

3. Ergebnisse

3.1 Proliferation von Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen

Es ist bekannt, dass Zellen des Immunsystems aufgrund einer Stimulation mit Zytokinen proliferieren können. Dies spielt gerade im Falle der Mikroglia-Zellen eine große Rolle, da ihre Zahl im Gehirn limitiert ist. Diese Zellen befinden sich normalerweise in einem Ruhezustand und müssen zuerst aktiviert werden. Bei „größeren“ pathologischen Ereignissen kann beobachtet werden, dass es zu einer Einwanderung von Monozyten/Makrophagen kommt. Diese Invasion des Gehirns durch Immunzellen kann allerdings schädigende Wirkungen auf das Gewebe haben. Es sollte ermittelt werden, ob Mikroglia-Zellen aufgrund von Zytokin-Stimulationen proliferieren und somit prinzipiell in der Lage sind mit „kleineren“ immunologischen Herausforderungen fertig zu werden, indem sich ihre Anzahl erhöht.

In diesen Experimenten ging es darum das proliferative Verhalten von Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zu bestimmen.

Mikroglia-Zellen wurden mit Zytokin stimuliert und nach Ablauf von 1-3 Tagen wurde die Proliferation der Zellen mittels des nicht-radioaktiven Proliferationsassays von Promega bestimmt. Dabei handelt es sich um einen colorimetrischen Assay, bei dem das Substrat von zellulären Dehydrogenasen umgesetzt wird, das dann seine Absorption ändert. Die Absorption ist bei 492 nm der Zahl der lebenden Zellen direkt proportional. Somit ist es möglich durch Bestimmung der Absorption direkt auf die Zellzahl zurückzuschließen.

Die Mikroglia-Zellen proliferieren unter den Kulturbedingungen nur innerhalb der ersten beiden Wochen stark, während denen sie in konditioniertem Medium gehalten werden. Danach ist nur eine leichte, langsame Proliferation zu beobachten. Die hier verwendeten Zellen waren mindestens drei Wochen alt und proliferierten nur langsam. Außerdem wurden die Zellen vor jedem Versuch unter dem Mikroskop betrachtet, um ein eventuelles massives Absterben der Zellen zu erkennen. Dies wurde nicht beobachtet. Da die Proliferation in Bezug zur unstimulierten Kontrolle errechnet wurde, ist diese in den ermittelten Proliferationen nicht mehr vorhanden.

3.1.1 Proliferation nach Stimulation mit IFN- γ

Die Zellen wurden mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- γ für 1-3 Tage stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert, aber ansonsten gleich behandelt wurden.

IFN- γ wurde in den Konzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 U/ml eingesetzt. Die Stimulation erfolgte nicht mit höheren Zytokin-Konzentrationen, da in unserem Labor ein zytotoxischer Effekt von höheren IFN- γ beobachtet wurde.

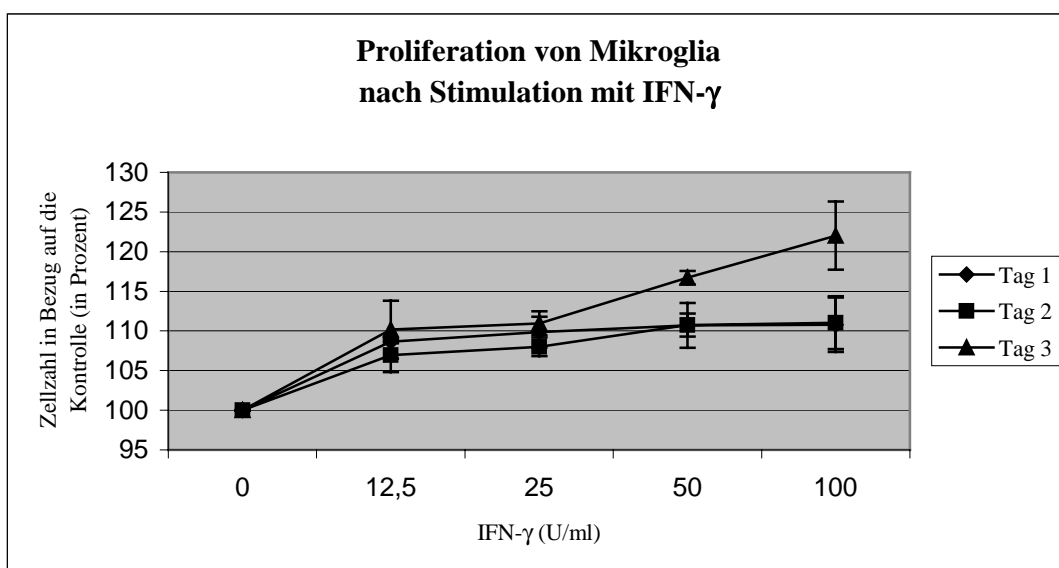


Abb. 3.1: Mikroglia wurden für 1-3 Tage mit verschiedenen Konzentrationen IFN- γ (12,5, 25, 50 und 100 U/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Zytokin zugesetzt wurde, die aber ansonsten gleich behandelt wurden. Die Zellzahl wurde durch Messung der Absorption bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte nach 20, 40, 60 und 80 Minuten. Pro Messung wurden für jede IFN- γ Konzentration 10 Wells gemessen. Die Zellzahl der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Die anderen Werte wurden gemittelt und dann in Relation zur Absorption der Kontrolle gesetzt. Die Werte wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen. Der Standardfehler ist für zwei unabhängige Experimente angegeben.

Bereits die Stimulation mit 12,5 U/ml IFN- γ führt in Mikroglia-Zellen zu einer Zunahme der Zellzahl um ~7,5 % (Abb. 3.1). Eine Erhöhung der Zytokin-Konzentration führt innerhalb der ersten beiden Tage nach Stimulation nur zu einem geringen weiteren Anstieg der Proliferation um weitere ~2,5 %.

Drei Tage nach der Stimulation kann beobachtet werden, dass es ab einer IFN- γ Konzentration von 50 U/ml zu einer höheren Proliferation als während der ersten beiden Tage (~5 % bzw. ~10 % mehr als am Vortag) kommt.

Die Stimulation mit IFN- γ führt in Mikroglia-Zellen zu einer maximalen Proliferation um ~22 % (3 Tage Stimulation, 100 U/ml). Eine Konzentrationsabhängigkeit ist erst am Tag 3 zu erkennen.

3.1.2 Proliferation nach Stimulation mit IL-4

3.1.2.1 Stimulation mit IL-4 (0 U/ml bis 500 U/ml)

In unserem Labor wurde bereits die Proliferation von Astrozyten nach Stimulation mit IL-4 bestimmt. Dabei führte die Stimulation mit 500 U/ml IL-4 zum höchsten Effekt, weshalb IL-4 auch in dieser Arbeit bis zu dieser hohen Konzentration eingesetzt wurde.

Um die proliferative Antwort von Mikroglia-Zelle zu bestimmen, wurden die Zellen mit 62.5 U/ml, 125 U/ml, 250 U/ml und 500 U/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Zytokin zugesetzt, die aber ansonsten gleich behandelt wurden. Die Proliferation wurde nach 1-3 Tagen bestimmt.

Die Stimulation mit IL-4 bei Konzentrationen bis 500 U/ml führt zu einer starken Proliferation der Mikroglia-Zellen (Abb. 3.2).

Tag 1 nach der Stimulation ist kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Zytokin-Konzentrationen zu sehen. Die Proliferation nimmt bei allen Zytokin-Konzentrationen um ~35 % zu.

Nach 2 bzw. 3 Tagen ist eine Abhängigkeit von der Zytokin-Konzentration zu beobachten, da es zwischen 62.5 und 250 U/ml zu einer weiteren Zunahme (~25 % Tag 2 bzw. ~47 % Tag 3) der Zellzahl kommt. Zwischen 250 U/ml und 500 U/ml ist kein weiterer Anstieg der Proliferation mehr zu beobachten. Es kann sogar zu einer leichten Reduktion der Zellzahl kommen.

Vergleicht man das Profil nach 3 Tagen Stimulation mit dem von 2 Tagen, zeigt sich, dass es zu keinen nennenswerten Abweichungen kommt. Die Proliferationsrate liegt hier jedoch bei allen Konzentrationen vergleichsweise höher (zwischen 15-30 %). Die maximale Proliferationsrate (~94 %) ist nach einer Stimulation mit 250 U/ml IL-4 zu beobachten.

IL-4 besitzt sowohl einen zeit-, als auch einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferation in Mikroglia-Zellen.

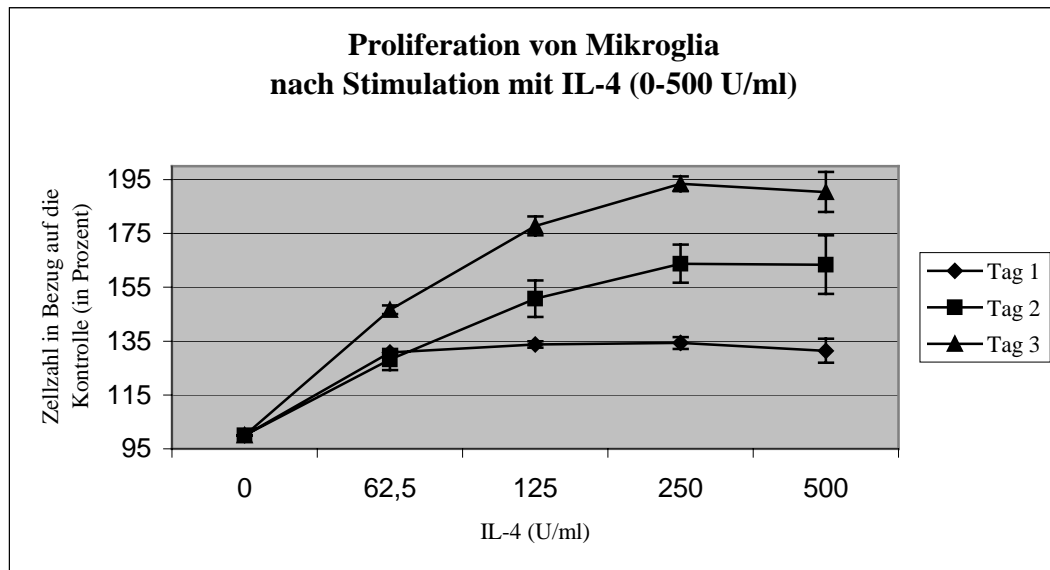


Abb. 3.2: Mikroglia wurden für 1-3 Tage mit verschiedenen IL-4 Konzentrationen (62,5, 125, 250 und 500 U/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert, aber ansonsten gleich behandelt wurden. Nach der Stimulation wurde die Zellzahl colorimetrisch bestimmt. Die Messung erfolgt nach 20, 40, 60 und 80 Minuten. Pro Messung wurden je 10 Wells der verschiedenen Ansätze gemessen, die Werte wurden gemittelt und dann in Relation zur Absorption der Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die Werte wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

3.1.2.2 Stimulation mit IL-4 (0 U/ml bis 100 U/ml)

Die Zellen wurden auch mit niedrigeren IL-4 Konzentrationen stimuliert, um zu sehen, welche Effekte bei diesen geringeren Konzentrationen zu beobachten sind.

Die Zellen wurden für 1-2 Tage mit IL-4 stimuliert. IL-4 wurde in Konzentrationen von 12,5 U/ml, 25 U/ml, 50 U/ml und 100 U/ml eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert, aber ansonsten gleich behandelt wurden.

Der Effekt von IL-4 auf die Proliferation der Mikroglia-Zellen ist bei Konzentrationen bis zu 100 U/ml direkt abhängig von der Zytokin-Konzentration (Abb. 3.3). Abgesehen von den Werten bei 50 U/ml verläuft die Proliferation innerhalb der ersten beiden Tage nach der Stimulation gleich. Der maximale Effekt wird bei Stimulation mit 100 U/ml erreicht und liegt im beobachteten Zeitraum bei einer Zunahme um ~32 %, im Vergleich zur Kontrolle.

Es ist bei Konzentrationen von bis zu 100 U/ml IL-4 innerhalb der ersten beiden Tage kein zeitabhängiger Effekt zu beobachten.

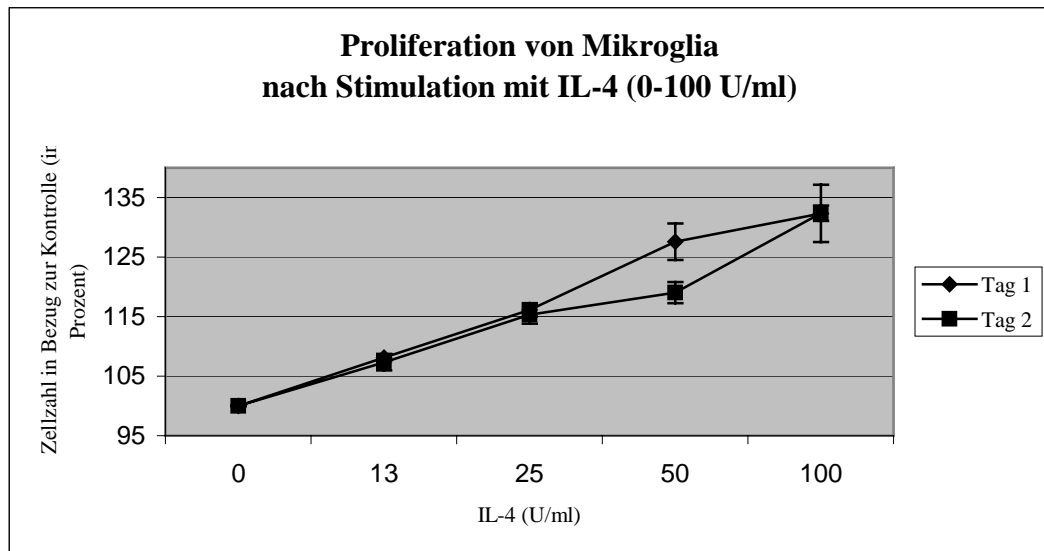


Abb. 3.3: Mikroglia wurden für 1-2 Tage mit verschiedenen Konzentrationen IL-4 (12.5, 25, 50 u. 100 U/ml) stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Zellzahl colorimetrisch bestimmt. Die Messung erfolgt nach 20, 40, 60 und 80 Minuten. Pro Messung wurden für jede IL-4 Konzentration die Absorption von je 10 Wells gemessen. Die Werte wurden gemittelt (Standardfehler angegeben) und dann in Relation zur Absorption der Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die Werte wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

3.1.3 Vergleich der Proliferation von Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ und IL-4

Vergleicht man den Effekt von IFN- γ und IL-4 auf die Proliferation von Mikroglia-Zellen, so sieht man, dass IL-4 bereits bei Konzentrationen bis 100 U/ml zu einer vergleichsweise höheren Proliferation führt (~22 % mit IFN- γ im Vergleich zu ~32 % mit IL-4). Bei höheren Konzentrationen von IL-4 kann es im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer Zunahme von bis zu ~94 % kommen (3 Tage 250 U/ml).

Zusammenfassung:

Zytokin	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Zeitabhängig	Konzentrationsabhängig
IFN- γ (0-100 U/ml)	↑	↑	↑	Ab 50 U/ml, nach 2 Tagen	Ab 50 U/ml und nach 2 Tagen
IL-4 (0-100 U/ml)	↑	↑	n.d.	Nein	Ja
IL-4 (0-500 U/ml)	↑	↑↑	↑↑↑	Ja	Ja, bis 250 U/ml

Tab. 3.1: Effekt von IFN- γ und IL-4 auf die Proliferation von Mikroglia-Zellen.

3.2 Mannose-Rezeptor Expression in Mikroglia-Zellen nach Zytokin-Stimulation

3.2.1 Analyse der gesamten Expression (intrazellulär und auf der Zelloberfläche)

Es ist bekannt, dass die Expressionsrate des Mannose-Rezeptors in Makrophagen durch Zytokine beeinflusst werden kann. Dies bedeutet, dass diese Zellen in ihrer Funktionalität (hier in Bezug auf Mannose-Rezeptor) je nach Milieu und Art der Immunantwort unterschiedlich reagieren. Von der Anzahl der Mannose-Rezeptoren kann zwar kein direkter Rückschluss auf die Aktivität des Rezeptors erfolgen. Es sollte jedoch geklärt werden, ob die Expression des Mannose-Rezeptors auch in Mikroglia durch Zytokine beeinflusst werden kann.

Dies wäre ein weiteres Indiz dafür, dass Mikroglia-Zellen als immunkompetente Zellen funktionieren und den Makrophagen ähnliche Aufgaben übernehmen könnten.

Die Stimulation mit Zytokin erfolgte für 1-3 Tage. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Mittels Western-Blot-Analyse wurde der Gehalt an Mannose-Rezeptor der verschiedenen Ansätze analysiert. Die Auswertung erfolgte nach digitaler Bilderfassung des Films mittels Bestimmung der optischen Dichte (NIH-Image software) am PC.

3.2.1.1 Analyse der Mannose-Rezeptor Expression nach Stimulation mit IFN- γ

In diesen Experimenten sollte der Effekt des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ auf die Expression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen dokumentiert werden. Die Zellen wurden dazu mit 25 U/ml, 50 U/ml und 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle dienen Zellen, die nicht mit Zytokin behandelt wurden. Die Stimulation erfolgte für 1-3 Tage. Danach wurden die Zellen mehrfach gewaschen, lysiert und mittels Western-Blot Analyse analysiert.

In Abb. 3.4 ist ein typischer Western-Blot zu sehen. Bereits am Tag 1 nach der Stimulation mit IFN- γ ist eine Reduktion der Mannose-Rezeptor Menge in Mikroglia-Zellen zu beobachten. Diese Reduktion nimmt mit steigender Zytokin-Konzentration zu. Ein zeitabhängiger Effekt ist nicht zu sehen.

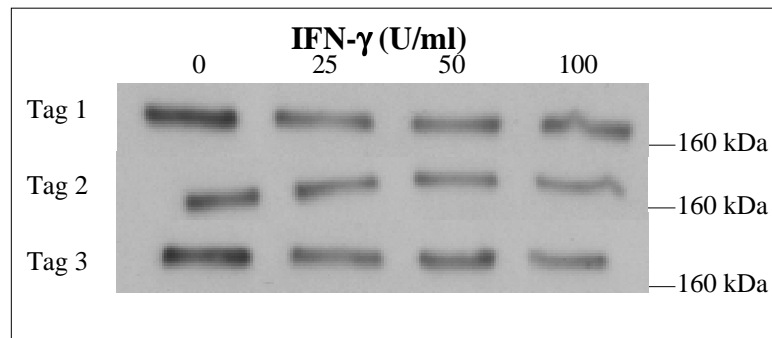


Abb. 3.4: **Western-Blot Analyse der Mannose-Rezeptor Expression nach IFN γ -Stimulation.** Mikroglia-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen IFN- γ (25, 50 u. 100 U/ml) für 1-3 Tage stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Die Zellen wurden lysiert, der Proteingehalt der Lysate wurde bestimmt und je 5 μ g Protein wurden auf ein 6 %iges SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion des Mannose-Rezeptors erfolgte mit dem polyklonalen α -Mannose-Rezeptor Antikörper. Der Primärantikörper wurde mittels eines α -Kanninchen Antikörpers gekoppelt an HRP detektiert. Die HRP-Aktivität wurde mit dem ECL-Assays nachgewiesen. Die einzige Bande lief bei einer Größe von ~172 kDa. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot.

Um mehrere Experimente miteinander quantitativ vergleichen zu können, wurden die belichteten Filme digital gescannt, die Intensität der Banden wurde ermittelt und verrechnet (Abb. 3.5).

