mannan führt zu einer Abnahme des Aufnahme-Index. Ein direkter Vergleich beider Zellpopulationen zeigt allerdings, dass die Anzahl der Mikroglia-

Zellen, die nicht phagozytierten, fast gleich ist. In dem inhibierten Ansatz kommt es meist zu einer Aufnahme von nur 1-2 Hefen pro Mikroglia-Zelle. Der Anteil der Zellen, die mehr als zehn Hefen aufgenommen haben, ist vergleichsweise geringer. Die Verteilung der Zellen auf die anderen betrachteten Intervalle ist fast gleich. Aus dem Experiment ist nicht eindeutig zu ersehen, wie die Verschiebung zustande kommt. Am wahrscheinlichsten ist, dass es sich um eine gleichmäßig verteilte Inhibition handelt. Das bedeutet, dass die Zellen aller betrachteten Intervalle inhibiert werden und nicht nur die Population des letzten Intervalls.

4.4.2 Auswirkungen einer Stimulation durch Zytokine auf die Phagozytose von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen

In diesen Experimenten wurde versucht die Auswirkung einer Stimulation mit Zytokinen auf die Phagozytose-Aktivität von Mikroglia-Zellen zu ermitteln. Es wurde versucht die Stimulation für 1-3 Tage durchzuführen und die Aufnahme nach Addition des Inhibitors Mannan zu ermitteln, um Aussagen über die Aktivität des Mannose-Rezeptors machen zu können. Wie sich zeigte, war dies nicht möglich. Trotz mehrfacher Durchführung konnten für die Ansätze, denen Mannan zugesetzt wurde und im Falle des dritten Tages der Stimulation mit IFN- γ keine reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden. Dies ist sehr wahrscheinlich auf zwei Umstände zurückzuführen. Erstens kann der Grundaktivierungszustand der Zellen von Experiment zu Experiment variieren. Dies spielt dann eine große Rolle, wenn die Zellen stimuliert werden und dann unterschiedlich auf den Stimulus reagieren. Dies kann über längere Zeiträume betrachtet zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen, die nicht reproduzierbar sind (IFN- γ Tag 3). Zweitens war während der Durchführung dieser Experimenten ein Wechsel des Mannan-Stocks notwendig. Es ist bekannt, dass Mannan meist ein inhomogenes Gemisch aus unterschiedlich großen Fragmenten ist. Da verschiedene Bestandteile des Mannans unterschiedliche Reaktionen in Zellen auslösen können, könnte es durch den Wechsel des Mannan Stocks zu einer „veränderten Reaktion“ der Zellen gekommen sein (Domer et al. 1989). Eine Möglichkeit diese Probleme zu umgehen wäre, auch in diesem Fall eine Analyse mittels eines FACS-Scans durchzuführen. Dadurch könnte die ganze Prozedur beschleunigt werden, da das zeitintensive Auszählen unter dem Mikroskop entfiel. So könnte leichter eine sehr viel größere Anzahl von Zellen analysiert werden. Es wäre möglich die Unterschiede der verschiedenen Zellpräparationen auszugleichen und aufgrund der größeren Anzahl analysierter Zellen ein Bild, das der „durchschnittlichen“ Situation entspricht, zu erhalten. Die Durchführung dieser FACS-Analyse konnte im Rahmen

dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, wird im Labor von A. Régnier-Vigouroux allerdings vorbereitet.

Somit ist nur die Auswirkungen der Zytokin-Stimulation auf die gesamte Phagozytose in Mikroglia-Zellen zu sehen. Es kann nicht klar unterschieden werden, wie sich die Stimulation auf den Teil der Phagozytose auswirkt, der über den Mannose-Rezeptor vermittelt wird.

Wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, führt die Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- γ zu einer Steigerung der Phagozytose von *C. albicans*. Der stärkste Effekt ist nach Stimulation mit 50 U/ml zu sehen. Eine Erhöhung der Zytokin-Konzentration auf 100 U/ml führt zu einer leichten Abnahme des Aufnahme-Index. Marodi et al. (1993) konnte in Makrophagen eine maximale Stimulation der Phagozytose mit 100 U/ml IFN- γ beobachten. Es ist eine leichte Reduktion des Effektes des Zytokins mit Fortdauer der Stimulation zu beobachten, die allerdings nur schwach ist. Von Marodi et al. (1993) und Raveh et al. (1998) konnte ebenfalls eine erhöhte Aufnahme von *C. albicans* bzw. *S. cerevisiae* in IFN- γ stimulierten Makrophagen beobachten. Dies steht im Gegensatz zu Makrophagen, die durch Stimulation mit dem gleichen Zytokin eine insgesamt geringere Phagozytose-Aktivität aufweisen (Smith, 2001; von Zahn et al., 1997). In diesen Experimenten wurde allerdings die Phagozytose ohne die Beteiligung des Mannose-Rezeptors untersucht. Die Stimulation mit IFN- γ führt somit in Mikroglia-Zellen einen gegensätzlichen Effekt auf die über den Mannose-Rezeptor vermittelte und die davon unabhängige Phagozytose auf.

Von IL-4 ist bekannt, dass es in Makrophagen zu einer Erhöhung der Phagozytose-Aktivität führt (Smith et al., 1998). Wie sich in der vorliegenden Arbeit zeigte, führt IL-4 auch in Mikroglia-Zellen zu einer Erhöhung der Phagozytose (Abb. 3.32).

Am Tag 1 nach der Stimulation ist der größte Effekt bei einer Stimulation mit 125 U/ml zu beobachten. Am Tag 2 und Tag 3 nimmt der Effekt der Stimulation mit 125 U/ml ab. Am Tag 3 weisen die mit 125 U/ml stimulierten Zellen fast die gleiche Phagozytose-Aktivität auf, wie die unstimulierten Kontroll-Zellen. Die Stimulation mit 250 U/ml und 500 U/ml hingegen führt innerhalb der drei beobachteten Tage zu einer verstärkten Phagozytose. Beide Zytokin-Konzentrationen weisen sehr ähnliche Effekte auf.

Von Zahn et al. (1997) konnten eine durch IL-4 hervorgerufene Reduktion der Phagozytose-Aktivität in Mikroglia nachweisen, während Smith et al. (1998) keinen Effekt von IL-4 beobachten konnten. In den oben beschriebenen Experimenten wurde die Phagozytose von Myelin bzw. Latex-Kügelchen untersucht, d.h. der Mannose-Rezeptor war in diesen

Experimenten nicht an der Phagozytose beteiligt. Das bedeutet, IL-4 führt zu einer Abnahme der nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelten Phagozytose. In Anbetracht dieser Reduktion der nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelten Phagozytose durch IL-4 (von Zahn et al., 1997 ; Smith et al., 1998), bei einem Anstieg der gesamten Phagozytose von *C. albicans* (vgl. Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose nach IFN- γ Stimulation) und der stark erhöhten Expression des Mannose-Rezeptors nach IL-4 Stimulation, ist es allerdings wahrscheinlich, dass der Mannose-Rezeptor auch in diesem Fall verstärkt an der Phagozytose der Hefen beteiligt ist.

Vergleicht man den Effekt von IFN- γ und IL-4, so ist zu sehen, dass IL-4 zu einer stärkeren Erhöhung der Phagozytose von *C. albicans* führt. Dies steht in Gegensatz zu dem Ergebnis, das Raveh et al. (1998) in Makrophagen erhielt. Es ist allerdings bekannt, dass Zytokine unterschiedliche Auswirkungen auf die Phagozytose in Makrophagen und Mikroglia-Zellen haben können (Smith et al., 1998). In den hier durchgeführten Experimenten ist der Mannose-Rezeptor an der Aufnahme der Hefen beteiligt, da nach der Addition von Mannan eine Reduktion der Phagozytose zu beobachten ist (nicht dargestellt). Auch wenn keine direkten Aussagen darüber gemacht werden können, wie sich die Stimulation auf die durch den Mannose-Rezeptor vermittelte Phagozytose auswirkt, ist es doch wahrscheinlich, dass es in den untersuchten Fällen zu einer erhöhten Aktivität des Mannose-Rezeptors kommt. Um dies zu klären, sind weiterführende Experimente (mittels FACS) nötig, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr durchgeführt werden konnten.

