

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 CG – 4 – Zellcharakterisierung

Um die CG – 4 – Zelllinie als OPC zu charakterisieren, wurden spezifische immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die zu färbenden Zellen wurden in Kulturschälchen (12 – Well – Platten) entsprechend ihren Kultivierungsmethoden (siehe 3.2.1) gehalten. Unreife CG – 4 – Zellen waren positiv für A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>, aber negativ für GalC, O4 und MBP (Abb.1) Mit zunehmendem Reifegrad ( die Zellen wurden für 14 Tage in N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium gehalten) erlosch die Anfärbbarkeit durch A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>, die Zellen zeigten sich jedoch mit 80 % positiv für GalC, 40 – 60% für O4 und ca. 30 – 50 % für MBP ( Abb. 2 – 4).

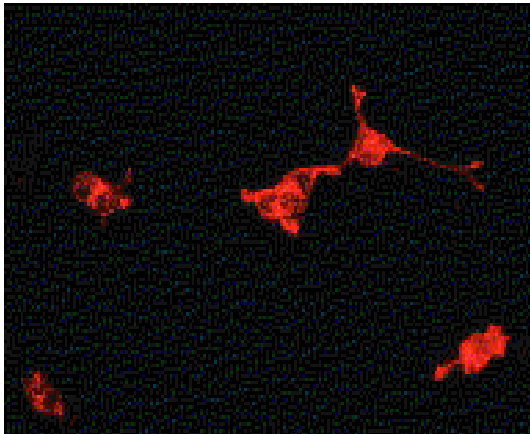


Abb.2  
CG – 4 – Zellen mit dem OPC – spezi –  
fischen Marker A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> angefärbt. Die  
Zellen sind noch unreif und.  
mono – bis bipolar

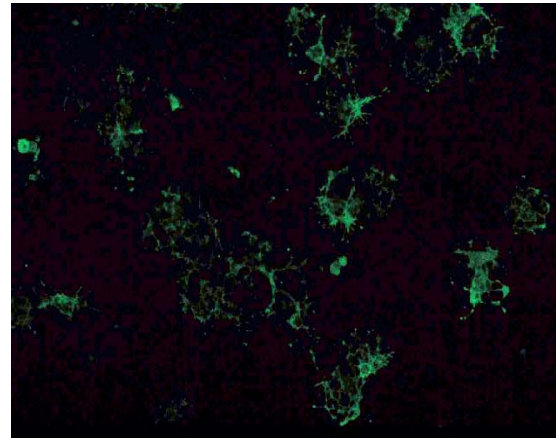


Abb.3  
CG – 4 - Zellen nach 14 Tagen im  
N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium gehalten und mit dem  
Oligodendrozytenmarker GalC markiert.  
Man erkennt schon deutlich multipolare  
Zellen.

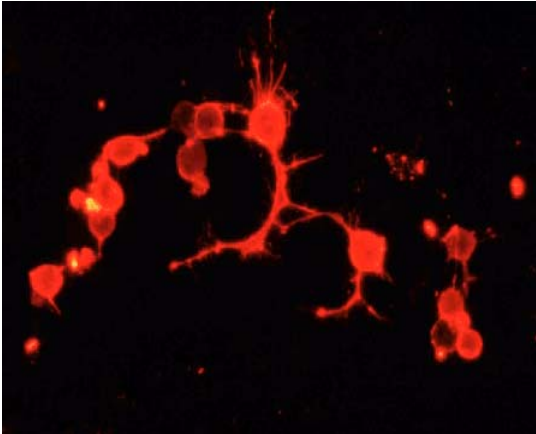


Abb.4

Die O4 – Färbung markiert frühe Prooligodendrozyten. Die Zellen wurden 14 Tage in  $N_2B_3$  – Medium kultiviert.