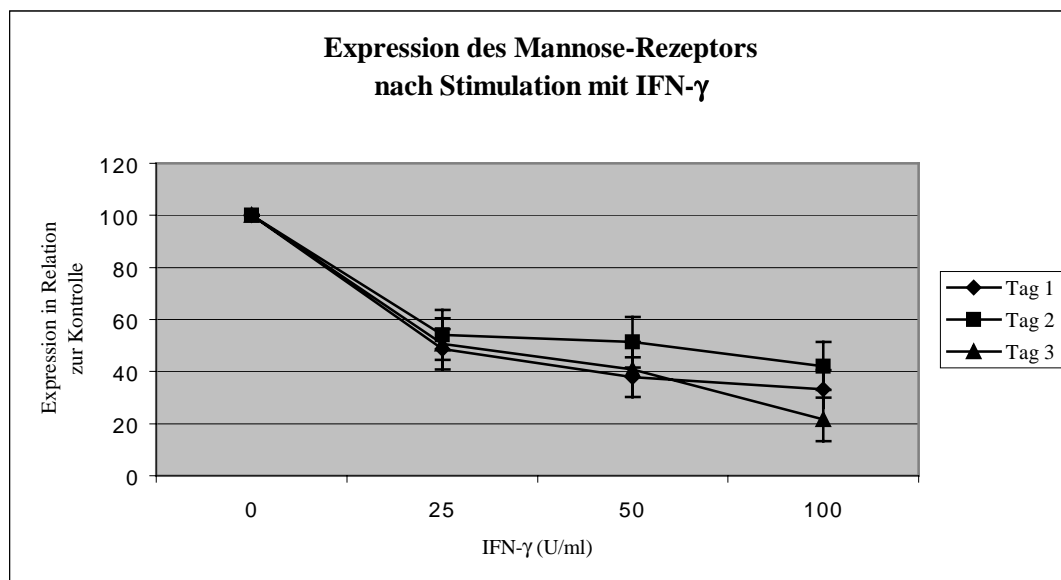


Abb. 3.5: Die Stimulation mit IFN- γ und die Western-Blot Analyse wurden wie in Legende 3.4 durchgeführt. Die Dichte der Banden mehrerer Western-Blots wurden digital quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und dann in Bezug zur Kontrolle (= 100 %) angegeben und gegen die IFN- γ Konzentration aufgetragen. Pro Western-Blot erfolgte eine Doppelbestimmung, es wurden sechs unabhängige Experimente analysiert. Der Standardfehler ist angegeben.

Wie aus Abbildung 3.5 zu ersehen ist, führt eine Erhöhung der IFN- γ Konzentration zu einer zunehmenden Reduktion der Expression des Mannose-Rezeptors. Es ist eine direkte Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten.

Die Dauer der Stimulation scheint innerhalb der ersten drei Tage keinen signifikanten Einfluss auf die Expressionsrate des Mannose-Rezeptors zu haben. Dies bedeutet, dass der Effekt des Zytokins über eine Dauer von drei Tagen anhält.

3.2.1.2 Analyse der Mannose-Rezeptor Expression nach Stimulation mit IL-4

Der Effekt des anti-inflammatorischen Zytokins IL-4 auf die Proliferation von Mikroglia-Zellen sollte bestimmt werden.

Hierzu wurden Mikroglia-Zellen für 1-3 Tage mit IL-4 stimuliert. IL-4 wurde in den Konzentrationen 125 U/ml, 250 U/ml und 500 U/ml eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert, aber ansonsten gleich behandelt wurden.

Nach der Stimulation wurden die Zellen mehrfach gewaschen, lysiert und dann mittels Western-Blot Analyse auf ihren Mannose-Rezeptor Gehalt analysiert. Dabei wurden gleiche Mengen an Protein für die stimulierten Ansätze geladen, die Kontrollen wurden in 5-fach höherer Konzentration geladen.

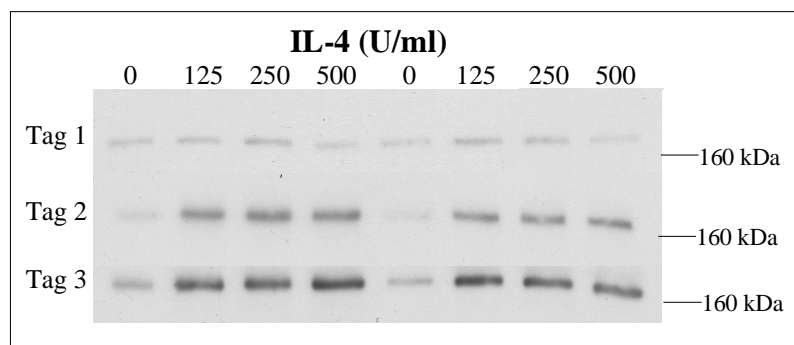


Abb. 3.6: **Western-Blot Analyse der Mannose-Rezeptor Expression nach IL-4-Stimulation.** Mikroglia-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an IL-4 (125, 250 u. 500 U/ml) für 1-3 Tage stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Zytokin zugesetzt wurde. Die Zellen wurden lysiert, der Proteingehalt der Lysate wurde bestimmt und jeweils 1 μ g Protein für die stimulierten Ansätze bzw. 5 μ g für die Kontrollen auf ein 6 %iges SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden danach elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen α -Mannose-Rezeptor Antikörper. Der Primärantikörper wurde mittels eines α -Kanninchen Antikörpers gekoppelt an HRP detektiert. Die HRP-Aktivität wurde mit dem ECL-Assays nachgewiesen. Die einzige Bande lief bei einer Größe von \sim 172 kDa. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot.

Die Stimulation mit IL-4 führt in Mikroglia-Zellen zu einer starken Zunahme der Menge an Mannose-Rezeptor. Es ist ein zeitabhängiger Effekt zu sehen (siehe Abb. 3.6). Um mehrere Experimente quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden die Filme eingescannt, die optische Dichte der Banden wurde elektronisch ermittelt und verrechnet (Abb. 3.7). Die Quantifizierung der Filme verschiedener Western-Blots ergab eine sehr starke Zunahme der Mannose-Rezeptor Konzentration (= optische Dichte der Banden) schon bei der niedrigsten getesteten Zytokin-Konzentration (im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle). Diese lag zwischen 200 % und bis zu ~6000 %. Diese starken Schwankungen ermöglichten keinen direkten Vergleich der einzelnen Experimente, wenn sie in Relation zur Kontrolle gesetzt wurden. Diese Schwankungen waren zwischen den Banden der stimulierten Ansätze nicht zu sehen. Daher wurde die Expressionsrate in Relation zu den Ansätzen dargestellt, die mit 125 U/ml stimuliert waren (=100 %). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

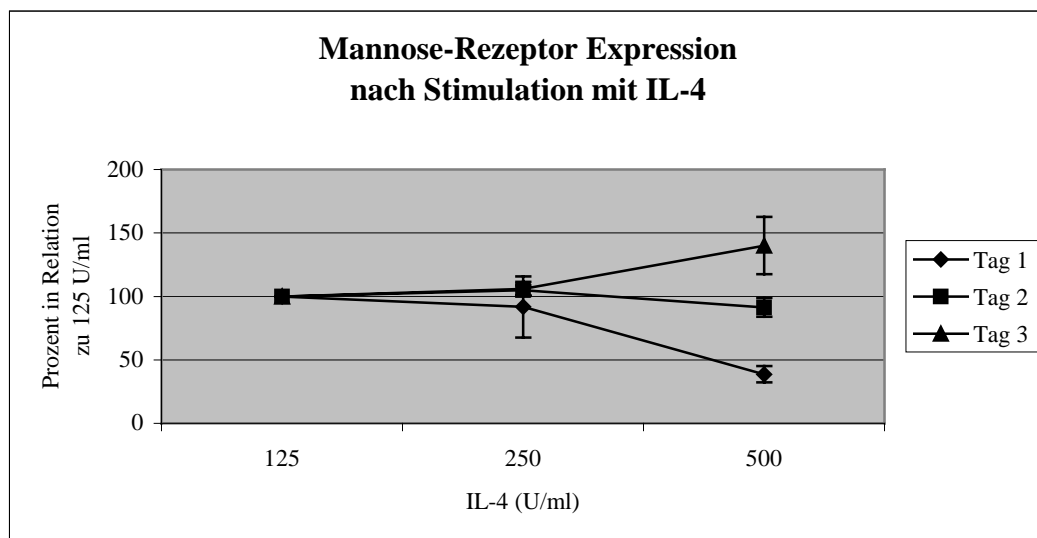


Abb. 3.7: Die Stimulation mit IL-4 und der Western-Blot wurde wie in Legende 3.6 beschrieben durchgeführt. Die Dichte der Banden mehrer Western-Blots wurden digital quantifiziert. Da es innerhalb der verschiedenen Experimente zu sehr starken Schwankungen der Zunahme nach Stimulation kam (vgl. oben), wurden die erhaltenen Werte gemittelt, dann in Bezug zu den mit 125 U/ml stimulierten Ansätze (= 100 %) angegeben und gegen die IL-4 Konzentration aufgetragen. Pro Western-Blot erfolgte eine Doppelbestimmung, es wurden sechs unabhängige Experimente analysiert. Der Standardfehler ist angegeben.

Zwischen 125 U/ml und 250 U/ml ist an allen drei Tagen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Bei dieser Konzentration ist kein zeitabhängiger Effekt des Zytokins zu beobachten.

Die Stimulation mit 500 U/ml IL-4 führt zu einer zeitabhängigen Änderung der Expressionsrate des Mannose-Rezeptors. Tag 1 nach der Stimulation exprimieren die Zellen

deutlich weniger (~62 %) Rezeptor, als die, die mit 125 U/ml bzw. 250 U/ml stimuliert wurden.

Diese Reduktion nimmt nach zwei Tagen Inkubation deutlich ab. Es sind nun nur noch ~9 % weniger im Vergleich zu den anderen Ansätzen. Dieser Unterschied könnte auch nur eine experimentelle Variation widerspiegeln.

Tage 3 nach der Stimulation mit 500 U/ml IL-4 exprimieren die Zellen deutlich mehr Mannose-Rezeptor (~40 %), als die Zellen, die mit 125 U/ml bzw. 250 U/ml stimuliert wurden. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist zu erkennen.

In allen Fällen ist jedoch eine sehr deutlich höhere Expression als in den Kontrollen zu sehen.

Zusammenfassend:

Zytokin-Konzentration	Zeitabhängig im Vergleich zur Kontrolle	Zeitabhängig im Vergleich zu 125 U/ml	Effekt im Vergleich zur Kontrolle	Konzentrationsabhängig im Vergleich zu 125 U/ml
125 U/ml	↑↑↑		↑↑↑	
250 U/ml	↑↑↑	Nein	↑↑↑	Nein
500 U/ml	↑↑↑	Ja	↑↑↑	Ja

Tab. 3.2 : Auswirkung der Stimulation mit IL-4 auf die Expression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen

3.2.1.3 Vergleich der Expression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ und IL-4

Vergleicht man den Effekt von IFN- γ und IL-4 auf die Expression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen, so sieht man, dass IL-4 zu einer starken Erhöhung der Menge an Mannose-Rezeptor führt. IFN- γ hingegen führt zu einer Reduktion der Rezeptor-Menge .

Zusammenfassend:

Zytokin	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Zeitabhängig	Konzentrationsabhängig
IFN- γ (0–100 U/ml)	↓↓	↓↓	↓↓	Nein	Ja
IL-4 (0–500 U/ml)	↑	↑↑	↑↑↑	Ja	Nein Ja (500 U/ml)

Tab. 3.3: Effekt von IFN- γ und IL-4 auf die Expression des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen.

3.2.2 Ermittlung der Konzentration des Mannose-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Mikroglia-Zellen und Makrophagen

Es ist bekannt, dass die Menge eines Rezeptors in Zellen keinen direkten Rückschluss auf die Aktivität des Rezeptors zulässt.

Hier ging es darum, nicht die gesamte Menge des Mannose-Rezeptors zu ermitteln (wie dies mit einer Western-Blot Analyse möglich ist). Es sollte bestimmt werden, wie viel Mannose-Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Dadurch wäre es möglich Aussagen über die Aktivität des Mannose-Rezeptors zu machen, wenn man diesen Wert in Bezug zur Gesamtkonzentration des Rezeptors setzt.

Hierzu wurden Mikroglia-Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet und mittels des α -Mannose-Rezeptor Antikörpers gefärbt. Die Konzentration des Antikörpers wurde variiert. Als Negativkontrolle dienten Antikörper des gleichen Isotyps.

Die Analyse mittels FACS-Scan ergab bei allen getesteten Antikörper-Konzentrationen kein Signal, das signifikant über der Fluoreszenz der Negativkontrolle lag.

Da bekannt ist, dass Makrophagen unter normalen Umständen mehr Mannose-Rezeptor exprimieren, als Mikroglia-Zellen, wurden peritoneale Makrophagen aus Mäusen isoliert. Diese wurden wie die Mikroglia-Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet. Auch in diesem Fall erfolgte eine Titration des Primär-Antikörpers.

Die Analyse am FACS ergab jedoch auch für diese Zellen nur ein schwaches positives Signal. Es konnte keine Korrelation zwischen der Fluoreszenz-Intensität und der Konzentration des Primärantikörpers beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein unspezifisches Signal handelt.

Die Etablierung eines Färbeprotokolls für die FACS-Analyse der Oberflächenkonzentration des Mannose-Rezeptors konnte somit nicht durchgeführt werden.

3.3 Rezeptor-vermittelte Endozytose in Mikroglia-Zellen

3.3.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose von HRP in Mikroglia-Zellen

Meerrettichperoxidase (HRP) ist ein mannosyliertes Protein und kann in Mikroglia-Zellen spezifisch über den Mannose-Rezeptor aufgenommen werden (Zimmer, 1998). Die Experimente wurden damals nur mit unstimulierten Zellen ausgeführt.

Hier sollte nun der Effekt einer Zytokin-Stimulation auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose in Mikroglia-Zellen untersucht werden. Da das Protokoll für die HRP-Aufnahme in Mikroglia-Zellen in den damaligen Experimenten etabliert wurde, sollte es nun mit stimulierten Zellen verwendet werden.

Die Mikroglia-Zellen wurden mit IFN- γ bzw. IL-4 in verschiedenen Konzentrationen für 1-3 Tage stimuliert. Danach wurden die Zellen 2 x mit DMEM gewaschen und für 10 min mit 0.1 mg/ml HRP/DMEM inkubiert. Die Hälfte der Ansätze wurde jeweils zusätzlich mit 10 mg/ml Mannan versetzt. Danach wurde nicht aufgenommenes HRP durch mehrere Waschschrte entfernt und die Zellen schließlich lysiert. Die Lysate wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Die HRP-Aktivität und die Protein-Konzentration der Ansätze wurde ermittelt und miteinander zur spezifischen Aktivität verrechnet. Die spezifische HRP-Aktivität ist der Menge an aufgenommenem HRP direkt proportional.

Wie die Analyse mehrerer Experimente ergab, führte das Standardprotokoll nach der Stimulation der Zellen zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Eine mögliche Erklärung ist die, dass die Zellen in verschiedenen Schalen verschiedene Aktivierungszustände aufweisen, die sie auf eine Stimulation unterschiedlich reagieren lassen.

Daher wurde versucht ein Protokoll zu finden, mit dessen Hilfe diese Unterschiede aufgehoben werden können. Es wurden Zellen trypsiniert, gepoolt und dann in 96-Well Platten ausplattiert. Dadurch sollte eine höhere Homogenität der verschiedenen Ansätze erreicht werden. Die Zellen wurden stimuliert und dann die HRP-Aufnahme bestimmt. Auch unter diesen Bedingungen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen während der Waschschrte ablösten. Daher wurden verschiedene Methoden getestet, die zu keiner Verbesserung führten. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Zellen nach der Trypsinierung in 4 Well-Platten ausplattiert, stimuliert und dann die HRP-Aufnahme ermittelt. Trotz mehrerer Versuche und weiterer Modifikationen konnten auch durch dieses Protokoll keine reproduzierbaren Ergebnisse gewonnen werden.

Das Modell der über den Mannose-Rezeptor vermittelten HRP-Aufnahme konnte in stimulierten Mikroglia-Zellen nicht angewandt werden.

3.3.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose von mannosyliertem Albumin-FITC in Mikroglia-Zellen

Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, konnte aufgrund technischer Probleme die Endozytose von HRP nicht verwendet werden, um die Rezeptor-vermittelte Endozytose in Mikroglia-Zellen zu untersuchen. Daher wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, um eine höhere Zellzahl analysieren zu können.

Um die Endozytose-Aktivität des Mannose-Rezeptors in Mikroglia-Zellen durch die Analyse mit einem FACS-Scanner bestimmen zu können, wurde mannosyliertes Albumin (mAlbumin) verwendet, das an den Fluoreszenzfarbstoff FITC (mAlbumin-FITC) gekoppelt war. Über die Mannose-Reste kann das mAlbumin an den Mannose-Rezeptor binden und so über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Das mAlbumin kann zu einem gewissen Grad auch über nicht-Rezeptor-vermittelte Pinozytose aufgenommen werden. Um beide Anteile an der Gesamtaufnahme unterscheiden zu können, wurde Mannan eingesetzt. Das Mannan kompetitiert mit dem mAlbumin um die Bindestellen auf dem Rezeptor. Auch wenn die Inhibition niemals 100 % beträgt, kann dadurch der Anteil, der nicht über den Rezeptor aufgenommen wird relativ genau bestimmt werden. Der Anteil der über den Mannose-Rezeptor aufgenommen wird, entspricht der Differenz der Gesamtaufnahme und der Aufnahme nach Inhibition durch Mannan.

Die Ermittlung der Aufnahme erfolgt über die Messung der Fluoreszenz der Zellen durch einen FACS-Scanner. Je mehr mAlbumin-FITC in die Zelle aufgenommen wurde, desto höher ist deren Fluoreszenz.

Für die weiterführenden Analysen wurde die durchschnittliche Fluoreszenz der Ansätze genutzt. Dazu wurden 10000 Ereignisse ausgewertet, von denen wiederum nur die berücksichtigt wurden, die in ein bestimmtes Fenster fielen (Gating). Dadurch konnten Zelltrümmer und Zellaggregate von der Analyse ausgeschlossen werden.

Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen kein mAlbumin-FITC zugesetzt wurde. Die Fluoreszenz dieses Ansatzes stellt die Autofluoreszenz der Zellen dar und wurde von den durchschnittlichen Fluoreszenzen der anderen Ansätze subtrahiert.

3.3.2.1 Titration der mAlbumin-FITC Konzentration

Für die weiterführenden Experimente sollte die mAlbumin-FITC Konzentration bestimmt werden, die zu einer für die Analyse ausreichenden Aufnahme von mAlbumin-FITC führt. Bei einer zu hohen Konzentration kommt es zu einer verstärkten Aufnahme über Pinozytose. Da der Rezeptor zu einer Konzentrierung des Liganden führt, kann eine relativ niedrige Konzentration gewählt werden, bei der die Aufnahme zum Großteil über den Mannose-Rezeptor erfolgt.

Hierzu wurden Mikroglia-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen mAlbumin-FITC versetzt. mAlbumin-FITC wurde in den Konzentrationen 1.55, 3.13, 6.25, 12.5, 25 und 50 µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen kein mAlbumin-FITC zugesetzt wurde. Die Fluoreszenz dieses Ansatzes stellt die Autofluoreszenz der Zellen dar und wurde von den durchschnittlichen Fluoreszenzen der anderen Ansätze subtrahiert.

Bei der Hälfte der Ansätze wurde Mannan (10 mg/ml) zugegeben, um die Aufnahme über den Mannose-Rezeptor zu inhibieren. Dadurch kann die über den Mannose-Rezeptor aufgenommene Liganden-Menge bestimmt werden.

Die Zellen wurden für 20 min mit dem Liganden inkubiert und danach für die FACS-Analyse behandelt.

Die Fluoreszenz der verschiedenen Ansätze wurde ermittelt und die durchschnittliche Fluoreszenz für weitere Analysen genutzt.

In Abbildung 3.8 ist deutlich zu sehen, dass die Aufnahme des mAlbumin-FITC bei allen eingesetzten mAlbumin-Konzentrationen durch Mannan inhibiert werden kann. Das bedeutet, dass die Zellen bei allen getesteten Konzentrationen das mAlbumin-FITC teilweise über den Mannose-Rezeptor aufnehmen.