4.5 Aktivierung von Mikroglia-Zellen durch ein Pathogen

4.5.1 Modulation der MHC-II-Expression

Je nach Spezies exprimieren Mikroglia-Zellen *in vivo* und *in vitro* MHC-II immer, oder nur nach einer vorherigen Stimulation mit IFN- γ oder anderen Zytokinen (Hayes et al., 1987). Bei der Präsentation von Antigenen spielt MHC-II die zentrale Rolle, da die Antigene nur erkannt werden wenn sie auf MHC-II präsentiert werden. Die außerdem benötigten co-stimulatorischen Moleküle wurden in dieser Arbeit außer acht gelassen. Es wurde nur untersucht, ob die verwendeten Zellen MHC-II exprimieren und ob diese Expression durch *C. albicans* und Mannan moduliert werden kann.

Da bekannt ist, dass Mikroglia-Zellen nach einer Stimulation mit IFN- γ verstärkt MHC-II exprimieren (Woodrooffe et al. 1989; Gresser et al., 2000), wurden mit IFN- γ stimulierte Zellen als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, kommt es nach zwei Tagen zu einer deutlich höheren MHC-II-Expression in den mit IFN- γ stimulierten Zellen, während am Tag 1 nur ein kleiner Unterschied zu den Kontroll-Zellen zu beobachten ist. Die Addition von *C. albicans* führt zu keiner erhöhten Expression von MHC-II. Die Zugabe von Mannan führt hingegen zu einer Abnahme der MHC-II-Expression. Die verwendeten Mikroglia-Zellen exprimieren (*in vitro*) sehr geringe Mengen an MHC-II. Diese Menge wird durch die Gabe von Mannan noch weiter herunterreguliert. Yera et al. (2001) konnten beobachten, dass Mannan im Serum von Patienten 2 – 15 Tage vor *C. albicans* nachweisbar ist. Denkbar wäre somit, dass *C. albicans* Mannan freisetzt und dadurch die Aktivität oder zumindest die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation der Zellen beeinflusst, die unter normalen Umständen eine Infektion des Körpers verhindern.

Ob das Signal zur Reduktion der MHC-II Expression allerdings direkt durch den Mannose-Rezeptor gegeben wird, ist nicht zu sagen. Die Gabe von *C. albicans* führt zwar zu keiner Änderung der Expressionsrate, deshalb kann man eine Rolle des Mannose-Rezeptors allerdings nicht ausschließen. Der Mannose-Rezeptor nutzt unterschiedliche Signaltransduktionswege, abhängig davon, ob er Endozytose oder Phagozytose auslöst. Denkbar wäre allerdings auch, dass das Mannan die Expression von MHC-II über andere Mechanismen reduziert. Dies zu klären wären noch weitere Experimente nötig, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr durchgeführt werden konnten.

4.5.2 Freisetzung von Zytokinen nach Zugabe von Mannan und *C. albicans*

Es ist bekannt, dass Mikroglia-Zellen nach Aktivierung zur Produktion und Sezernierung von Zytokinen befähigt sind (Gehrmann et al., 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Addition von Mannan und *C. albicans* auf die Ausschüttung von IFN- γ , IL-12 und TNF- α hat. Da diese Zytokine an der Etablierung einer Inflammation bzw. an der Aktivierung von Mikroglia-Zellen beteiligt sind, sollte untersucht werden, ob Mikroglia-Zellen diese Zytokine selbst sezernieren können. Von Makrophagen ist bekannt, dass die Gabe von Mannan zu einer Freisetzung von TNF- α führt und das daran wahrscheinlich der Mannose-Rezeptor beteiligt ist (Stein et al., 1991; Garner et al., 1994). Die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Phagozytose (in der vorliegenden Arbeit durch

die Gabe von *C. albicans*) führt in Makrophagen zur Freisetzung von IL-12 (Shibata et al., 1997). Daher wurden die Zellen mit Hefen, Mannan oder reinem Medium versetzt.

Wie in Tabelle 3.8 zu sehen, schütten die Zellen unter keinen der getesteten Bedingungen IFN- γ aus. Die Expression von IFN- γ durch Mikroglia-Zellen wurde bisher nur selten beschrieben (Shibata et al., 1997; Cannella und Raine, 1995).