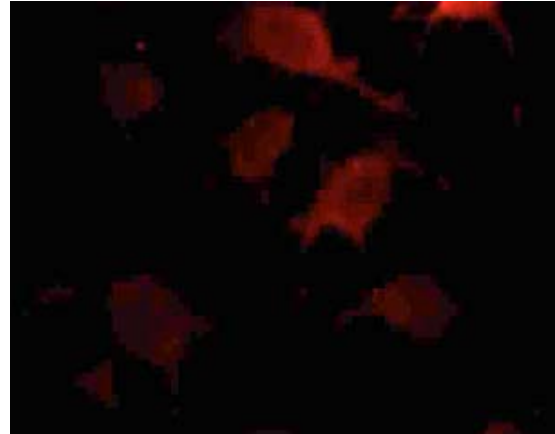


Abb.5

Die MBP – Färbung wurde auch bei CG – 4 – Zellen, welche 14 Tage in  $N_2B_3$  – Medium waren, positiv. MBP ist charakteristisch für Oligodendrozyten, die in der Lage sind, Myelin zu bilden.

#### 4.1.2 Astrozyten – Typ – 2 Markierung

Ein Teil (1-5%) der CG – 4 – Zellen, welche 14 Tage gehalten wurden, differenzierte in Astrozyten – Typ – 2. Diese Zellen sind markierbar durch GFAP (Abb.5). Oligodendrozyten lassen sich nicht durch GFAP anfärben.

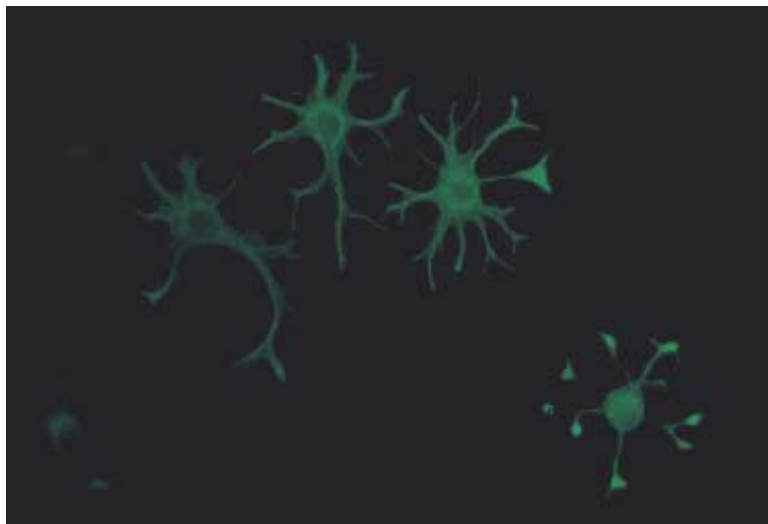


Abb.6 Astrozyten – Typ – 2 durch GFAP markiert

## 4.2 Testung der Primer, Modifikation der Parameter

Die benutzten Primer wurden an Gliamischkulturen, welche aus neugeborenen Sprague – Dawley – Ratten gewonnen wurden, ausgetestet und mit bekannten Chemokinrezeptoren auf Astrozyten und Mikroglia verglichen. Die PCR – Bedingungen wurden so modifiziert, um eine optimale Ausbeute an DNA zu erhalten. Anhand von Versuchsreihen mit unterschiedlichen Mengen an  $MgCl_2$  und der Verwendung der verschiedenen annealing – Temperaturen wurden die PCR – Ergebnisse verglichen. Wie unter 3.4.1 aufgeführt, verwendeten wir auf einen 50 $\mu$ l Ansatz 5 $\mu$ l DNase Reaction Buffer, 4 $\mu$ l  $MgCl_2$ , 4 $\mu$ l dNTP und 2,5 $\mu$ l TMAC. Das Programm bei der ersten Amplifikation hatte eine annealing – Temperatur von 53°C. Es hat sich herausgestellt, dass bei Verwendung dieser Parameter die Ausbeute an PCR – Produkt am größten war. Die verschiedenen annealing- Temperaturen dienten dem Zweck, bei Reamplifikationen durch Wahl einer hohen annealing – Temperatur die Anzahl der irrelevanten Banden möglichst gering zu halten.