Das Ausmaß der Inhibition variiert bei den verschiedenen Konzentrationen. Das Signal der inhibierten Ansätze nähert sich bei niedrigen Konzentrationen der Autofluoreszenz immer weiter an.

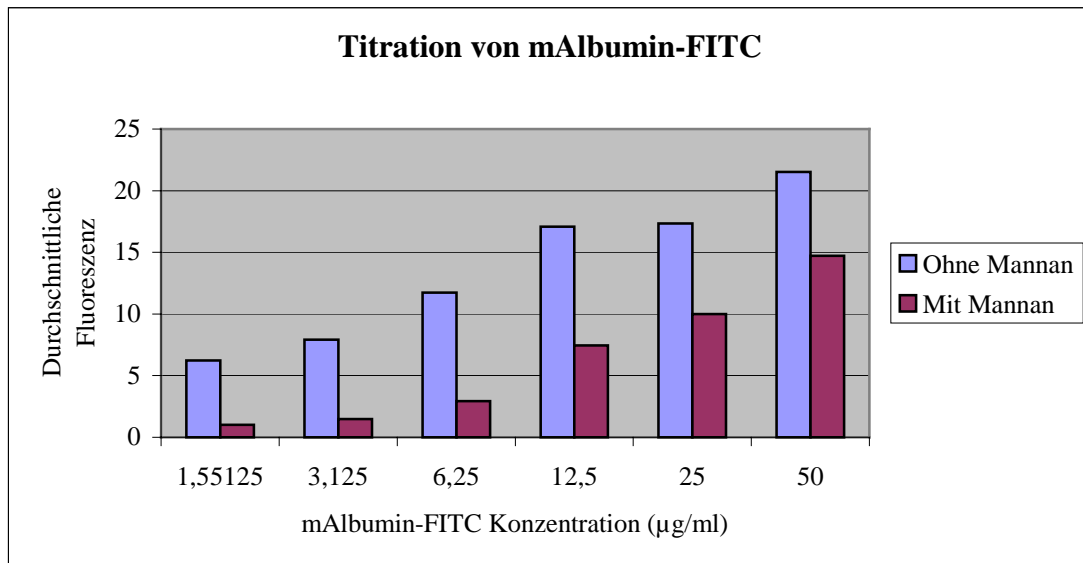


Abb. 3.8: Mikroglia-Zellen wurden für 20 min mit verschiedenen mAlbumin-FITC Konzentrationen (Verdünnungsreihe 50=>1.55 µg/ml) versetzt. Zu je der Hälfte der Ansätze wurde der Inhibitor Mannan (10 mg/ml) zugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Ligand zugegeben wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet und die durchschnittliche Fluoreszenz der verschiedenen Ansätze wurde ermittelt. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die Autofluoreszenz der Negativkontrolle wurde von den Werten subtrahiert. Die so erhaltenen Werte wurden gegen die Liganden-Konzentrationen aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment zu sehen.

Um eine klare Aussage treffen zu können, wurde der prozentuale Anteil der inhibierbaren Aufnahme an der Gesamtaufnahme bestimmt. Dieser Anteil entspricht der über den Mannose-Rezeptor aufgenommenen Menge an Ligand.

Mit sinkender Liganden-Konzentration nimmt der Anteil, der über den Mannose-Rezeptor aufgenommen wird, immer mehr zu (Abb. 3.9). Bei einer Liganden-Konzentration von 50 µg/ml mAlbumin-FITC werden nur ~31 % über den Mannose-Rezeptor aufgenommen. Dieser Wert steigt ab einer Liganden-Konzentration von 3.13 µg/ml auf über 80 % an. Bei geringen Liganden-Konzentrationen nimmt allerdings die Stärke des Signals immer weiter ab und liegt daher sehr nahe an der Stärke des Signals der Negativkontrolle. Für die weiterführenden Experimente wurde daher eine mAlbumin-FITC Konzentration von 10 µg/ml gewählt. Bei dieser Konzentration ist gewährleistet, dass die Zellen einen Großteil des Liganden über den Rezeptor aufnehmen, das Signal aber immer noch deutlich über dem der Negativkontrolle (=Autofluoreszenz der Zellen) liegt.

Dadurch ist es möglich Variationen der Menge an aufgenommenem Liganden zu erfassen. Dies kann dann eine Rolle spielen, wenn die Zellen mit Zytokinen stimuliert werden und dadurch ihre Endozytose-Aktivität ändern.

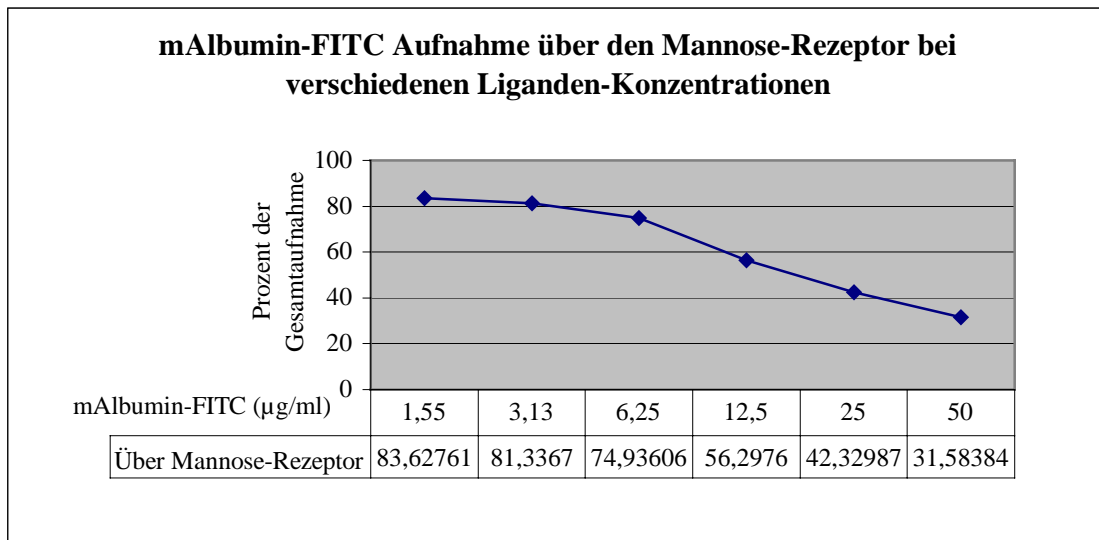


Abb. 3.9: Die Zellen wurden wie in Legende 3.8 beschrieben behandelt. Um die Aufnahme über den Mannose-Rezeptor zu bestimmen, wurde je Ansatz die inhibierbare Aufnahme in Relation zur Gesamtaufnahme prozentual bestimmt. Dieser Wert wurde von der gleich 100 % gesetzten Fluoreszenz der Gesamtaufnahme subtrahiert. Der erhaltene Wert spiegelt die prozentuale Aufnahme über den Mannose-Rezeptor wider.

3.3.2.2 Verifikation des Zelltyps, der mAlbumin-FITC in den verwendeten Zellkulturen aufnimmt

Die für die Experimente verwendeten Zellen stammen aus Zellkulturen, die einen hohen Reinheitsgrad besitzen. Es kann jedoch nicht von vorneherein ausgeschlossen werden, dass die in den verwendeten Kulturen vorhandenen Astrozyten, die auch zu Endozytose fähig sind, das Bild nicht verfälschen. In diesem Experiment sollte bewiesen werden, dass es tatsächlich Mikroglia-Zellen und nicht die Astrozyten sind, die mAlbumin-FITC aufnehmen.

Hierzu wurden die Zellen für 20 min mit verschiedenen Mengen an mAlbumin-FITC inkubiert. Anschließend an die Inkubation mit dem Liganden erfolgte die Immunfärbung gegen CD45, welches von Mikroglia-Zellen, nicht jedoch von Astrozyten exprimiert wird. Doppelt positive Zellen sind daher endozytierende Mikroglia-Zellen. Durch die Zugabe von Mannan kann weiterhin bestimmt werden, ob die Ligandenaufnahme über den Mannose-Rezeptor erfolgt.

Wie in Abbildung 3.10 A zu sehen ist, exprimiert der Großteil der Zellen CD45. Dies bedeutet, dass es sich bei diesen Zellen eindeutig um Mikroglia-Zellen handelt. Das CD45-Signal ist spezifisch und nicht auf eine unspezifische Bindung der Antikörper zurückzuführen (Abb. 3.10 B). Die Zellen, die das mAlbumin-FITC aufnehmen sind CD45 positiv (Abb. 3.10 C). Die CD45 negativen Zellen nehmen kein mAlbumin-FITC auf. Die Aufnahme des

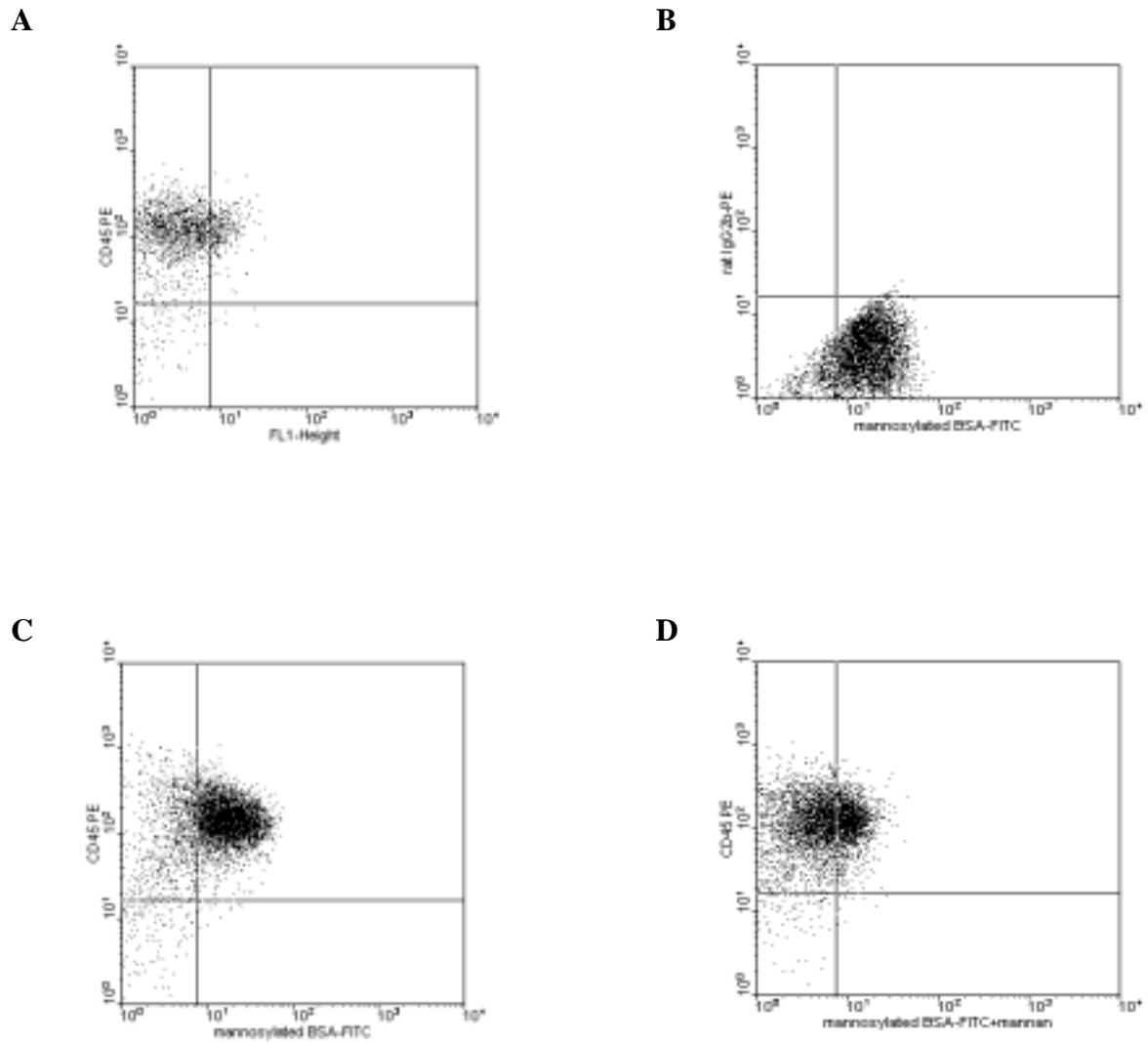


Abb. 3.10: Mikroglia-Zellen wurden für 20 min mit 12.5 $\mu\text{g/ml}$ mAlbumin-FITC oder mAlbumin-FITC und 10 mg/ml Mannan inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit mAlbumin/FITC versetzt wurden. Danach wurden die Zellen mit einem α -CD45-PE Antikörper gefärbt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer Isotyp-PE -Kontrolle versetzt wurden. Es wurden je 20000 Ereignisse gemessen. (A) Kontrolle gegen CD45 gefärbt (B) mAlbumin-FITC und Isotyp-Kontrolle (C) mAlbumin-FITC und gegen CD45 gefärbt (D) mAlbumin, Mannan und gegen CD45 gefärbt

mAlbumin-FITC ist durch Mannan inhibierbar (Abb. 3.10 D), was dafür spricht, dass die Aufnahme zu einem gewissen Teil über den Mannose-Rezeptor erfolgt.

3.3.3 Regulation der Endozytose in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit Zytokinen

Makrophagen und andere Zellen, die zur Endozytose fähig sind, verändern ihr Verhalten, wenn sie mit Zytokinen stimuliert werden. Dadurch kann die Aktivität solcher Zellen im Rahmen einer Immunantwort beeinflusst und an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden. In den nachfolgenden Experimenten sollte bestimmt werden, wie sich eine Stimulation mit einem pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokin auf die Endozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen auswirkt.

Durch die gewählten Konditionen ist es möglich direkt die Aufnahme des Liganden mit und ohne Inhibition zu ermitteln. Aus diesen beiden Datensätzen kann dann die Aktivität des Mannose-Rezeptors errechnet werden.

3.3.3.1 mAlbumin-FITC Aufnahme in Mikroglia-Zellen nach der Stimulation mit IFN- γ

Der Effekt der Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- γ sollte ermittelt werden. Es wurden 25 U/ml und 100 U/ml IFN- γ getestet. Die Stimulation erfolgte für 1–3 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen kein Ligand zugesetzt wurde.

Die gesamte und die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose wurden direkt bestimmt. Durch Verrechnung der erhaltenen Ergebnisse konnte die Aktivität des Mannose-Rezeptors abgeleitet werden.

3.3.3.1a Die gesamte Endozytose

Um die Änderung der gesamten Endozytose nach Stimulation zu ermitteln, wurden die Zellen mit 25 U/ml und 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Die Kontrollen wurden nur mit frischem Medium versetzt. Die Negativkontrolle bestand aus Zellen, denen kein Ligand zugesetzt wurde.

Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC versetzt, anschließend für die FACS-Analyse vorbereitet. Danach erfolgte die Analyse mit dem FACS-Scanner.

Es zeigte sich, dass die Stimulation mit IFN- γ zu einer Reduktion der Endozytose in Mikroglia-Zellen führt (siehe Abb. 3.11). Am Tag 1 nach der Stimulation ist der stärkste

Effekt zu verzeichnen. Bei Stimulation mit 25 U/ml werden nur noch ~45 % der Menge an mAlbumin-FITC aufgenommen, wie in den Kontroll-Zellen. Die Zellen, die mit 100 U/ml stimuliert wurden, nehmen noch ~47 % im Vergleich zur Kontrolle auf. Dieser Effekt nimmt in den nächsten beiden Tagen ab. Im Falle der Zellen, die mit 25 U/ml stimuliert wurden, ist der Effekt nach drei Tagen nicht mehr zu beobachten.

Die Reduktion der Endozytose nach Stimulation mit 100 U/ml verändert sich dagegen vergleichsweise langsamer und die Zellen zeigen nach drei Tagen noch eine Reduktion um ~35 % im Vergleich zur Kontrolle.

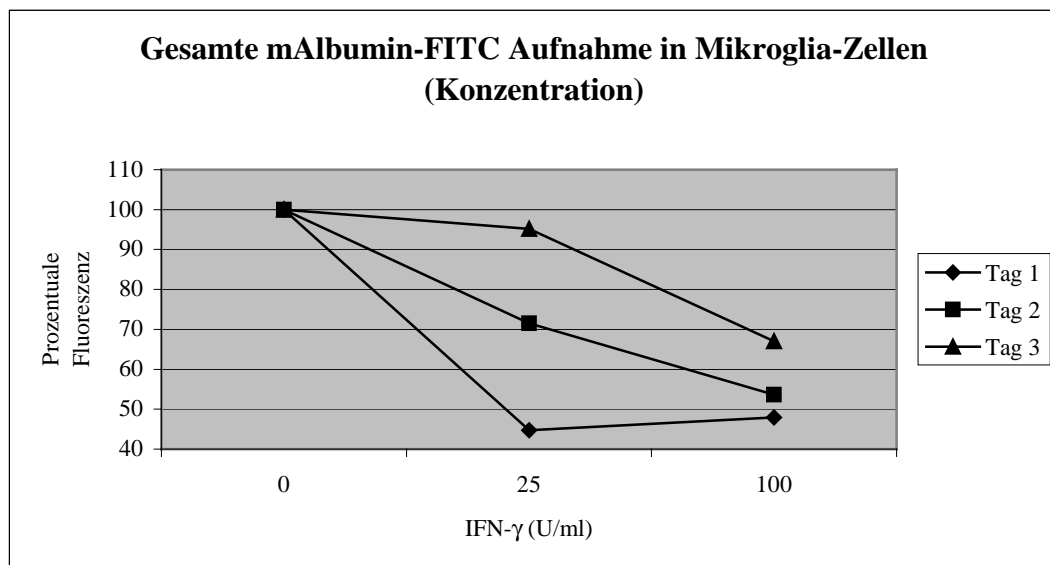


Abb. 3.11: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 25 U/ml bzw. 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die durchschnittliche Fluoreszenz der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und die durchschnittlichen Fluoreszenzen der stimulierten Ansätze wurden dann in Relation dazu gesetzt. Die erhaltenen Werte (Durchschnitt zweier Experimente) wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

Der zeitliche Verlauf der Stimulation mit den beiden getesteten Zytokin-Konzentrationen ist in Abb. 3.12 nochmals deutlicher dargestellt. Während beide Zellpopulationen am Tag 1 noch vergleichbare Werte der Inhibition aufweisen, steigt die Aufnahme in den Zellen nach Stimulation mit 25 U/ml schneller und nähert sich den Werten der Kontrolle wieder an.

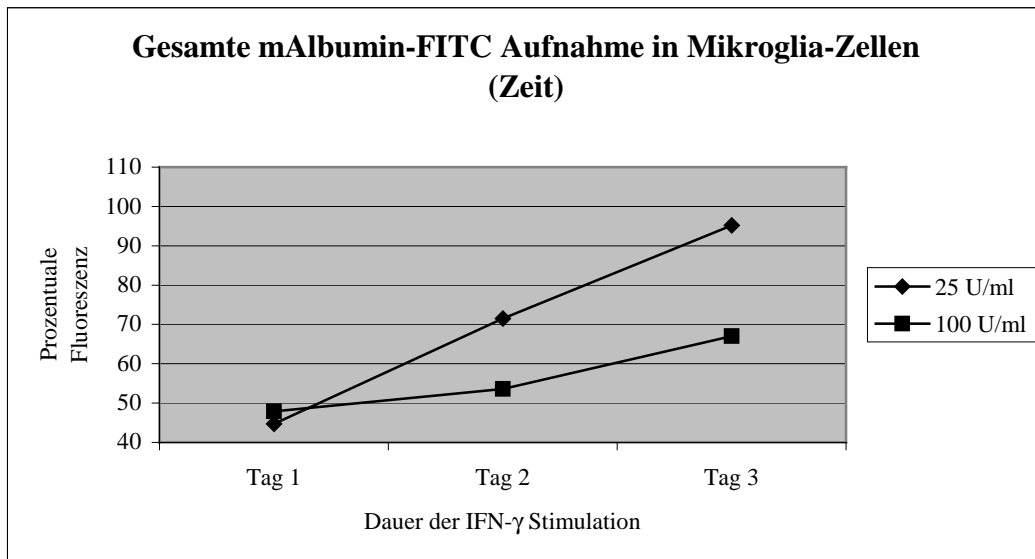


Abb. 3.12: Mikroglia-Zellen wurden mit 25 U/ml bzw. 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 1-3 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die Werte der stimulierten Ansätze wurden in Relation zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die Ergebnisse (Mittelwerte zweier Experimente) wurden gegen die Dauer der Stimulation aufgetragen.