Die Gabe von *C. albicans* bzw. Mannan führt in Mikroglia-Zellen zu einer Freisetzung von IL-12 und TNF- α . Unter allen getesteten Bedingungen wurde vergleichsweise mehr TNF- α ausgeschüttet. In den Zellen die mit Hefen bzw. Mannan versetzt wurden, nimmt die TNF- α Freisetzung mit der Zeit zu, die IL-12 Freisetzung sinkt hingegen ab. Bei beiden Zytokinen kann eine vergleichsweise erhöhte Freisetzung beobachtet werden, wenn die Zellen mit Mannan versetzt wurden.

Die Mikroglia-Zellen, die in reinem Medium gehalten wurden, schütten kein IL-12 aus. In diesen Kontroll-Zellen kann allerdings die Sekretion von TNF- α nachgewiesen werden. Diese Freisetzung von TNF- α unter normalen Kulturbedingungen deutet darauf hin, dass die verwendeten Mikroglia-Zellen leicht aktiviert sind (dafür spricht auch die MHC-II Expression). Die Sekretion von TNF- α in den Kontroll-Zellen bleibt über die drei analysierten Tage gleich.

Die Fähigkeit der Mikroglia-Zellen auf Kontakt mit einem Pathogen bzw. Teilen davon mit der Sekretion von Zytokinen zu reagieren, spricht für eine Rolle dieser Zellen bei der Immunantwort. Das ausgeschüttete IL-12 spielt eine Schlüsselrolle bei der Etablierung einer inflammatorischen Immunantwort. TNF- α wirkt auf die Mikroglia-Zellen selbst zurück, es könnte sich also um einen positiven Feedback-Loop handeln, der zu einer weiteren Aktivierung der Mikroglia-Zellen führt. Durch das TNF- α wird außerdem die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst, wodurch die Mikroglia-Zellen zur Rekrutierung von Lymphozyten beitragen könnten (Merrill und Benveniste, 1996). Inwieweit dies allerdings *in vivo* eine Rolle spielt, ist fraglich.

Aus den durchgeführten Experimenten lassen sich keine Aussagen darüber treffen, inwieweit der Mannose-Rezeptor direkt an der Modulation der Expression und Ausschüttung der Zytokine beteiligt ist. Von Yamamoto et al. (1997) konnte die Beteiligung des Mannose-Rezeptors an der Produktion von IL-6, IL-1 β und GM-CSF nachgewiesen werden. In Makrophagen konnten Shibata et al. (1997) eine Rolle des Mannose-Rezeptors bei der Freisetzung von IL-12 und IFN- γ nachweisen. Diese Ergebnisse und der Umstand, dass beide Liganden über den Mannose-Rezeptor aufgenommen werden, machen eine Rolle des Mannose-Rezeptors bei der Freisetzung von TNF- α und IL-12 durch Mikroglia-Zellen sehr

wahrscheinlich. Wenn der Mannose-Rezeptor selbst in den hier untersuchten Fällen kein entscheidendes Signal gibt, so könnte er durch die Erhöhung der Liganden-Konzentration innerhalb der Zelle eine entscheidende Rolle spielen. Da die Zellen nur 45 min mit den Hefen bzw. dem Mannan versetzt waren, würden sie ohne eine Beteiligung des Mannose-Rezeptors eine geringere Menge der Hefen bzw. des Mannans aufnehmen. Diese quantitativen Unterschiede könnten zu anderen Effekten führen. Über diesen Ansatz ist es somit nicht möglich genaue Aussagen über die Art der Beteiligung des Mannose-Rezeptors zu treffen. Es kann trotzdem von einer Rolle des Mannose-Rezeptors gesprochen werden.

Um diese genauer zu klären, wären Zellen nützlich, deren Gen für den Mannose-Rezeptor nicht mehr exprimiert wird. Doch auch in diesem Fall können nur begrenzte Aussagen über die Beteiligung des Mannose-Rezeptors getroffen werden, wenn die Menge des aufgenommenen Stoffes die Schlüsselrolle spielt.

4.6 Etablierung der Kultur von Hirnschnitten

Mittels Gewebekulturen von Gehirnschnitten wäre es möglich ein Milieu zu schaffen, in dem die Mikroglia-Zellen in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen. Diese Technik wurde bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt, um Zellen des Gehirns näher in ihrer Funktion zu untersuchen (Stoppini et al. 1991; Hailer et al., 1996).