Es wurden bei einigen Rezeptoren mehrere Primerpaare verwendet, um möglichst viele Schnittstellen auf einem DNA- Strang für den gleichen Rezeptor zu benutzen.

## 4.3 Chemokinrezeptoren

### 4.3.1 PCR – Ergebnisse

Durch die PCR wurde die cDNA, welche über mRNA – Isolierung und Kompletierung durch die Reverse Transkriptase ( siehe 3.3) hergestellt wurde, auf spezifische Chemokinrezeptoren untersucht werden. Dass nicht alle bekannten Rezeptoren untersucht werden konnten, lag daran, dass bestimmte Chemokinrezeptoren im Rattengenom noch nicht nachgewiesen wurden, dementsprechend keine Primer generiert werden konnten.

Die Ergebnisse konnten in der Gelelektrophorese bildlich dargestellt werden (Abb. 4.3.1a, 4.3.1b, 4.3.1c, 4.3.1d). Zur Verifizierung der Ergebnisse, um Fehlerquellen und Unreinheiten in der Zellkultur auszuschließen, wurde jeder Rezeptor dreimal untersucht und die Zellen auf ihre spezifischen Marker gefärbt.

Tabelle 4 veranschaulicht, über welche Primerpaare der jeweilige Chemokinrezeptor dargestellt werden konnte.

**Tabelle 4**

Primerpaar	Nachweis möglich auf Zellen im CG – 4 -Medium	Nachweis möglich auf Zellen im N <sub>2</sub> B <sub>3</sub> – Medium
CCR1 – F/R	ja	ja
CCR2 – F2/R3	nein	nein
CCR3 – F1/R1	ja	ja
CCR4 – F/R	nein	nein
CCR5 – F <sub>0-2</sub> /R <sub>0-4</sub>	nein	nein
CCR7 – F1/R1	ja	ja
CCR10 - F/R	nein	nein
CXCR1 – F3/R2 *	ja	
CXCR1 – F <sub>0-3</sub> /R <sub>0-3</sub>		nein
CXCR2 – F1/R1 *	ja	
CXCR2 – F/R4		ja
CXCR3 – F/R	nein	nein
CXCR4 – F/R	ja	ja
CX3CR1 – F1/R1	ja	ja

(\* Nguyen und Stangel 2001)

Es wurde ein Unterschied in der Ausprägung von CXCR1 zwischen reifen und unreifen Zellen festgestellt. CXCR1 konnte auf unreifen CG – 4 Zellen nachgewiesen werden, aber nicht auf reiferen CG – 4 – Zellen.

Die folgenden Abbildungen sind Darstellungen der Gelelektrophorese. Man sieht die Ergebnisse der getesteten Primer bei CG – 4 – Zellen im CG – 4 – Medium (Abb. 6 und 7) und bei CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium (Abb. 8 und 9).

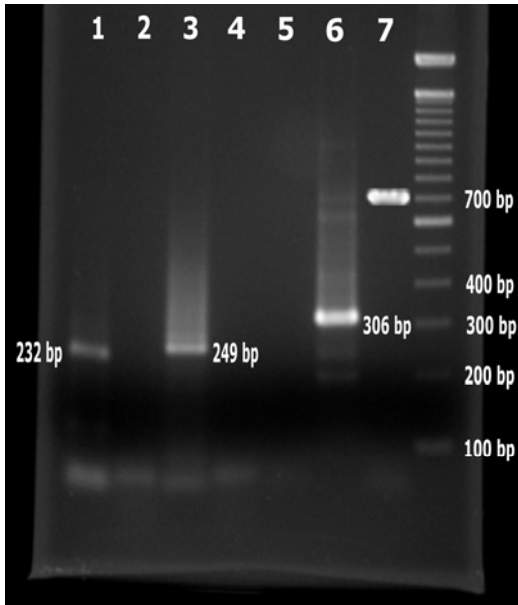


Abb.7 PCR - Ergebnisse von Zellen in  
CG – 4 – Medium

Markierungen: 1= CCR1 (232 Basenpaare)