IFN- γ besitzt somit einen zeit- und konzentrationsabhängigen Einfluß auf die gesamte Endozytose in Mikroglia-Zellen.

3.3.3.1b Die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose

Durch Zugabe von Mannan bei der Inkubation mit mAlbumin-FITC, kann die Aufnahme von mAlbumin über den Mannose-Rezeptor weitgehend inhibiert werden. So kann der Teil der gesamten Endozytose bestimmt werden, der nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelt wird.

Um die Auswirkungen der Stimulation mit IFN- γ auf diesen Teil der Endozytose zu ermitteln, wurden Mikroglia-Zellen mit 25 U/ml und 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden.

Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen mit 10 μ g/ml mannosyliertem mAlbumin-FITC und 10 mg/ml Mannan inkubiert. Danach wurden die Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet und die durchschnittliche Fluoreszenz der Ansätze bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen kein Ligand zugesetzt wurde.

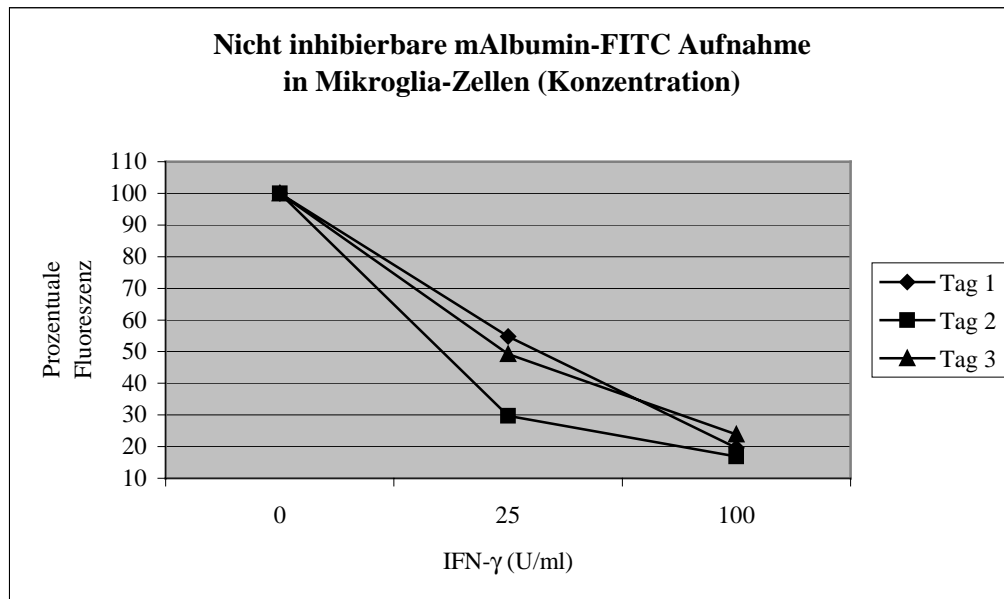


Abb. 3.13: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 25 U/ml bzw. 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC und 10 mg/ml Mannan inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die durchschnittliche Fluoreszenz der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und die durchschnittlichen Fluoreszenzen der stimulierten Ansätze wurden dann in Relation dazu gesetzt. Die erhaltenen Werte (Mittelwerte zweier Experimente) wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

Wie aus Abbildung 3.13 ersichtlich ist, kommt es nach Stimulation mit IFN- γ zu einer starken Reduktion der Endozytose, die nicht vom Mannose-Rezeptor abhängig ist. An allen drei beobachteten Tagen, weisen die Zellen, die mit 100 U/ml IFN- γ stimuliert wurden, die stärkste Reduktion der Endozytose auf.

Der stärkste Effekt ist am Tag 2 zu sehen. Während die Unterschiede nach Stimulation mit 100 U/ml nicht groß sind (alle ~20 %), kommt es in den Zellen, die mit 25 U/ml stimuliert wurden, hier zu der stärksten Reduktion. Die Zellen nehmen nur noch ~30 % der Menge an mAlbumin auf, welche die Kontroll-Zellen aufnehmen.

Betrachtet man die Kinetik der beiden mit IFN- γ stimulierten Zellpopulationen, so ist hier ein konzentrationsabhängiger Effekt zu sehen (siehe Abb. 3.14). Beide Zytokin-Konzentrationen weisen von Tag 1 auf Tag 2 eine Reduktion der Aufnahme auf, von Tag 2 auf Tag 3 kommt es dann zu einem leichten Anstieg.

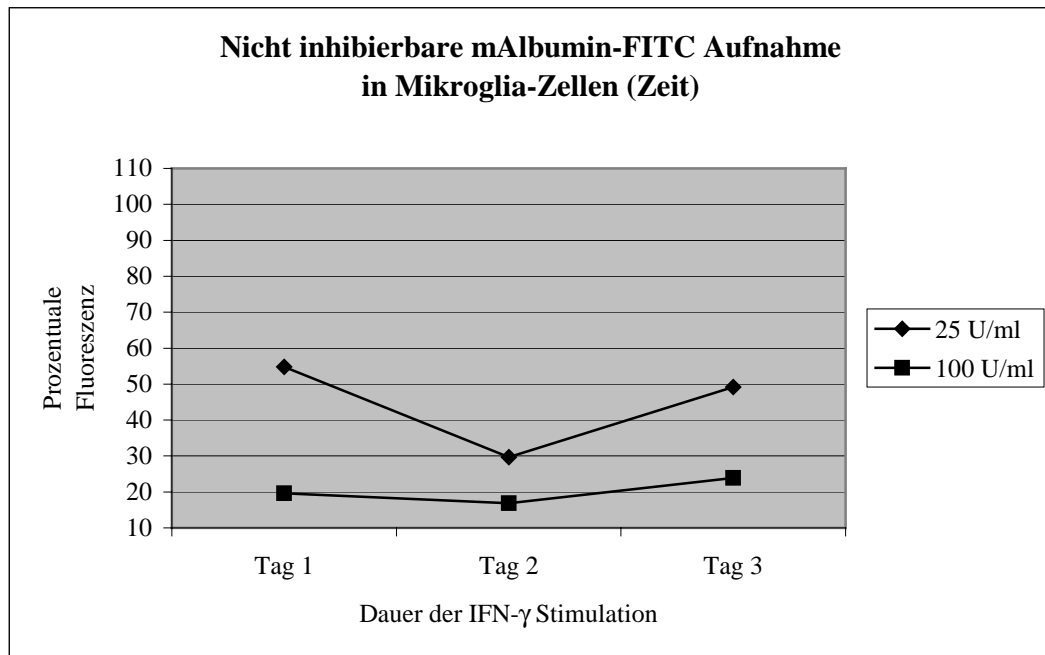


Abb. 3.14: Mikroglia-Zellen wurden mit 25 U/ml bzw. 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 1-3 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die Werte der stimulierten Ansätze wurden in Relation zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die Ergebnisse (Mittelwerte zweier Experimente) wurden gegen die Dauer der Stimulation aufgetragen.

Der Effekt der Stimulation mit 100 U/ml ist über die 3 Tage sehr ähnlich (zwischen ~25 % und ~18 % der Kontrolle). Die Zellen, die mit 25 U/ml stimuliert wurden, weisen stärkere Unterschiede auf (zwischen ~54 % und ~30 %). Bei allen betrachteten Zeitpunkten ist eine stärkere Reduktion der Endozytose in den Zellen zu beobachten, die mit 100 U/ml stimuliert wurden.

IFN- γ besitzt somit einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose. Die Zeitabhängigkeit dieses Effektes ist hingegen nicht einheitlich ausgeprägt. Die Zellen erreichen aber in der untersuchten Zeit nicht das Endozytose-Niveau der unstimulierten Zellen.

3.3.3.1c Aktivität des Mannose-Rezeptors

Um die Aktivität des Mannose-Rezeptors zu ermitteln, wurde der prozentuale Anteil der inhibierbaren Endozytose an der gesamten Endozytose bestimmt. Dieser Wert wurde von 100 % (Gesamtaufnahme) subtrahiert, wodurch der nicht-inhibierbare Anteil an der gesamten

Endozytose bestimmt werden kann. Diese Werte wurden in Relation zu den Kontrollen (=100 %) gesetzt. Dadurch kann die Aktivität des Mannose-Rezeptors in Bezug auf die Kontrolle bestimmt werden.

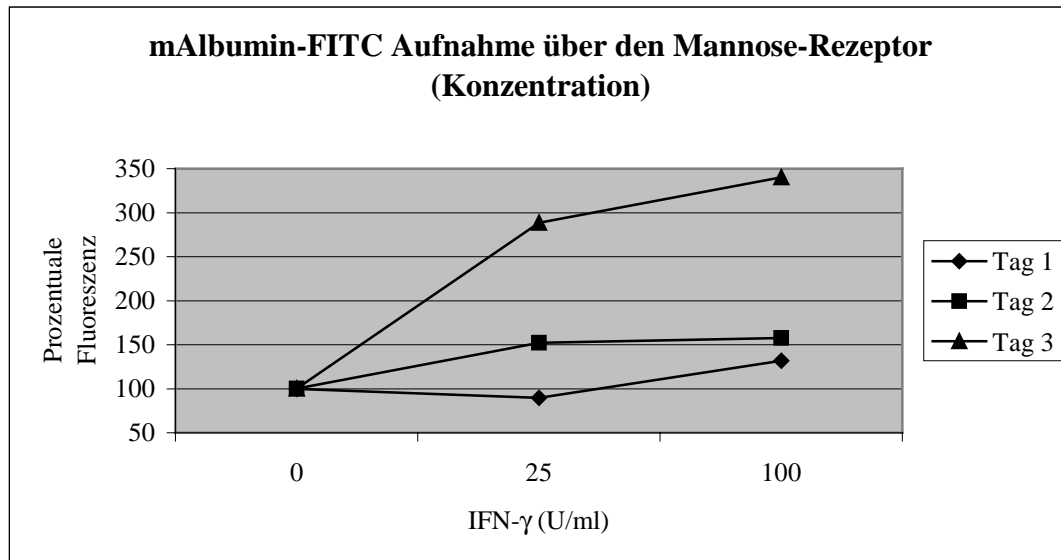


Abb. 3.15: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 25 U/ml bzw. 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Die Hälfte der Ansätze enthielt neben dem mAlbumin 10 mg/ml Mannan. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Der Anteil der Endozytose unter Anwesenheit von Mannan an der gesamten Endozytose wird ermittelt. Dieser Wert wird von der gleich 100 % gesetzten Gesamtaufnahme subtrahiert. Der so erhaltene Wert wird dann in Bezug zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Dadurch kann die Aktivität des Mannose-Rezeptors nach Stimulation (in Bezug auf die Kontrolle) bestimmt werden. Die erhaltenen Werte (Mittelwerte zweier Experimente) wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

Am Tag 1 kommt es in den Zellen, die mit 25 U/ml IFN- γ stimuliert wurden, zu einer leichten Reduktion (~89 % der Kontrolle) der Aufnahme über den Mannose-Rezeptor. Die Stimulation mit 100 U/ml führt zu einer Erhöhung der Aktivität des Mannose-Rezeptors um ~31 % (Abb. 3.15).

Am Tag 2 ist die Aktivität des Mannose-Rezeptors in beiden Zellpopulationen erhöht. In den Zellen, die mit 25 U/ml stimuliert wurden ist ein Anstieg um ~52 % im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die Stimulation mit 100 U/ml führt am Tag 2 zu einer Zunahme um ~57 %.

Nach drei Tagen ist eine noch stärkere Zunahme der Rezeptor-Aktivität zu beobachten. Die Zellen nehmen ~180 % (25 U/ml) bzw. ~240 % (100 U/ml) mehr mAlbumin über den Mannose-Rezeptor auf, als dies die unstimulierten Kontroll-Zellen tun.

IFN- γ weist einen zeitabhängigen Effekt auf die Aktivität des Mannose-Rezeptors auf (Abb. 3.15).

Betrachtet man die Konzentrationen getrennt (Abb. 3.16), so ist am Tag 1 nach der Stimulation die Aktivität des Mannose-Rezeptors nur in den Zellen vergleichsweise höher, die mit 100 U/ml stimuliert wurden.

Nach längerer Stimulation (Tag 2 und Tag 3) ist sie auch in den Zellen erhöht, die mit 25 U/ml stimuliert wurden (siehe Abb. 3.16). Am Tag 2 ist die Aktivität in beiden Zellpopulationen vergleichbar. Nach 3 Tagen ist die Aktivität in den Zellen, die mit 100 U/ml stimuliert wurden, wiederum (188 % \Leftrightarrow 240 %) höher. Der konzentrationsabhängige Effekt der IFN- γ Stimulation ist nicht einheitlich ausgeprägt.

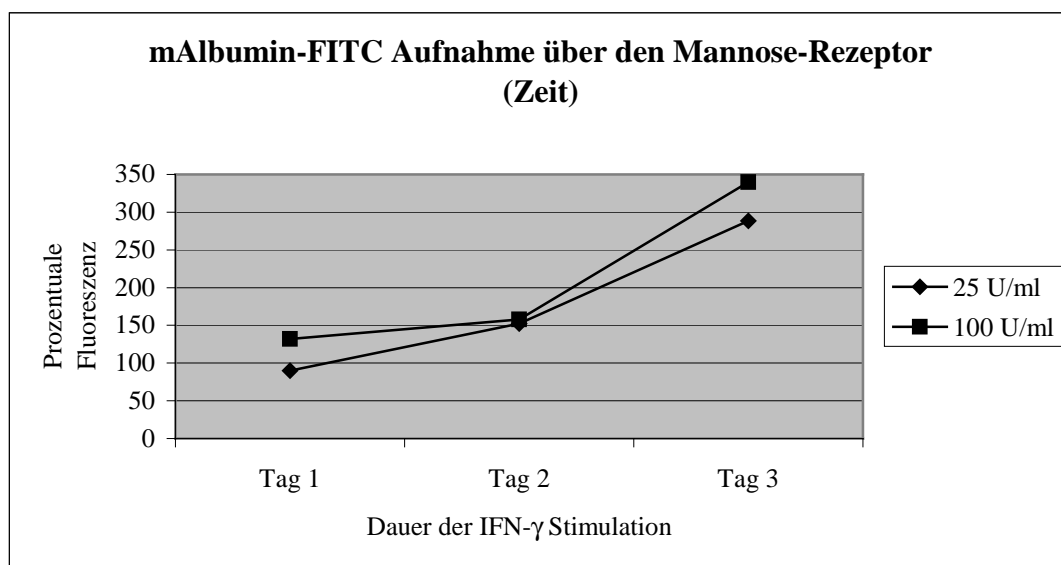


Abb. 3.16: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 25 U/ml bzw. 100 U/ml IFN- γ stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Die Hälfte der Ansätze enthielt noch 10 mg/ml Mannan. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Der Anteil der Endozytose unter Anwesenheit von Mannan an der gesamten Endozytose wird ermittelt. Dieser Wert wird von der gleich 100 % gesetzten Gesamtaufnahme subtrahiert. Der so erhaltene Wert wird dann in Bezug zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Dadurch kann die Aktivität des Mannose-Rezeptors nach Stimulation (in Bezug auf die Kontrolle) bestimmt werden. Die erhaltenen Werte (Mittelwerte zweier Experimente) wurden gegen die Dauer der Stimulation aufgetragen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es zu einer Erhöhung der Aktivität des Mannose-Rezeptors kommt, obwohl die Endozytose durch die Stimulation in den Ansätzen mit und ohne Inhibition reduziert wird. Da es allerdings mit zunehmender Dauer der Stimulation zu einem Anstieg der gesamten Endozytose kommt, während der nicht-inhibierbare Teil weiter absinkt, war dies zu erwarten.

Zusammenfassend:

	Gesamtaufnahme	Nicht inhibierbare Aufnahme	Aktivität des Mannose-Rezeptors
25 U/ml	reduziert	reduziert	↑↑ (nach Tag 2 und Tag 3)
100 U/ml	reduziert	reduziert	↑↑
Zeitabhängigkeit	Ja	Ja	Ja
Konzentrationsabhängigkeit	Ja (nach Tag 2 und Tag 3)	Ja	Ja

Tab. 3.4 : Einfluss der Stimulation mit IFN- γ auf die Endozytose in Mikroglia-Zellen

3.3.3.2 mAlbumin-FITC Aufnahme in Mikroglia-Zellen nach der Stimulation mit IL-4

Ziel war es die Auswirkung der Stimulation mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-4 auf die Endozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen zu bestimmen. Dazu wurden Mikroglia-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen IL-4 (125 U/ml u. 500 U/ml) stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 1-3 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen kein Ligand zugesetzt wurde.

Es wurden die gesamte (ohne Inhibition) und die vom Mannose-Rezeptor unabhängige Endozytose (mit Inhibition) bestimmt. Aus diesen Werten konnte dann die Aktivität des Mannose-Rezeptors abgeleitet werden.

3.3.3.2a Die gesamte Endozytose

Die Mikroglia-Zellen wurden mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur in reinem Medium inkubiert wurden. Die Zellen wurden für 1-3 Tage stimuliert.

Die Zellen wurden gewaschen und dann mit 10 μ g/ml mAlbumin-FITC versetzt. Die Zellen wurden für 20 min inkubiert und dann für die FACS-Analyse vorbereitet.

Die Fluoreszenz der verschiedenen Ansätze wurde gemessen und die durchschnittliche Fluoreszenz für weitere Analysen benutzt. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Negativkontrolle (ohne Ligand) wurde bestimmt und als Autofluoreszenz von den anderen Werten subtrahiert. Die Werte wurden in prozentuale Relation zur unstimulierten Kontrolle (=100 %) gesetzt.

Wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, nehmen Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IL-4 verstärkt mAlbumin-FITC auf. Es ist ein zeitabhängiger Effekt zu beobachten. Mit zunehmender Inkubationsdauer nehmen die stimulierten Zellen jeweils mehr Ligand als am Vortag auf. Die Endozytose in Mikroglia-Zellen wird durch Stimulation mit IL-4 über den gesamten untersuchten Zeitraum erhöht (Abb. 3.17).

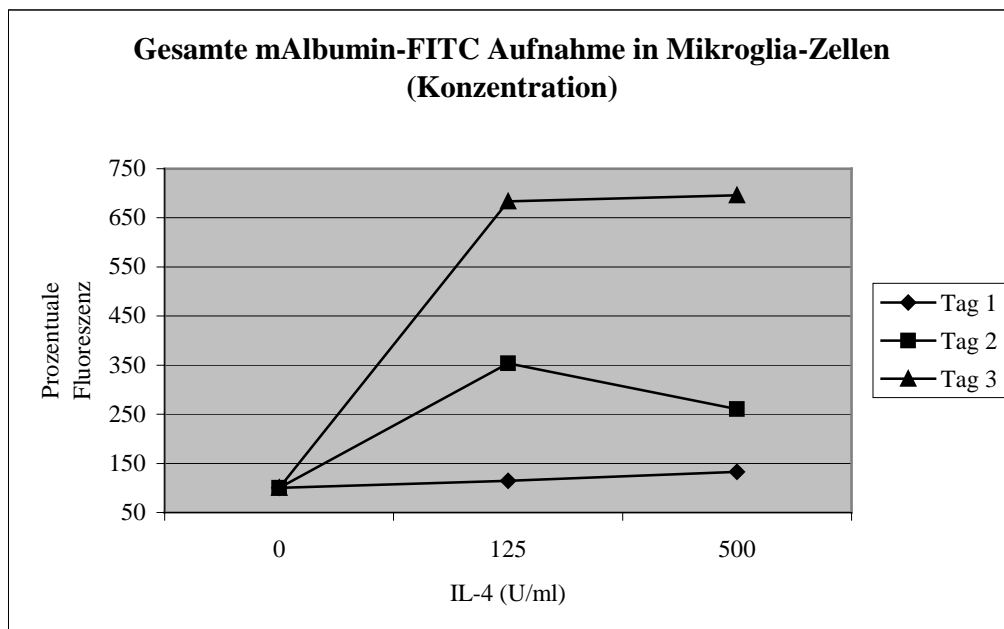


Abb. 3.17: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Negativkontrolle wurde ermittelt und die Autofluoreszenz subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die durchschnittliche Fluoreszenz der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und die durchschnittlichen Fluoreszenzen der stimulierten Ansätze wurden dann in Relation dazu gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen. Es ist das Ergebnis von drei Experimenten zu sehen.