Es ergaben sich Probleme bei der Färbung der Mikroglia-Zellen und auch das Signal des Mannose-Rezeptors war sehr schwach. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Mikroglia-Zellen in ihrem verzweigten, ruhenden Zustand vorliegen, in dem die Expression der meisten Marker stark reduziert ist (Aloisi, 2001), so auch die Expression von CR3(=Mac-1) (Akiyama und McGeer, 1990). Es wäre somit denkbar, dass die Marker und der Mannose-Rezeptor nach einer Manipulation am Schnitt, die ein pathogenes Ereignis simuliert, stärker exprimiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die Färbung gegen den neuronalen MAP-2 und den Astrozyten Marker GFAP zeigte, dass die zelluläre Architektur der Schnitte intakt blieb (Abb. 3.35). Bekanntermaßen kommt es durch einen massiven Eingriff, wie ihn das Anfertigen der Schnitte darstellt, zu einer Proliferation von Astrozyten (Narbenbildung). Diese scheint allerdings kein Problem darzustellen, wenn die Schnitte für längere Zeit in Kultur gehalten werden. Mit Fortdauer der Kultur scheint es zu einer Zunahme des Verknüpfungsgrades der Neuronen untereinander zu kommen. Dies bedeutet, dass die Neuronen durch das Anfertigen des Schnittes nicht irreversibel geschädigt werden und absterben.

Wie geeignet die Schnittkulturen für weiterführende Untersuchungen der Aktivität von Mikroglia-Zellen sind, lässt sich mit den erhaltenen Daten nicht sagen. Im Labor von A. Régnier-Vigouroux werden weiterführende Experimente durchgeführt, welche die Eignung dieses Modells näher untersuchen sollen.

4.7 Schlußwort

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die Mikroglia-Zellen eine Rolle als immunkompetente Zellen spielen. Sie sind dazu fähig, kleinere Liganden über Endozytose und größere Partikel über Phagozytose aufzunehmen. Die Zellen reagieren auf Zytokin-Stimulation mit einer Änderung ihrer Aufnahme-Aktivität. Sie können zudem ihre Anzahl aufgrund einer Stimulation mit Zytokinen erhöhen. Dies könnte bei einer Infektion des Gehirns in frühen Phasen eine entscheidende Rolle spielen. Durch den Kontakt mit Pathogenen bzw. Teilen davon werden die Mikroglia-Zellen zur Sekretion wichtiger Mediatoren angeregt, die eine entscheidende Rolle beim weiteren Verlauf einer Immunantwort spielen.

Zum ersten Mal wurde die Rolle des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen in diesem Ausmaß untersucht und die erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass dieser Rezeptor unter bestimmten pathologischen Konditionen eine Schlüsselrolle einnehmen könnte. Seine Expression und Aktivität kann ebenfalls durch Zytokine beeinflusst werden, wodurch eine Modulation der Aktivität der Mikroglia-Zellen erreicht werden könnte. Der Mannose-Rezeptor ermöglicht es den Zellen auch geringe Mengen an Liganden sehr effektiv aufzunehmen bzw. die Aufnahme mannosylierter Partikel stark zu erhöhen. Es ist bekannt, dass der Mannose-Rezeptor an der Modulation der Zytokin-Freisetzung / -Expression beteiligt sein kann. Da die Gabe von Liganden dieses Rezeptors in Mikroglia-Zellen zur Freisetzung von Zytokinen führt, könnte der Mannose-Rezeptor auch in diesem Zelltyp eine solche Funktion übernehmen.

Um die tatsächliche Rolle der Mikroglia-Zellen bei einer Immunantwort im ZNS und die Beteiligung des Mannose-Rezeptors daran zu bestimmen, sind *ex* und *in vivo* Experimente nötig. Doch die hier erhaltenen und andere Ergebnisse sprechen bereits dafür, dass die Mikroglia-Zellen und der Mannose-Rezeptor in Zukunft nicht nur das wissenschaftliche Interesse weiter wecken, sondern auch eine Relevanz bei der Therapie von Erkrankungen des Gehirns erhalten werden.