2= CCR2 (keine Bande)

3= CCR3 (249 bp)

4= CCR4 (keine Bande)

5= CCR5 (keine Bande)

6= CCR7 (306 bp)

7= Positivkontrolle mit  
 $\beta$  – Actin (700bp)

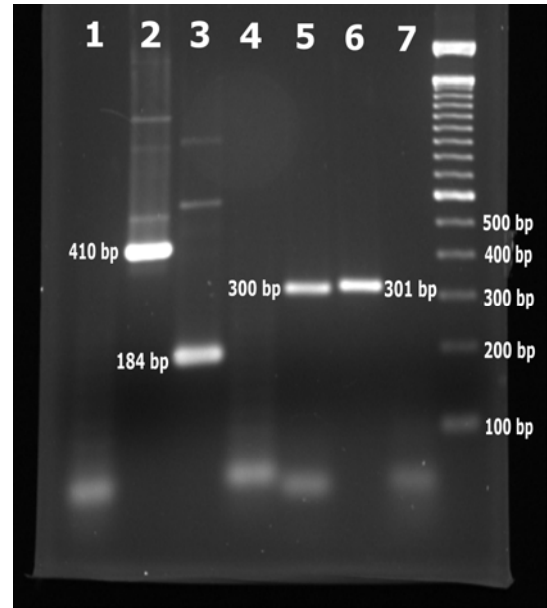


Abb.8 PCR - Ergebnisse von Zellen in  
CG – 4 - Medium

Markierungen: 1= CCR10 (keine Bande)

2= CXCR2 (410 bp)

3= CXCR1 (184 bp)

4= CXCR3 (keine Bande)

5= CXCR4 (300 bp)

6= CX3CR1 (301 bp)

7= Negativkontrolle mit  
 $\beta$  – Actin (700bp)

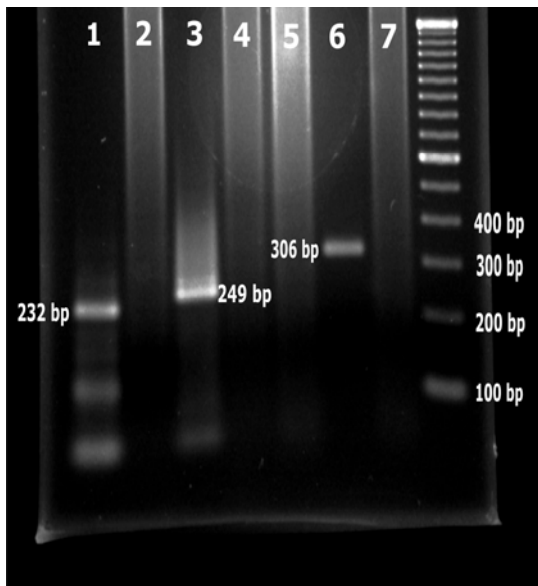


Abb.9 PCR - Ergebnisse von Zellen im  $N_2B_3$  – Medium

Markierungen: 1= CCR1 (232 bp)

2= CCR2 (keine Bande)

3= CCR3 (249 bp)

4= CCR4 (keine Bande)

5= CCR5 (keine Bande)

6= CCR7 (306 bp)