Vergleicht man die Aufnahme des Liganden in Zellen, die mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml stimuliert wurden, so ist hier kein eindeutig konzentrationsabhängiger Effekt zu beobachten (Abb. 3.18).

Nach zwei Tagen ist in den Zellen, die mit 500 U/ml IL-4 stimuliert wurden, eine geringere (im Vergleich zu 125 U/ml) Aufnahme von mAlbumin zu beobachten. Dieser Effekt ist ein bzw. drei Tage nach der Stimulation nicht zu beobachten. Die Zellen, die mit 500 U/ml stimuliert wurden, nehmen zu diesen Zeitpunkten vergleichsweise größere Mengen an mAlbumin auf. Am Tag 1 sind es ~9 %, am Tag 3 ~13 % mehr als in den Zellen, die mit 125 U/ml stimuliert wurden.

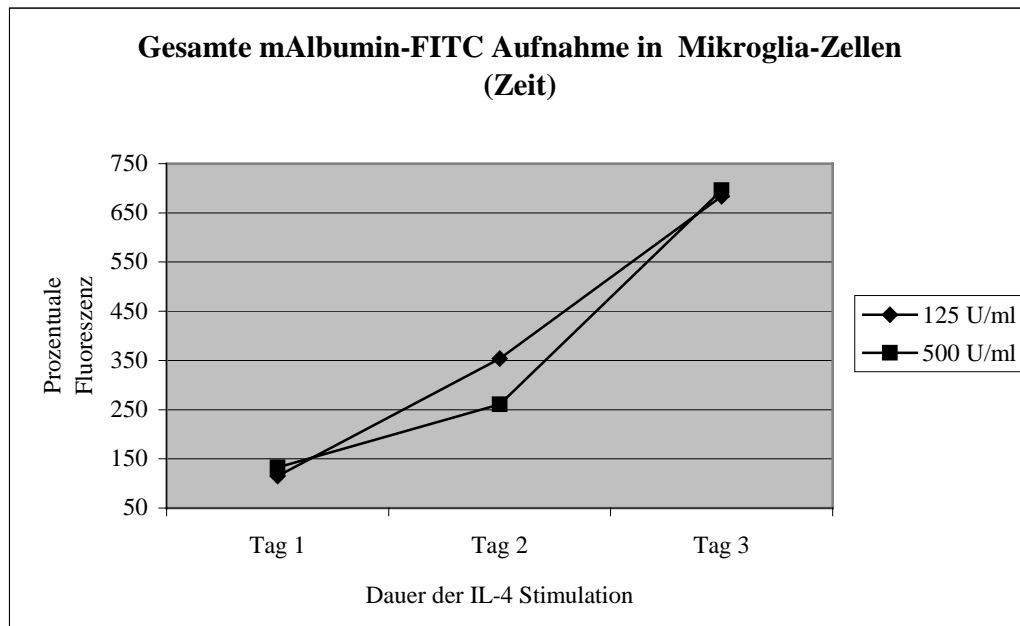


Abb. 3.18: Mikroglia-Zellen wurden mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 1-3 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die Werte der stimulierten Ansätze wurden in Relation zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die Ergebnisse wurden gegen die Dauer der Stimulation aufgetragen. Es ist das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente zu sehen.

In Abb. 3.18 sieht man die Zeitabhängigkeit der Aufnahme bei Stimulation mit verschiedenen Zytokin-Konzentrationen. Sowohl eine Stimulation mit 125 U/ml, als auch die Stimulation mit 500 U/ml führt zu einer stetigen Zunahme der Endozytose. Beide Konzentrationen weisen nur am Tag 2 nach der Stimulation Unterschiede auf. Die Stimulation mit 125 U/ml IL-4 führt hier zu einem stärkeren Anstieg der mAlbumin-FITC Aufnahme. Am Tag 1 und Tag 3 nach der Stimulation liegen die Werte der stimulierten Ansätze hingegen sehr dicht beieinander.

Zusammenfassend ist keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von IL-4 auf die gesamte Endozytose in Mikroglia-Zellen festzustellen. Eine zeitliche Abhängigkeit des Effektes von IL-4 ist aber vorhanden.

3.3.3.2b Die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose

Mikroglia-Zellen nehmen mAlbumin teilweise über den Mannose-Rezeptor auf. Da es jedoch auch zu einer Aufnahme über Pinozytose kommt, wurde Mannan zugesetzt, um so die Aufnahme über den Rezeptor zu inhibieren. Dadurch ist es möglich, die Auswirkungen des IL-4 auf die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose zu dokumentieren.

Mikroglia-Zellen wurden mit 125 U/ml und 500 U/ml IL-4 für 1-3 Tage stimuliert. Danach wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC und 10 mg/ml Mannan inkubiert, anschließend für die FACS-Analyse vorbereitet und analysiert. Die Fluoreszenz der verschiedenen Ansätze wurde gemessen und die durchschnittliche Fluoreszenz für weitere Analysen benutzt. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Negativkontrolle (ohne Ligand) wurde bestimmt und als Autofluoreszenz von den anderen Werten subtrahiert. Die Werte wurden in prozentuale Relation zur unstimulierten Kontrolle (=100 %) gesetzt

Wenn die Aufnahme des mAlbumin-FITC über den Mannose-Rezeptor inhibiert wird, kommt es zu geringen Änderungen der mAlbumin-Aufnahme (Abb. 3.19).

Am Tag 1 kam es im Falle von 125 U/ml zu einer leichten Erhöhung der Aufnahme (~5 %). Bei Stimulation mit 500 U/ml hingegen zu einem Anstieg um ~62 %. Am Tag 2 nach der Stimulation ist im Fall der Stimulation mit 125 U/ml ein leichter Anstieg um ~15 % zu beobachten. Die Aufnahme in den Zellen, die mit 500 U/ml stimuliert wurden, geht hingegen auf ~11 % mehr zurück. Am Tag 3 kommt es zu einem weiteren Anstieg der Mannose-Rezeptor unabhängigen Endozytose (~60 %), die bei beiden Konzentrationen sehr ähnlich ist. Insgesamt führt die Stimulation mit IL-4 führt in Mikroglia-Zellen nur zu (vergleichsweise) geringen Änderungen der nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose von mAlbumin-FITC. Dies wird deutlich, wenn man den zeitlichen Verlauf der Ligandenaufnahme bei beiden Zytokin-Konzentrationen betrachtet (siehe Abb. 3.20).

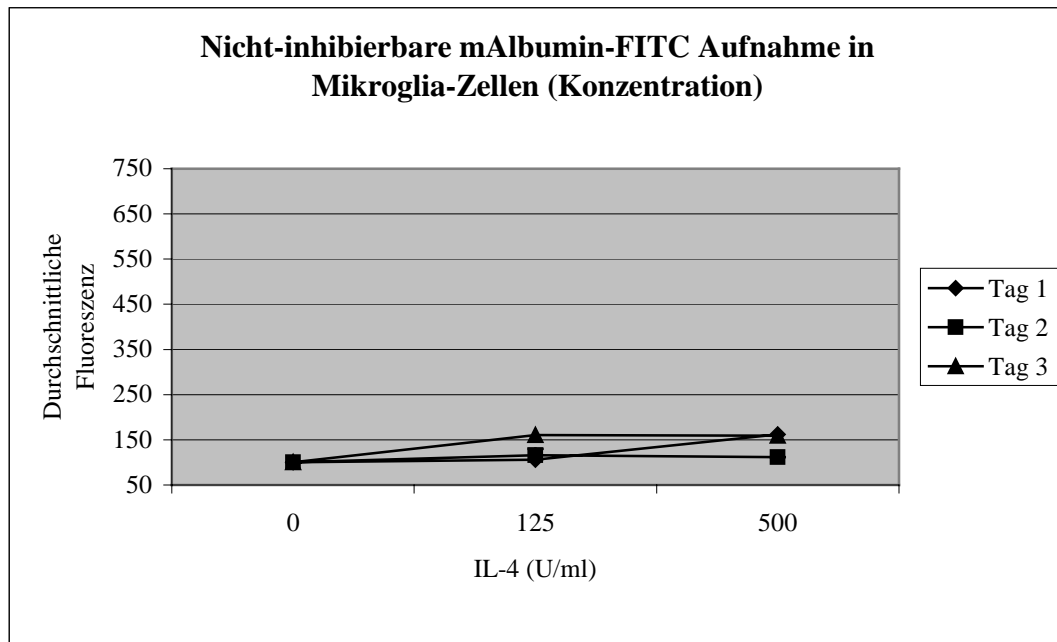


Abb. 3.19: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC und 10 mg/ml Mannan inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die durchschnittliche Fluoreszenz der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und die durchschnittlichen Fluoreszenzen der stimulierten Ansätze wurden dann in Relation dazu gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen. Es ist das Ergebnis von zwei Experimenten zu sehen.

Im Falle der Zellen, die mit 500 U/ml IL-4 stimuliert wurden, kommt es am Tag 1 nach der Zugabe des Zytokins zu einem Anstieg (~62 % mehr als die Kontrolle), am Tag 2 zu einem Abfall (~11 % mehr als Kontrolle) und am Tag 3 zu einem abermaligen Anstieg (~60 % mehr als die Kontrolle) der Endozytose.

Die Stimulation mit 125 U/ml führt hingegen über den gesamten Zeitraum zu einer Zunahme der Endozytose. Diese steigt von ~5 % über ~15 % auf ~60 % am Tag 3.

Am Tag 2 und Tag 3 weisen die beiden stimulierten Zellpopulationen keine signifikanten Unterschiede auf.

Zusammenfassend weist die Stimulation mit IL-4 einen zeitabhängigen Effekt auf die nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose auf. Ein konzentrationsabhängiger Effekt ist nicht zu beobachten.

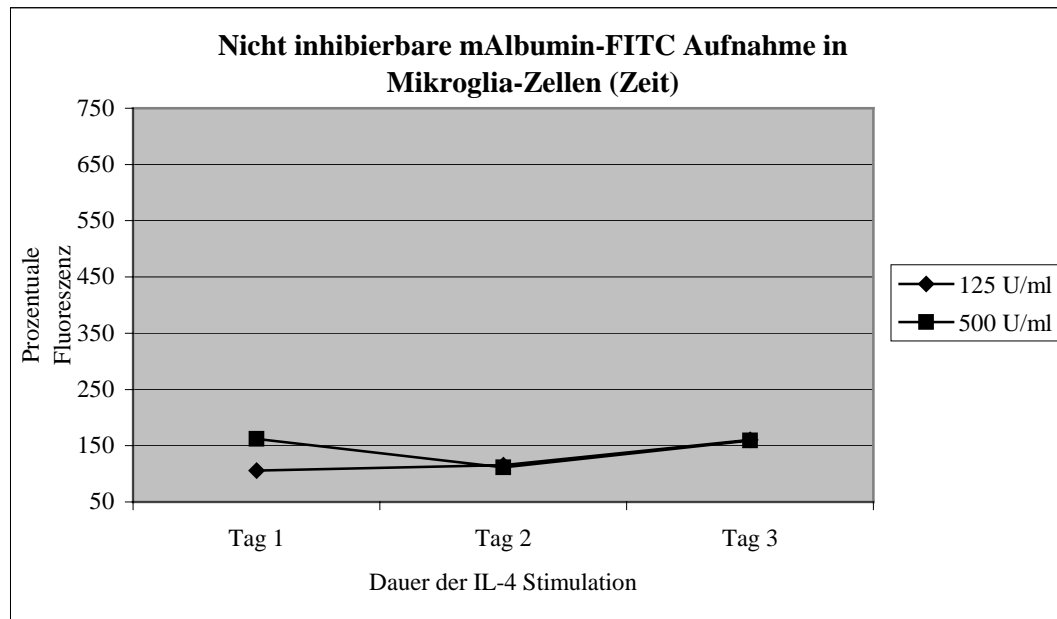


Abb. 3.20: Mikroglia-Zellen wurden mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 1-3 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC und 10 mg/ml Mannan inkubiert. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz wurde subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Die Werte der stimulierten Ansätze wurden in Relation zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die Ergebnisse wurden gegen die Dauer der Stimulation aufgetragen. Es ist das Ergebnis zweier unabhängiger Experimente zu sehen.

3.3.3.2c Aktivität des Mannose-Rezeptors

Der durch Mannan inhibierbare Anteil der Endozytose an der gesamten Endozytose wird ermittelt. Dieser Wert wird von der gleich 100 % gesetzten Gesamtaufnahme subtrahiert. Der so erhaltene Wert wird dann in Bezug zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Dadurch kann die Aktivität des Mannose-Rezeptors nach Stimulation (in Bezug auf die Kontrolle) bestimmt werden.

Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, kommt es am Tag 1 nur in den Zellen, die mit 125 U/ml stimuliert wurden, zu einem Anstieg der Endozytose. Diese nehmen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ~48 % mehr mAlbumin-FITC über den Mannose-Rezeptor auf.

Nach 2 Tagen kommt es in beiden stimulierten Zellpopulationen zu einer erhöhten Steigerung der Aktivität des Mannose-Rezeptors. Diese liegt im Falle der mit 125 U/ml stimulierten Zellen bei ~138 %, in Falle der mit 500 U/ml stimulierten bei ~116 % über der Kontrolle.

Am Tag 3 kommt es nochmals zu einer leichten Zunahme um ~11 %, im Vergleich zum Vortag. Somit ist der Effekt der Zytokin-Stimulation zeitabhängig.

Eine direkte Abhängigkeit der Konzentration des IL-4 ist bei den getesteten Konzentrationen nicht vorhanden. 500 U/ml IL-4 führen, im Vergleich zu 125 U/ml, zu einer geringeren Aktivität des Mannose-Rezeptors.

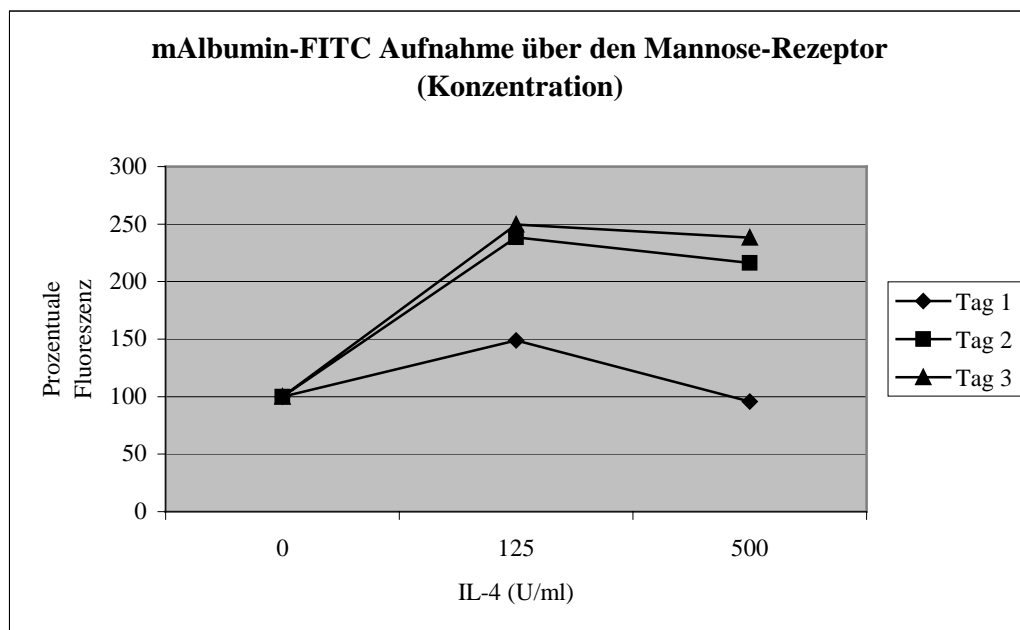


Abb. 3.21: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Die Hälfte der Ansätze enthielt noch 10 mg/ml Mannan. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Der Anteil der Endozytose unter Anwesenheit von Mannan an der gesamten Endozytose wird ermittelt. Dieser Wert wird von der gleich 100 % gesetzten Gesamtaufnahme subtrahiert. Der so erhaltene Wert wird dann in Bezug zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Dadurch kann die Aktivität des Mannose-Rezeptors nach Stimulation (in Bezug auf die Kontrolle) bestimmt werden. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen. Es ist das Ergebnis von drei Experimenten zu sehen.

Betrachtet man die Kinetik des Effektes bei den eingesetzten IL-4 Konzentrationen, so ist die zeitliche Abhängigkeit gut zu erkennen (siehe Abb. 3.22).

Während nach Tag 1 bei Stimulation mit 500 U/ml noch kein großer Effekt zu beobachten ist, so steigt dieser über die nächsten beiden Tage massiv an (~116 % bzw. 138 % mehr). Die Rate des Anstiegs ist nach zwei Tagen nicht mehr so stark ausgeprägt wie zuvor.

Am Tag 1 nach der Stimulation mit 125 U/ml IL-4 ist eine stärkere Zunahme der Rezeptor-Aktivität zu beobachten (~48 %), danach ist der Trend in den beiden stimulierten Zellpopulationen allerdings gleich, auch wenn 125 U/ml immer zu einem leicht größeren Effekt führen.

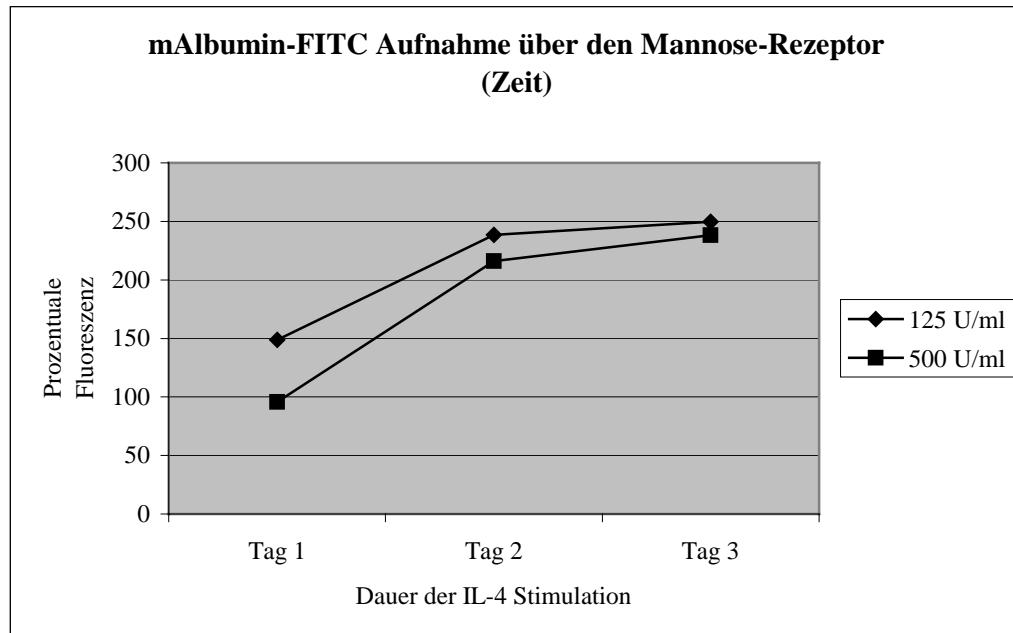


Abb. 3.22: Mikroglia-Zellen wurden für 1-3 Tage mit 125 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 min mit 10 µg/ml mAlbumin-FITC inkubiert. Die Hälfte der Ansätze enthielt noch 10 mg/ml Mannan. Zur Ermittlung der Autofluoreszenz wurden Mikroglia-Zellen genutzt, denen kein Ligand zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Fluoreszenz der Mikroglia-Zellen wurde ermittelt und die Autofluoreszenz subtrahiert. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen, von denen nur die genutzt wurden, die der Fluoreszenz einzelner Zellen entsprach (Gating). Der Anteil der Endozytose unter Anwesenheit von Mannan an der gesamten Endozytose wird ermittelt. Dieser Wert wird von der gleich 100 % gesetzten Gesamtaufnahme subtrahiert. Der so erhaltene Wert wird dann in Bezug zur Kontrolle (=100 %) gesetzt. Dadurch kann die Aktivität des Mannose-Rezeptors nach Stimulation (in Bezug auf die Kontrolle) bestimmt werden. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Dauer der Stimulation aufgetragen. Es ist das Ergebnis von drei Experimenten zu sehen.

