

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin  
aus der Klinik für Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. Peter Marx

**Expression von Chemokinrezeptoren auf  
oligodendroglialen CG – 4 – Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde

der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Uta Henke  
aus Räckelwitz

Referent: PD Dr. med. Martin Stangel

Korreferent: Prof. Dr. med. Ingo Bechmann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 28.03.2006

## **Abstract**

Die Regulation der Migration, Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten ist ein zentraler Schritt für die Myelinisierung im zentralen Nervensystem (ZNS). Chemokine, z.B. CXCL1 oder CXCL12 scheinen in diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen. Des Weiteren sind Chemokine an der Entstehung verschiedener ZNS-Erkrankungen beteiligt, insbesondere bei der Multiplen Sklerose (MS). In der vorliegenden Dissertation wird die Expression von Chemokinrezeptoren auf CG – 4 – Zellen gezeigt. CG – 4 – Zellen entsprechen Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC = oligodendrocyte progenitor cells) und sind aus der Sprague – Dawley – Ratte kultiviert. Mittels rtPCR, cDNA – Sequenzierung und Zytoimmunochemie wurde die Expression von Chemokinrezeptoren auf Vorläuferzellen und unreifen Oligodendrozyten verglichen. Die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR7, CXCR2, CXCR4 und CX3CR1 konnten auf unreifen Zellen und Vorläuferzellen nachgewiesen werden, wobei die Vorläuferzellen außerdem noch den Rezeptor CXCR1 exprimieren. Viele der korrespondierenden Liganden werden vermehrt bei der Inflammation der MS beobachtet und beeinflussen dort z.B. die Proliferation von Astrozyten oder die Migration von Lymphozyten und Mikroglia. Vielleicht haben diese Chemokine auch Einfluss die subventrikulären OPC und können somit eine Remyelinisierung steuern. Damit sind Chemokine mögliche therapeutische Ziele bei der Behandlung der MS.

# Inhaltsverzeichnis

Erklärung

Verzeichnis der Abkürzungen

Verzeichnis der Abbildungen

Seite

1	Einleitung	1
1.1	Oligodendrozyten	1
1.1.1	Entwicklung	1
1.1.2	Struktur und Aufgaben	2
1.2	Multiple Sklerose	3
1.2.1	Pathologie	3
1.3	Chemokine und Chemokinrezeptoren	5
1.3.1	Bedeutung	5
1.3.2	Struktur und Einteilung	5
1.3.3	Chemokine und Chemokinrezeptoren an Zellen des ZNS	7
1.3.4	Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren bei der MS	9
1.4	Aufgabenstellung und Ziel der vorliegenden Arbeit	10
2	Materialien	11
2.1	Geräte und Arbeitsutensilien	11
2.2	Biologische und pharmakologische Substanzen	12
2.3	Chemikalien	13

2.4	Lösungen, Medien, Zusätze für die Zellkultivierung und – verarbeitung	15
2.5	Zelllinien	16
2.5.1	CG – 4 – Zellen	16
2.5.2	B – 104 – Zellen	17
3	Methoden	18
3.1.	Zellkultur	18
3.1.1	Anzucht, Konservierung und Pelletierung der CG – 4 – Zellen	18
3.1.2	Bedingungen für Zellen im CG – 4 – Medium und Zellen im N <sub>2</sub> B <sub>3</sub> – Medium	19
3.1.3	Kultivierung der B – 104 – Zelllinie und Gewinnen Des B – 104 – Überstandes	19
3.2	Zellcharakterisierung und Nachweis von Chemokinrezeptoren durch immunhistochemische Färbung	20
3.2.1	Anzucht der Zellen in 12 – Well – Platten	20
3.2.2	Färbemethode und Antikörper	20
3.2.3	Charakterisierung der Zellen bezüglich Identität und Differenzierungsgrad	20
3.2.4	Nachweis von spezifischen Chemokinrezeptoren	21
3.3	mRNA – Isolierung aus CG – 4 – Pellets	22
3.4	Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)	22
3.4.1	Zusammensetzung der Reagenzien, Modalitäten	22
3.4.2	Primer	23
3.5	Gelelektrophorese	24
3.5.1	Auftragen und Ablesen der PCR – Produkte	24
3.5.2	Größe der einzelnen Rezeptorsequenzen	24

3.6	DNA – Aufreinigung	25
3.7	Sequenzierung	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Zellkultur	27
4.1.1	CG – 4 – Zellcharakterisierung	27
4.1.2	Astrozyten – Typ – 2 – Zellmarkierung	28
4.2	Austestung der Primer/Modifikation der PCR – Parameter	29
4.3	Chemokinrezeptoren	29
4.3.1	PCR – Ergebnisse	29
4.3.2	Immunhistochemische Rezeptormarkierungen	32
4.4	Ergebnisbestätigung durch Sequenzierung	37
5	Diskussion	38
5.1	CG – 4 – Zellkultur	38
5.2	Methodik zum Nachweis der Chemokinrezeptoren	38
5.2.1	Molekulare Ebene	38
5.2.2	Proteinebene	39
5.3	Expression von Chemokinrezeptoren	39
5.4	Relevanz von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozyten – Vorläuferzellen vor dem Hintergrund der erzielten Ergebnisse	40

6	Zusammenfassung	46
	Quellenverzeichnis	48
	Danksagung	54
	Lebenslauf	55