Der Effekt der IL-4 Stimulation auf die über den Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose spiegelt klar den der gesamten Endozytose wider. Dies war auch eindeutig zu erwarten, da IL-4 keinen ausgeprägten Effekt auf die anderen Arten der Endozytose in Mikroglia-Zellen aufweist.

Zusammenfassend:

	Gesamtaufnahme	Nicht inhibierbare Aufnahme	Aktivität des Mannose-Rezeptors
125 U/ml	↑↑↑	Leichte Schwankungen	↑↑↑
500 U/ml	↑↑	Leichte Schwankungen	↑↑
Zeitabhängigkeit	Ja	Nein	Ja
Konzentrationsabhängigkeit	Nein	Ja	Leicht

Tab. 3.5 : Effekt der Stimulation mit IL-4 auf die Endozytose in Mikroglia-Zellen

3.4 Charakterisierung der Phagozytose von *Candida albicans* in Mikroglia-Zellen

Die Fähigkeiten von Mikroglia-Zellen zur Mannose-Rezeptor vermittelten Endozytose wurde in dieser Arbeit bereits nachgewiesen.

In den folgenden Experimenten ging es darum zu dokumentieren, ob die Mikroglia-Zellen auch zur Aufnahme (insbesondere über den Mannose-Rezeptor) größerer Partikel fähig sind (Phagozytose). Dies würde ihre potentielle Rolle als immunkompetente Zellen unterstreichen. Als Modellorganismus wurde *Candida albicans* gewählt, die bekanntermaßen in Makrophagen und Dendritischen Zellen über den Mannose-Rezeptor aufgenommen werden. Die Hefen wurden vor den Experimenten durch Autoklavieren abgetötet.

In den nachfolgenden Experimenten wurden alle Inkubationsschritte in reinem DMEM durchgeführt, um eine eventuelle Opsonisierung der Hefe zu verhindern. Dadurch kann die Aufnahme über den Fc-Rezeptor ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit den Hefezellen (Verhältnis 1:100, Mikroglia zu Hefe) inkubiert. Änderungen werden jeweils angegeben.

Anschließend wurden die Zellen nach einem leicht modifizierten Protokoll nach Giaimis et al. (1992) behandelt und in Bezug auf ihre Phagozytose-Aktivität analysiert. Durch diese Färbung ist eine eindeutige Unterscheidung von Hefen inner- und außerhalb von Mikroglia möglich.

Als Darstellung der Aufnahme wurde der Aufnahme-Index gewählt. Dabei handelt es sich um das Produkt der durchschnittlich aufgenommenen Zahl von *C. albicans* in allen Zellen und dem prozentualen Anteil der Mikroglia-Zellen, die mindestens eine Hefe-Zelle aufgenommen haben. Somit wird nicht nur die durchschnittliche Aufnahme berücksichtigt, sondern es erfolgt auch eine Gewichtung der Anzahl der phagozytierenden Mikroglia-Zellen.

3.4.1 Charakterisierung der konstitutiven Phagozytose von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen

3.4.1.1 Ermittlung der Kinetik der Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

Für weiterführende Experimente wurde ermittelt, ob *Candida albicans* von Mikroglia-Zellen phagozytiert werden kann. Daneben sollte die Kinetik dieser Aufnahme dokumentiert werden. Es sollte eine Inkubationszeit ermittelt werden, bei der die Plateauphase der Aufnahme noch nicht erreicht wurde, aber eine ausreichende Phagozytose erfolgte. Dadurch ist es möglich eventuelle modulatorische Effekte durch Stimulation mit Zytokinen zu dokumentieren.

Mikroglia-Zellen wurden mit DMEM gewaschen um eine eventuelle Opsonisierung der Hefe-Zellen zu verhindern. Die Mikroglia-Zellen wurden mit den Hefe-Zellen (1:100) für verschiedene Zeiträume (15-90 min) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurde ermittelt und für die weitere Analyse genutzt.

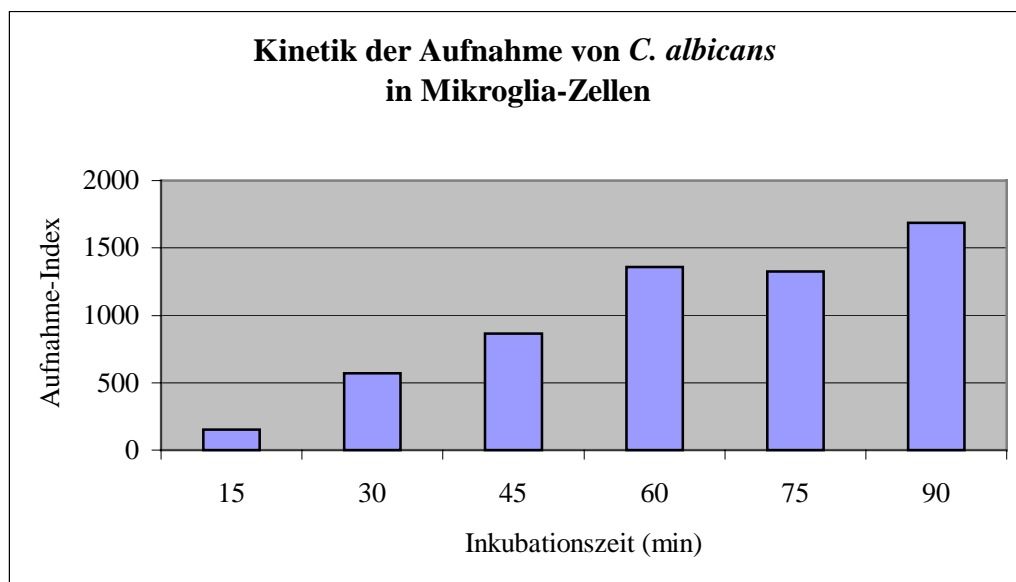


Abb. 3.23: Mikroglia wurden mit *C. albicans* (im Verhältnis 1:100) für 15-90 min inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die Analyse gefärbt. Pro Kondition wurden 212 Mikroglia-Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und deren Hefegehalt ermittelt. Der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurde bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

Es kommt bereits nach 15 min zu einer Aufnahme von Hefen durch die Mikroglia-Zellen (Abb. 3.23). Diese Aufnahme nimmt bis zu einer Inkubationsdauer von 90 min zu (Aufnahme-Index von ~152 auf ~1688). Zwischen 60 und 75 min Inkubation kommt es zu keiner weiteren Zunahme des Aufnahme-Index. Nach 90 min ist eine weitere Zunahme zu beobachten, die den höchsten erreichten Aufnahme-Index in diesem Experiment darstellt. Aus diesem Experiment ist nicht zu erkennen, wann der Übergang in die Plateauphase erfolgt. Um die Aufnahme der Hefen über längere Zeiträume zu dokumentieren und den Übergang in die Plateauphase zu ermitteln, wurden die Mikroglia wie zuvor behandelt und für die Dauer von 90-300 min mit Hefe inkubiert.

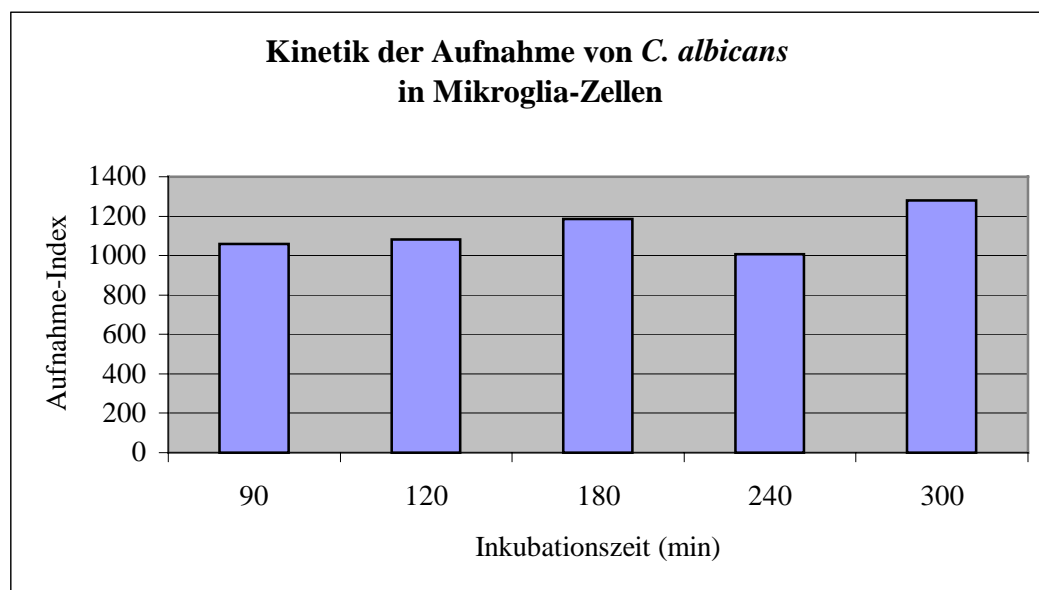


Abbildung 3.24: Mikroglia wurden für 90-300 min mit *C. albicans* (im Verhältnis 1:100) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die Analyse gefärbt. Von je 212 Mikroglia-Zellen wurde unter dem Mikroskop der Gehalt an aufgenommener Hefe ermittelt. Der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurden ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

In diesem Experiment wurde ein geringerer Aufnahme-Index ermittelt. Dies ist auf die Heterogenität der Zellen zurückzuführen, die mit dem von uns verwendeten Protokoll gewonnen werden.

Die Inkubation der Zellen über 90 min hinaus führt zu keiner stark erhöhten Aufnahme von *C. albicans* in den Mikroglia-Zellen (Abb. 3.24). Es kommt zu leichten Schwankungen zwischen den analysierten Zeitpunkten, diese sind aber nicht mit den Zunahmen die bei kürzeren Inkubationszeiten zu beobachten sind (Abb. 3.23) vergleichbar.

Innerhalb der gewählten Inkubationszeiten kommt es noch zu keinem Abbau der internalisierten Hefe. Der Abbau der Zellen ist erst nach längeren Inkubationszeiten zu beobachten (nicht dargestellt) und Trümmer der Hefe sind auch noch nach 24 h zu erkennen. Dies bedeutet, dass die Mikroglia-Zellen Hefe bis zu einem gewissen Grad aufnehmen und danach keine weitere Aufnahme mehr erfolgt.

Die Aufnahme von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen steigt innerhalb der ersten 60 min linear an. Ab 90 min erfolgt der Übergang in die Plateauphase der Aufnahme, die Zellen nehmen dann nur noch wenig bzw. keine weiteren Hefen auf.

Für die weiteren Experimente wurde die Inkubationszeit von 45 min gewählt. Bei dieser Inkubationsdauer sind zum einen bereits viele Hefen aufgenommen, die Plateauphase ist allerdings noch nicht erreicht. Daher sollte es möglich sein eventuell positive bzw. negative Modulationen der Aufnahme zu erfassen.

3.4.1.2 Ermittlung der Rolle des Mannose- und der β -Glucan-Rezeptoren bei der Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

3.4.1.2a Inhibition der Aufnahme von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen durch verschiedene Konzentrationen des Inhibitors Mannan

Mit Experiment 3.4.1.1 konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia-Zellen zur Aufnahme von *C. albicans* fähig sind.

Um eine Beteiligung des Mannose-Rezeptors bei dieser Aufnahme nachzuweisen, wurde der Effekt von Mannan auf die Aufnahme der Hefe in Mikroglia-Zellen untersucht. Mannan bindet spezifisch an den Mannose-Rezeptor und kompetitiert so mit anderen Liganden um die Bindung an den Rezeptor. Eine Reduktion der Phagozytose von *C. albicans* durch Mannan würde somit für eine über den Mannose-Rezeptor vermittelte Aufnahme sprechen. Daneben sollte bestimmt werden (falls Aufnahme über den Mannose-Rezeptor erfolgt), welche Mannan-Konzentration in weiterführenden Experimenten zu wählen ist, um auch noch bei modulierten Bedingungen eine ausreichende Inhibition zu gewährleisten.

Mikroglia-Zellen wurden zweimal mit DMEM gewaschen, um das vorhandene FCS auszuwaschen und eine eventuelle Opsonisierung zu verhindern. Danach wurden die Zellen für 15 min mit verschiedenen Konzentrationen an Mannan (2-10 mg/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Mannan zugesetzt wurde.

Nach Ablauf der Präinkubation erfolgte die Zugabe der Hefen und die Inkubation für 45 min. Nach der Inkubation wurden die Zellen gefärbt und der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurde unter dem Mikroskop ermittelt.

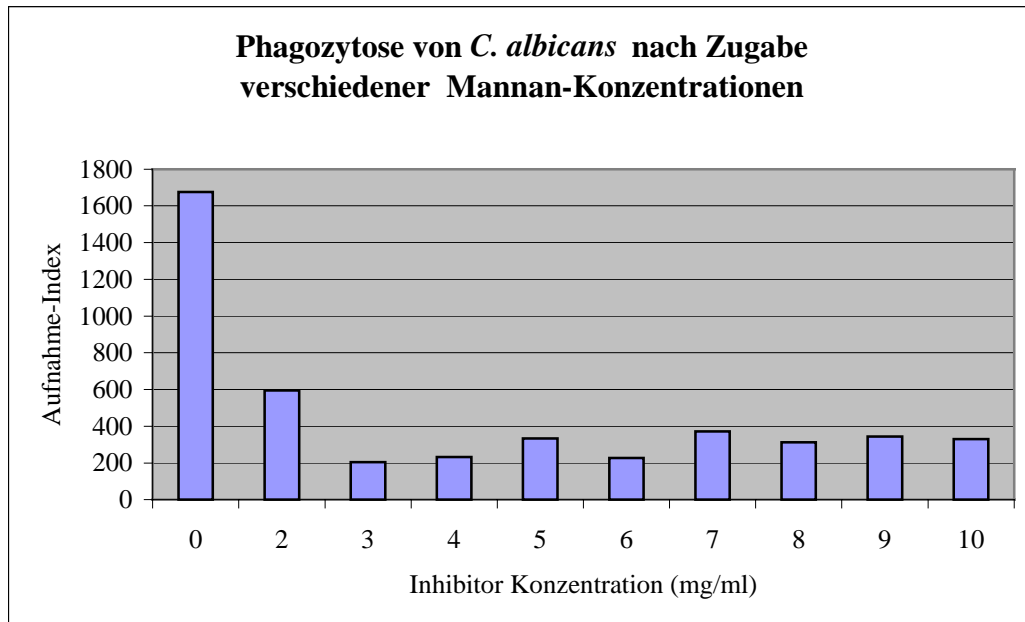


Abb. 3.25: Mikroglia-Zellen wurden für 15 min mit Mannan (2-10 mg/ml) und dann für 45 min mit Hefe (1:100) inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Mannan zugesetzt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen für die Analyse gefärbt. Je 212 Mikroglia-Zellen wurden auf ihren Gehalt an Hefen analysiert, der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurden ermittelt und gegen die Mannan-Konzentration aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, weist Mannan bereits bei einer Konzentration von 2 mg/ml einen inhibitorischen Effekt auf. Der Aufnahme-Index sinkt von ~1675 auf ~595 ab. Die weitere Erhöhung der Mannan-Konzentration führt zu einer weiteren Zunahme der Inhibition (Aufnahme-Index zwischen ~204 und ~390). Es kommt bei höheren Konzentrationen zwar zu kleineren Schwankungen, diese weisen jedoch kein eindeutig zu erkennendes Muster auf.

Die Aufnahme von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen erfolgt somit teilweise über den Mannose-Rezeptor, da sie durch Zugabe des um die Bindung an den Mannose-Rezeptor kompetitierenden Mannan inhibiert werden kann.

Für weitere Experimente wurde die Mannan-Konzentration von 10 mg/ml gewählt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass auch bei einer Erhöhung der Mannose-Rezeptor Aktivität eine ausreichende Inhibition erreicht werden kann.

3.4.1.2b Vergleich des inhibitorischen Effekts von Mannan und Laminarin auf die Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

Es ist bekannt, dass *C. albicans* in Makrophagen nicht nur über den Mannose-, sondern auch über β -Glukan-Rezeptoren aufgenommen werden kann. Um zwischen der Aufnahme über die beiden verschiedenen Rezeptoren unterscheiden zu können, wurden zwei jeweils spezifische Inhibitoren eingesetzt. Im Falle des Mannose-Rezeptors war dies Mannan, im Falle der β -Glukan-Rezeptoren wurde Laminarin verwendet. Durch die Gabe dieser beiden Inhibitoren ist es möglich zu unterscheiden, welcher der Rezeptoren an der Aufnahme von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen beteiligt ist.

Die Zellen wurden mit reinem DMEM gewaschen, um das noch vorhandene FCS zu entfernen und so eine Opsonisierung zu verhindern. Dann wurden die Zellen für 15 min mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Es wurden je 10 mg/ml Mannan, Laminarin oder eine Kombination aus beiden zugesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Inhibitor zugegeben wurde.

Nach der fünfzehnminütigen Präinkubation mit den Inhibitoren wurden die Mikroglia-Zellen für verschiedene Zeiträume (15-60 min) mit den Hefe-Zellen (Verhältnis 100:1 Hefe zu Mikroglia) und den Inhibitoren inkubiert. Die Zellen wurden gefärbt und der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurde ermittelt.

Die Inkubation mit Mannan führt zu allen betrachteten Zeiträumen zur stärksten Inhibition der Aufnahme von *C. albicans* (Abb. 3.26).

Im Falle von Laminarin kann jeweils nur eine geringe Inhibition beobachtet werden. Auch durch eine Kombination von beiden Inhibitoren kann, im Vergleich zur Addition von Mannan alleine, keine signifikante Zunahme der Inhibition beobachtet werden. Das bedeutet, dass in den Mikroglia-Zellen, die Aufnahme der Hefen nicht oder nur zu einem geringen Teil über die β -Glukan-Rezeptor erfolgt.

Das heißt im Falle der verwendeten Mikroglia-Zellen erfolgt die Aufnahme von *C. albicans* hauptsächlich über den Mannose-Rezeptor. In allen nachfolgenden Experimenten wurde daher nur dieser Rezeptor näher analysiert.

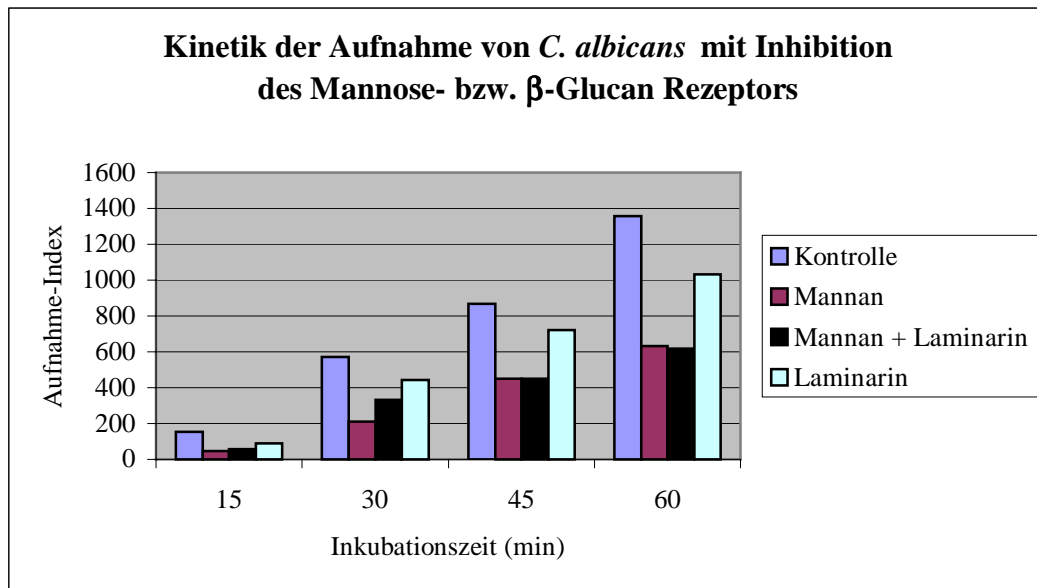


Abb. 3.26: Mikroglia-Zellen wurden für 15 min mit 10 mg/ml Mannan, 10 mg/ml Laminarin oder einer Kombination aus beiden inkubiert. Danach wurden sie mit *C. albicans* versetzt, für verschiedene Zeiträume (15-60 min) inkubiert und anschließend für die Analyse gefärbt. Je 212 Mikroglia-Zellen wurden auf ihren Gehalt an Hefen analysiert, der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurden ermittelt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments dargestellt.

3.4.1.2c Analyse der über den Mannose-Rezeptor und der nicht über den Mannose-Rezeptor vermittelte Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* in Mikroglia-Zellen aufgenommen wird (Abb. 3.23) und diese Aufnahme durch Mannan inhibiert werden kann (Abb. 3.25). In diesem Experiment sollte die Kinetik der Aufnahme von *C. albicans* mit Inhibition durch Mannan, mit der in uninhibierten Zellen verglichen werden. Dadurch können weitere Aussagen über die Aufnahmemodalitäten der Hefen in Mikroglia-Zellen gemacht werden.

Mikroglia-Zellen wurden 2 x mit DMEM gewaschen und dann für 15 min mit 10 mg/ml Mannan inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, denen kein Mannan zugesetzt wurde. Nach der Präinkubation wurden die *C. albicans* in einem 100:1 Verhältnis zugegeben und dann wurden die Zellen für verschiedene Zeiträume (15-90 min) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend nach dem Standardprotokoll gefärbt und der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) ermittelt.

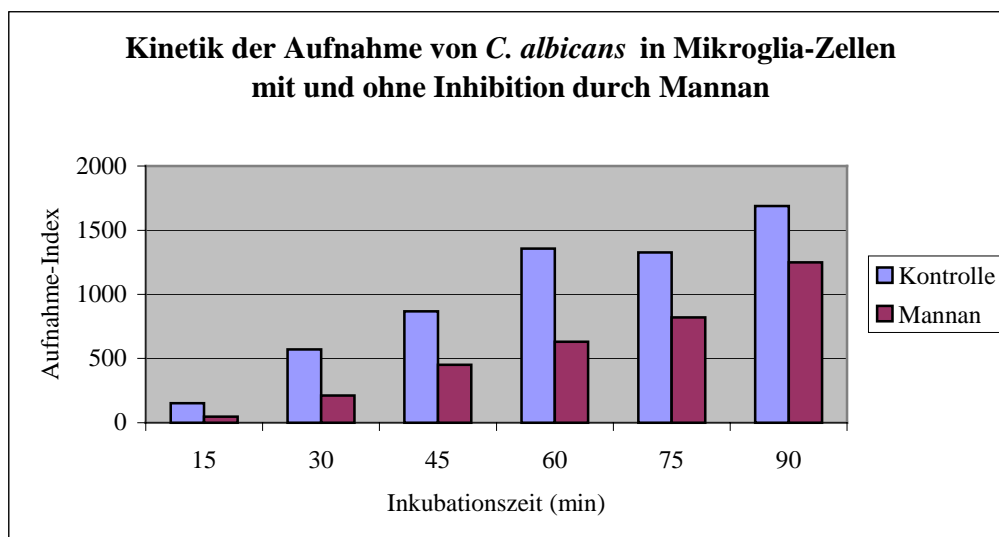


Abb. 3.27: Mikroglia wurden für 15 min mit 10 mg/ml Mannan oder reinem DMEM inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 15-90 min mit *C. albicans* (1:100). Die Zellen wurden für die Analyse gefärbt. Es wurden pro Kondition 212 Mikroglia-Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurde ermittelt. Die Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments dargestellt.

Wie aus Abbildung 3.27 zu sehen ist, kommt es zu allen betrachteten Zeitpunkten zu einer Inhibition der Phagozytose von *C. albicans* durch die Zugabe von Mannan.

Wie in Abbildung 3.28 zu sehen ist, nimmt die Differenz zwischen den inhibierten und uninhibierten Ansätzen mit steigender Inkubationsdauer ab. Dies bedeutet, dass die Mikroglia-Zellen mit steigender Inkubationsdauer die Hefen verstärkt über andere Mechanismen und nicht über den Mannose-Rezeptor aufnehmen. Während der Anteil, der über den Mannose-Rezeptor aufgenommen wird, bei 15 min Inkubationszeit noch ~69 % beträgt, sinkt dieser Anteil bei 90 min Inkubation auf ~27 % ab.

Um den Effekt des Inhibitors Mannan auf die Aufnahme der Hefen besser beurteilen zu können, wurden die Mikroglia-Zellen entsprechend ihres Gehalts an Hefen in Intervalle unterteilt. Wie in Abbildung 3.29 zu sehen, nehmen die uninhibierten Zellen zum größten Anteil mehr als 10 Hefen auf. Die Addition von 10 mg/ml Mannan führt hingegen dazu, dass die meisten Zellen nur 1-2 Hefen aufnehmen. Abgesehen von diesem und dem letzten Intervall (>10 Hefen/Zelle), ist die Verteilung der Hefen in den Mikroglia-Zellen beider Ansätze sehr ähnlich.

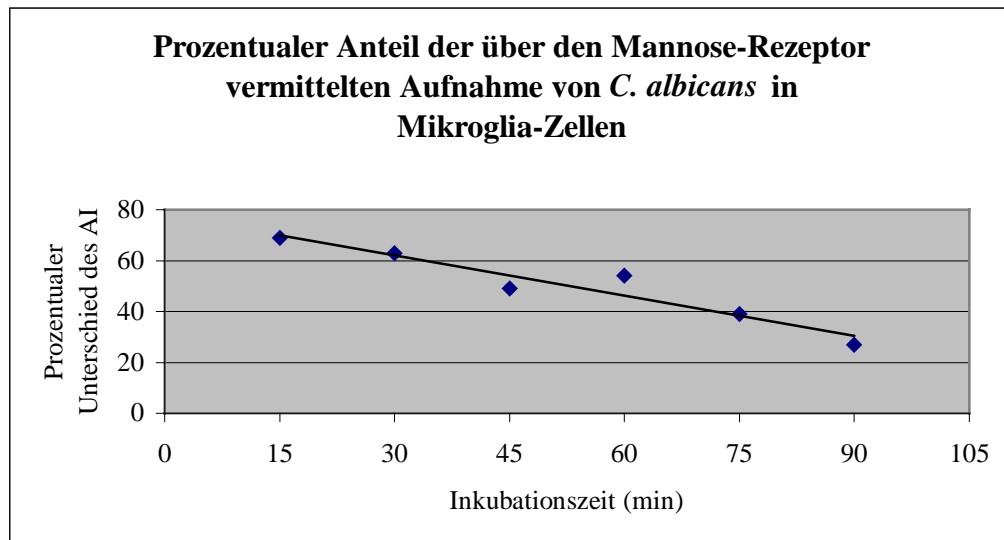


Abb. 3.28: Mikroglia wurden für 15 min mit 10 mg/ml Mannan oder reinem DMEM inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation für 15-90 min mit *C. albicans* (Mikroglia:Hefe, 1:100). Die Zellen wurden für die Analyse gefärbt. Es wurden pro Kondition 212 Mikroglia-Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und der Aufnahme-Index (Produkt aus der durchschnittlichen Anzahl aufgenommener Hefen und dem Prozentsatz der Zellen die Hefe aufgenommen haben) wurde ermittelt. Der über den Mannose-Rezeptor vermittelten Teil der Aufnahme wurde ermittelt (Subtraktion des Aufnahme-Index nach Inhibition vom Aufnahme-Index der Gesamtaufnahme) und prozentual dargestellt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen.

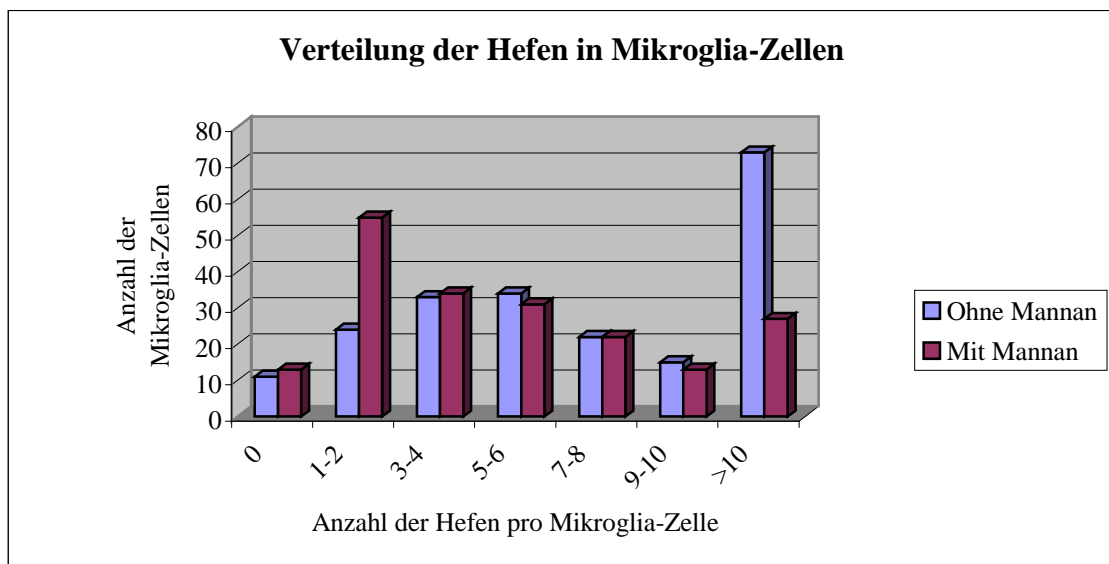


Abb. 3.29: Mikroglia wurden für 15 min mit 10 mg/ml Mannan oder reinem DMEM inkubiert. Nach der Präinkubation wurden die Zellen mit *C. albicans* (im Verhältnis 1:100) für 45 min inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die Analyse gefärbt. Pro Kondition wurden 212 Mikroglia-Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und deren Hefegehalt ermittelt. Die Mikroglia-Zellen wurden aufgrund ihres Hefegehalts in Intervalle unterteilt. Die Werte wurden gegen die Intervalle aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

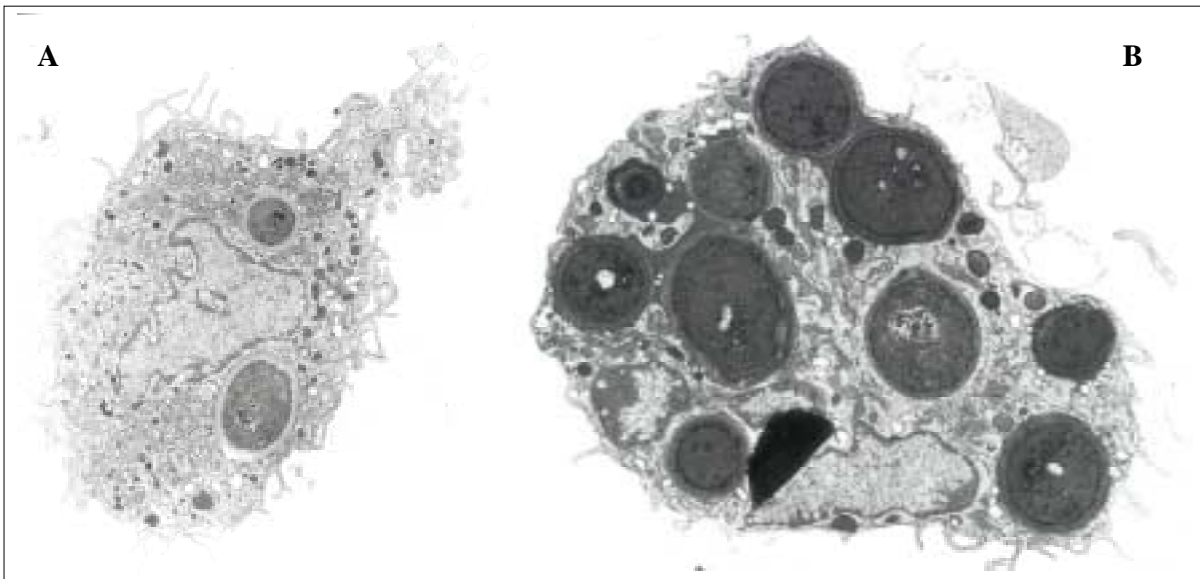


Abb. 3.30: **Elektronen-mikroskopische Aufnahme von Mikroglia-Zellen mit *C. albicans***. Mikroglia-Zellen wurden für 45 min mit *C. albicans* inkubiert, nicht aufgenommene Hefe wurde ausgewaschen. Dann wurden die Zellen für die Elektronenmikroskopie vorbereitet und analysiert. (A) Mikroglia-Zelle mit 2 *C. albicans* (B) Mikroglia-Zelle mit 10 *C. albicans*

Die unterschiedliche Aufnahme der Hefen in Mikroglia-Zellen ist in elektronenmikroskopischen Bildern besonders gut zu sehen. In Abb. 3.30 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von zwei Zellen zu sehen, die in der dargestellten Ebene 2 bzw. 10 Hefen aufgenommen hatten.

3.4.2 Ermittlung der Auswirkungen einer Stimulation mit Zytokinen auf die Phagozytose von *C. albicans* durch Mikroglia-Zellen

Zellen des Immunsystems werden in ihrer Funktionalität durch mehrere Faktoren beeinflusst. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation der Immunantwort, die so an die jeweiligen Erfordernisse angepasst werden kann.

In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob zwei „klassische“ Zytokine die Phagozytose-Aktivität von Mikroglia-Zellen beeinflussen könne. Als Zytokine wurden wiederum das pro-inflammatorisch wirkende IFN- γ und das anti-inflammatorische IL-4 gewählt.

Auch hier erfolgte eine Stimulation für 1-3 Tage und die Inkubation mit und ohne Zugabe des Inhibitors Mannan. Wie sich allerdings zeigte, ist es nicht möglich eindeutige Aussagen über die Aufnahme nach Inhibition zu machen. Im Falle von IFN- γ konnten auch keine eindeutigen Ergebnisse für drei Tage Stimulation gemacht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente werden nicht gezeigt.

3.4.2.1 Modulation der Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ

Die Auswirkungen einer Stimulation mit IFN- γ auf die Phagozytose in Mikroglia sollte ermittelt werden. Dazu wurden Mikroglia-Zellen für 1-2 Tage mit IFN- γ stimuliert. Das Zytokin wurde in den Konzentrationen 25, 50 und 100 U/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen benutzt, die nicht mit Zytokin versetzt, aber ansonsten gleich behandelt wurden.

Nach der Stimulation wurden die Zellen gefärbt und unter dem Mikroskop wurde die Aufnahme der Hefen analysiert. Die ermittelten Werte wurden als Aufnahme-Index (durchschnittliche Anzahl der Hefen x Prozentsatz der Zellen, die phagozytierten) dargestellt und dann in Bezug zum Aufnahme-Index der Kontrolle (=100 %) gesetzt.

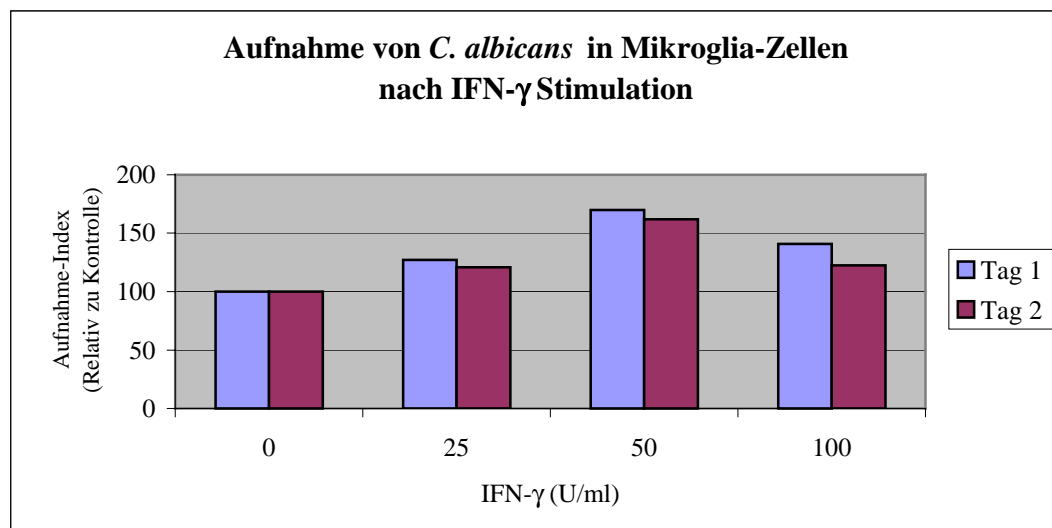


Abb. 3.31: Mikroglia-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen IFN- γ (25, 50 u. 100 U/ml) für 1-2 Tage stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Zytokin zugegeben wurde. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen 45 min mit *C. albicans* (1:100) inkubiert, danach gefärbt und dann unter dem Mikroskop analysiert. Es wurden pro Experiment je 196 Mikroglia-Zellen auf ihren Gehalt an *C. albicans* analysiert. Der Aufnahme-Index (durchschnittliche Anzahl der Hefen x Prozentsatz der Zellen, die phagozytierten) wurde ermittelt und dann in Relation zu dem der Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die erhaltenen Werte (Mittelwerte der drei Experimente) wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

Alle getesteten Zytokin-Konzentrationen führten zu einer verstärkten Aufnahme von *C. albicans* durch die Mikroglia-Zellen, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.31).

Vergleicht man die Zunahme der beiden Tage miteinander, so ist zu sehen, dass der Effekt am zweiten Tag leicht abnimmt. Es erscheint, als würde der Effekt der Stimulation mit

zunehmender Dauer der Stimulation nachlassen. Dafür spricht auch, dass dieses Muster auch am dritten Tag zu sehen ist (nicht dargestellt).

Der stärkste Effekt ist an beiden Tagen bei der Stimulation mit 50 U/ml IFN- γ zu sehen (~69 % bzw. ~61 %). Die Zunahme des Aufnahme-Index ist am ersten Tag bei einer Konzentration von 25 U/ml mit ~27 % am geringsten. Bei einer Konzentration von 100 U/ml ist eine Zunahme um 40% zu sehen. Am Tag 2 hingegen ist die Zunahme bei den Konzentrationen 25 U/ml und 100 U/ml vergleichbar (~20 % bzw. ~ 22 %).

Man kann insgesamt eine Konzentrations-Abhängigkeit bei den getesteten IFN- γ Konzentrationen erkennen. Es ist ebenfalls ein zeitabhängiger Effekt zu sehen, da der Effekt von Tag 1 auf Tag 2 in allen Fällen abnimmt.

Zusammenfassend:

IFN- γ	25 U/ml	50 U/ml	100 U/ml
Zeitabhängig	Ja	Ja	Ja
Tag 1	↑	↑↑	↑
Tag 2	↑	↑↑	↑

Tab.3.6: Effekt von IFN- γ auf die Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

3.4.2.2 Modulation der Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen nach Stimulation mit IL-4

Die Auswirkung von IL-4 auf die Phagozytose-Aktivität in Mikroglia-Zellen sollte untersucht werden. Hierzu wurden Mikroglia-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen IL-4 (125, 250 und 500 U/ml) IL-4 für 1-3 Tage stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Zytokin stimuliert, die aber ansonsten gleich behandelt wurden.

Nach der Stimulation wurden die Mikroglia-Zellen mit *C. albicans* im Verhältnis 1:100 versetzt und anschließend für die Analyse gefärbt. Der Aufnahme-Index (durchschnittliche Anzahl der Hefen x Prozentsatz der Zellen, die phagozytierten) wurde ermittelt und dann in Relation zur Kontrolle gesetzt, deren Aufnahme-Index gleich 100 % gesetzt wurde.

Nach Stimulation mit IL-4 ist bei allen drei getesteten Zytokin-Konzentrationen (125, 250 und 500 U/ml) eine Zunahme der Phagozytose-Aktivität, im Vergleich zur Kontrolle, zu erkennen (Abb. 3.32).

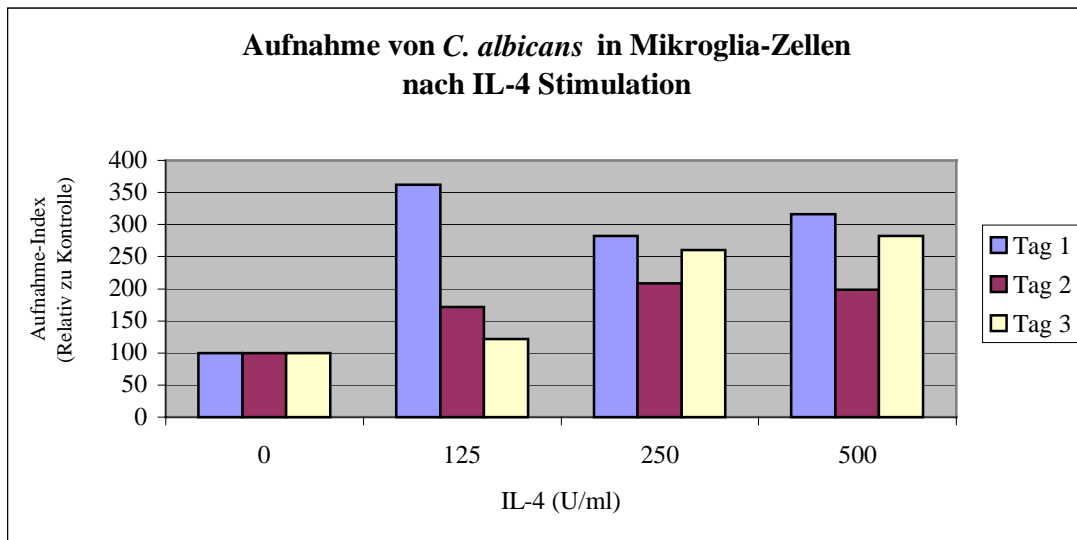


Abb. 3.32: Mikroglia-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen IL-4 (125, 250 u. 500 U/ml) für 1-3 Tage stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Zytokin zugegeben wurde. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen 45 min mit *C. albicans* (1:100) inkubiert, danach gefärbt und dann unter dem Mikroskop analysiert. Es wurden pro Experiment je 196 Mikroglia-Zellen auf ihren Gehalt an *C. albicans* analysiert. Der Aufnahme-Index (durchschnittliche Anzahl der Hefen x Prozentsatz der Zellen, die phagozytierten) wurde ermittelt und dann in Relation zu dem der Kontrolle (=100 %) gesetzt. Die erhaltenen Werte (Durchschnitte zweier Experimente) wurden gegen die Zytokin-Konzentration aufgetragen.

Tag 1 nach der Stimulation steigt der Aufnahme-Index im Vergleich zur Kontrolle um bis zu ~260 % an (bei 125 U/ml). Bei Stimulation mit 250 U/ml nimmt der Aufnahme-Index nur um ~182 % zu, bei 500 U/ml ist ein Anstieg um ~215 % zu beobachten. Tag 1 nach der Stimulation ist somit eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von IL-4 festzustellen.

Nach zwei Tagen Stimulation ist eine maximale Zunahme des Aufnahme-Index um ~108 % in Bezug zur Kontrolle zu beobachten. Es kommt somit zu einem geringeren Effekt, als am Tag 1 nach der Stimulation. Die Stimulation mit 125 U/ml führt zu diesem Zeitpunkt zur geringsten Zunahme des Aufnahme-Index (~71 %). Die Stimulation mit 250 U/ml führt zu einem Anstieg um ~108 %, die bei Stimulation mit 500 U/ml allerdings wieder leicht abfällt (~98 % Anstieg). Somit ist auch am Tag 2 nach Stimulation eine Abhängigkeit von der Zytokin-Konzentration zu beobachten, allerdings führt hier die Stimulation mit 125 U/ml nicht mehr zum größten Effekt.

Nach drei Tagen Stimulation mit IL-4 ist wieder ein leichter Anstieg der maximalen Zunahme des Aufnahme-Index, im Vergleich zur Kontrolle, zu beobachten (~181 %). Zu diesem Zeitpunkt ist eine direkte Abhängigkeit von der Zytokin-Konzentration zu beobachten. So führt die Stimulation mit 125 U/ml um eine Zunahme von ~22 %, die Stimulation mit 250 U/ml um eine Zunahme um ~159 % und die mit 500 U/ml um ~181 %.

Der Vergleich der drei analysierten Tage ergibt somit keine direkte zeitliche Abhängigkeit der Stimulation mit IL-4. Eine lineare zeitliche Abhängigkeit ist nur im Falle von 125 U/ml zu beobachten, da es über die drei Tage betrachtet zu einer steten Abnahme der Wirkung kommt. Die Stimulation mit 250 bzw. 500 U/ml führt zu einer Abnahme des Effektes am Tag 2, am Tag 3 nach der Stimulation kommt es hingegen wieder zu einer Zunahme des Aufnahme-Index.

Somit ist nur eine Konzentrationsabhängigkeit der Phagozytose ist nach Stimulation mit IL-4 festzustellen.

Zusammenfassend:

IL-4	125 U/ml	250 U/ml	500 U/ml
Zeitabhängig	Ja	Nein	Nein
Tag 1	↑↑	↑	↑
Tag 2	↑	↑↑	↑↑
Tag 3	↑	↑↑	↑↑↑

Tab.3.7 : Effekt von IL-4 auf die Phagozytose von *C. albicans* in Mikroglia-Zellen

3.5 Aktivierung von Mikroglia-Zellen durch ein Pathogen

3.5.1 Ermittlung der MHC-II-Expression in Mikroglia-Zellen

Die Auswirkung von *C. albicans* auf die Expression von MHC-II in Mikroglia-Zellen sollte untersucht werden. Dazu wurden Mikroglia-Zellen für 1 und 2 Tage mit *C. albicans*, IFN- γ , Mannan oder reinem DMEM versetzt. IFN- γ wird in diesem Fall als Positivkontrolle verwendet, da die Zellen normalerweise nur geringe Mengen MHC-II exprimieren und IFN- γ die Expression erhöht. Nach der Inkubation wurden die Zellen gegen MHC-II gefärbt und mittels FACS-Scan analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen kein Primärantikörper zugegeben wurde.

Wie in Abbildung 3.33 zu sehen, kommt es am Tag 1 durch die Stimulation mit IFN- γ nur zu einer geringen Erhöhung der MHC-II-Expression. Am Tag 2 exprimieren die stimulierten Zellen hingegen doppelt so viel MHC-II, wie die nicht-stimulierten Kontrollen. Die Zugabe von *C. albicans* hat keine Auswirkung auf die MHC-II-Expression der Mikroglia-Zellen. Die Gabe von 10 mg/ml Mannan führt hingegen zu einer Reduktion der MHC-II-Expression.

Dieser Effekt ist am Tag 1 (~46 %) stärker ausgeprägt, als am Tag 2 (~19 %). Er ist aber auch am Tag 2 deutlich zu sehen.

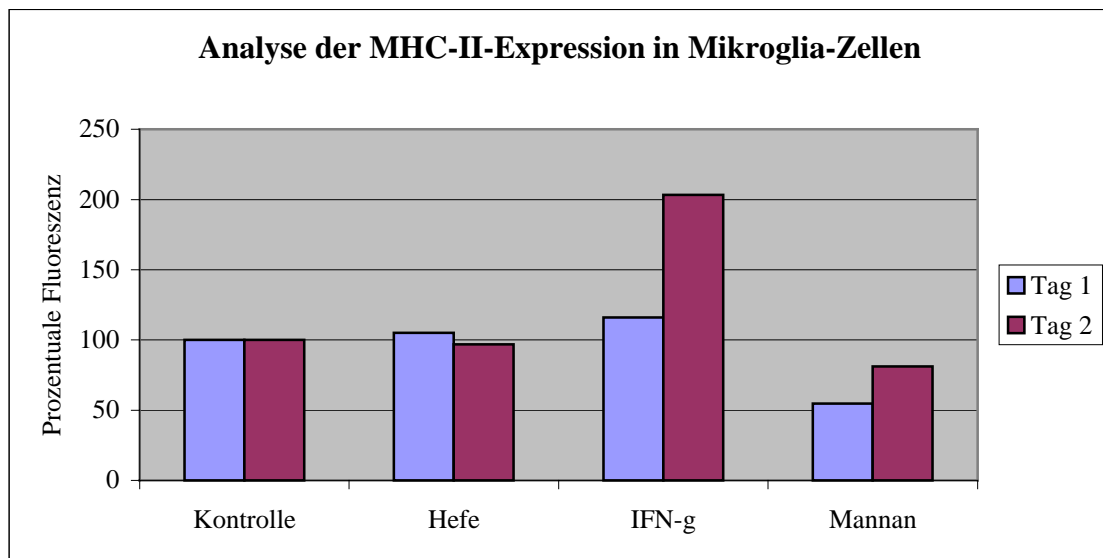


Abb. 3.33: Mikroglia-Zellen wurden für 1-2 Tage mit DMEM, *C. albicans*, 100 U/ml IFN- γ oder 10 mg/ml Mannan versetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen gegen MHC-II gefärbt und anschließend mittels eines FACS-Scanners analysiert. Die Autofluoreszenz wurde von Zellen, die ohne Primärantikörper gefärbt wurden, ermittelt und von den anderen Ansätzen subtrahiert. Die so erhaltenen Werte wurden in Bezug zur Kontrolle (nur DMEM) gesetzt und gegen die Kulturbedingungen aufgetragen. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments zu sehen.

3.5.2 Zytokin-Ausschüttung durch Mikroglia-Zellen nach Inkubation mit *C. albicans* bzw. Mannan

Es ist bekannt, dass Makrophagen und Mikroglia-Zellen auf den Kontakt mit potentiellen Pathogenen reagieren. Es kommt zu einer Aktivierung der Zellen, die dazu führt, dass Zytokine ausgeschüttet werden, die den weiteren Verlauf der Ereignisse beeinflussen.

In diesen Experimenten sollte der Effekt von *C. albicans* und Mannan auf die Zytokin-Ausschüttung durch Mikroglia-Zellen untersucht werden. Dazu wurden Mikroglia-Zellen für 45 min mit *C. albicans* (1 : 10, Hefe : Mikroglia), Mannan (10 mg/ml) oder reinem Medium (Kontrolle) versetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen intensiv gewaschen, um die Hefe und das Mannan vollständig zu entfernen (Kontroll-Zellen wurden gleich behandelt). Danach wurden die Zellen für bis zu drei Tage inkubiert und der Überstand nach 1, 2 und 3 Tagen abgenommen, gefiltert und bis zur Analyse bei -80°C gehalten. Die Analyse erfolgte mittels käuflich erworbener ELISA-Assays.

Aufgrund der hohen Schwankungen zwischen den Experimenten und der geringen Anzahl der durchgeführten Experimente, werden hier nur die Trends besprochen, die innerhalb der verschiedenen Experimente jedoch gleich waren.

	IFN- γ	IL-12	TNF- α
Ausschüttung in Kontroll-Zellen	Nein	Nein	Ja
Ausschüttung nach Zugabe von <i>C. albicans</i>	Nein	Ja	Ja
Ausschüttung nach Zugabe von Mannan	Nein	Ja	Ja
Größter Effekt nach Addition von:		Mannan	Mannan
Konzentrationsänderung über die Zeit		Abnehmend	Zunehmend (Kontrolle bleibt gleich)

Tab. 3.8: Ergebnis der Ermittlung (ELISA-Assay) der Zytokin-Ausschüttung durch Mikroglia-Zellen. Es ist der Trend dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

Wie in Tabelle 3.8 zu sehen, schütten die Mikroglia-Zellen auch nach einer Inkubation mit *C. albicans* bzw. Mannan kein IFN- γ aus. Die Zugabe von Hefen bzw. Mannan löst hingegen eine Ausschüttung von IL-12 aus, wobei es nach Gabe von Mannan zu einer stärkeren Ausschüttung kam. Die Ausschüttung von IL-12 geht über den beobachteten Zeitraum zurück. Die Mikroglia-Zellen schütten auch ohne Stimulation TNF- α aus. Durch die Gabe von *C. albicans* bzw. Mannan wird die Freisetzung des TNF- α erhöht. Es ist zu sehen, dass die Zellen über den beobachteten Zeitraum mit zunehmender Inkubationszeit mehr TNF- α ausschütten. Auch im Falle von TNF- α ist der Effekt stärker, wenn Mannan zugegeben wird. Vergleicht man die Konzentrationen der freigesetzten Zytokine, so ist zu sehen, dass die Zellen vergleichsweise am meisten TNF- α freisetzen.

3.6 Etablierung der Kultur von Hirnschnitten

Um ein näher an der *in vivo* Situation liegendes Milieu zu schaffen, wurde versucht mit Schnittkulturen aus Mäusehirnen zu arbeiten. Dazu wurden die Hirne junger Mäuse (P4-P8) entnommen und mittels eines Vibratoms geschnitten. Diese Schnitte wurden dann in Kultur genommen und nach verschiedenen Zeitpunkten für weiterführende Untersuchungen gegen verschiedene zelluläre Markerproteine gefärbt.

Bereits zu Beginn der Kultur konnten einige Zellen beobachtet werden, die aus den Schnitten auswanderten. Dabei handelte es sich allerdings nur um wenige Zellen, die ihre Migration rasch wieder einstellten. Die Morphologie des gesamten Schnittes blieb auch nach längerer Kultur erhalten (Abb. 3.34).

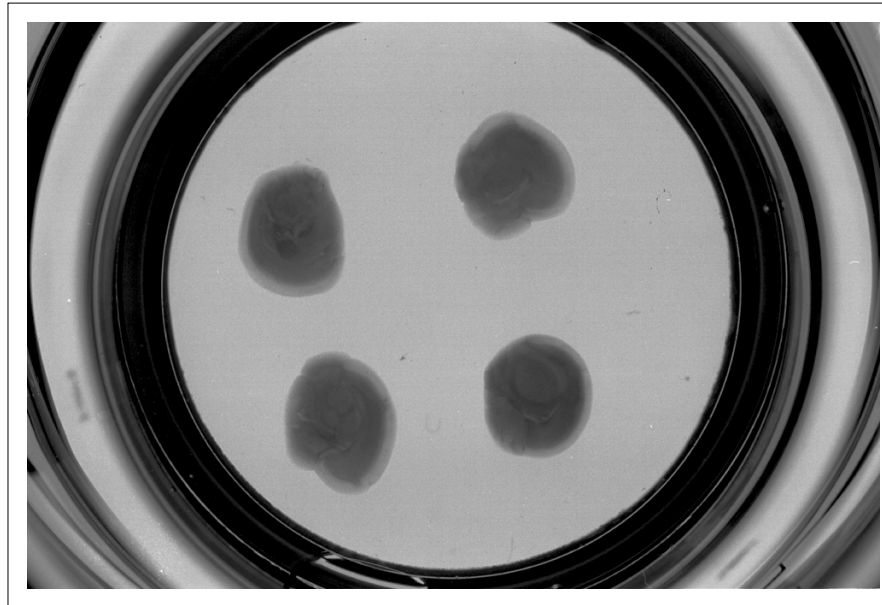


Abb. 3.34: **Schnittkulturen.** Gehirne von P8 Mäusen wurden mittels einer Vibratome geschnitten und dann auf spezielle Filter transferiert. Das Kulturmedium der Gewebeschnitte wurde alle 2 Tage gewechselt. Die hier zu sehenden Schnitte (Hemisphären) sind eine Woche alt.

Die Gehirnschnitte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und gegen verschiedene zelluläre Markerproteine und den Mannose-Rezeptor gefärbt. Wie in Abbildung 3.35 zu sehen ist, war nach Färbung gegen den neuronalen Marker MAP-2 und gegen den Astrozyten Marker GFAP ein starkes Signal zu sehen. Die Färbung gegen die Mikroglia-Zellen Marker Mac-1 und F4/80 ergab nur ein schwaches, diffuses Signal. Auch die Färbung gegen den Mannose-Rezeptor ergab kein eindeutiges Signal. Ein kräftiges Signal mit dem α -Mannose-Rezeptor Antikörper ergab sich nur in frisch präparierten Schnitten und hier nur in der Peripherie und in der Nähe der Blutgefäße (nicht gezeigt). Da die hier positiven Zellen nicht gegen zelluläre Marker gefärbt werden konnten, ist unklar, um welche Zellen es sich dabei handelte.

Zur Kontrolle wurden auch Gewebeschnitte von total fixierten Mäusen gefärbt, doch auch hier ergab sich kein anderes Bild (nicht gezeigt). Die eingesetzten Marker für Mikroglia-Zellen können somit nicht zur Färbung von Schnitten aus der Gewebekultur verwendet werden. Das Signal des α -Mannose-Rezeptor-Antikörpers war ebenfalls zu diffus und

schwach. Mittels der hier verwendeten Protokolle ist eine Untersuchung der Aktivität des Mannose-Rezeptors und auch der Mikroglia-Zellen nicht möglich.

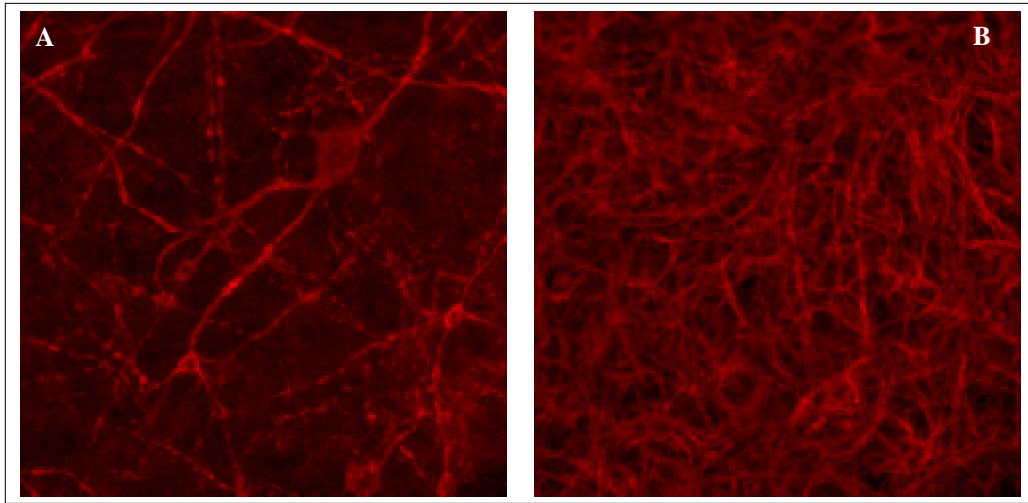


Abb.3.35: **Immunfärbung von Gehirn-Schnittkulturen.** Hirnschnitte aus der Gewebekultur wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker MAP-2 (A) oder den Astrozyten-Marker GFAP (B) gefärbt.