7= Negativkontrolle mit

$\beta$  – Actin

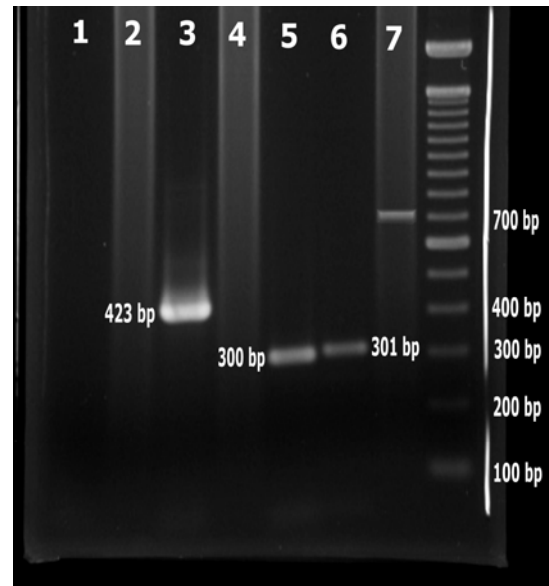


Abb.10 PCR – Ergebnisse von Zellen im  $N_2B_3$  – Medium

Markierungen: 1= CCR10 (keine Bande)

2= CXCR1 (keine Bande)

3= CXCR2 (423 bp)

4= CXCR3 (keine Bande)

5= CXCR4 (300 bp)

6= CX3CR1 (301 bp)

7= Positivkontrolle mit

$\beta$  – Actin

#### 4.3.2 Immunhistochemische Rezeptormarkierungen

Für einige Rezeptoren stehen Antikörper zur Verfügung, um die Rezeptoren nicht nur auf RNA – Ebene, sondern auch auf Proteinebene nachzuweisen.

Im Folgenden sind die Rezeptoren CCR1 (Abb.10a – c), CCR3 (Abb.11a – c), CXCR2 (Abb. 12a – c), CX3CR1 (Abb.13a und 13b) der CG – 4 – Zellen dargestellt, welche in  $B - 104$  – konditioniertem Medium wuchsen. Die Untergruppen a – c bzw. a und b entsprechen jeweils demselben Zellausschnitt. Die Färbung für CXCR4 war nicht erfolgreich, da sich die Negativprobe positiv färbte. Auch Modifikationen der Methode verbesserten das Ergebnis nicht.

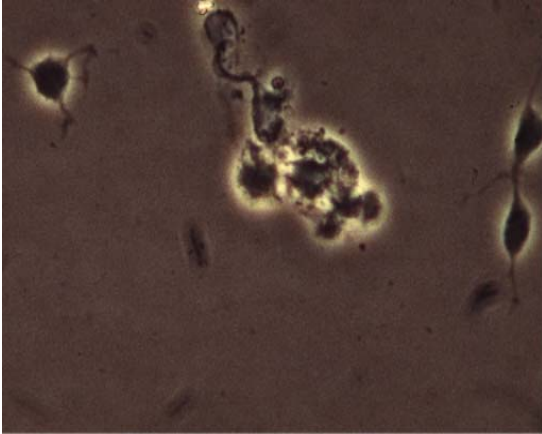


Abb.11a Zellen im CG – 4 – Medium  
im Phasenkontrast

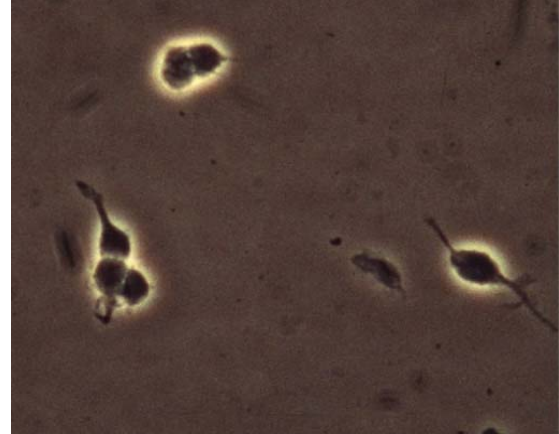


Abb.12a Zellen im CG – 4 – Medium  
im Phasenkontrast

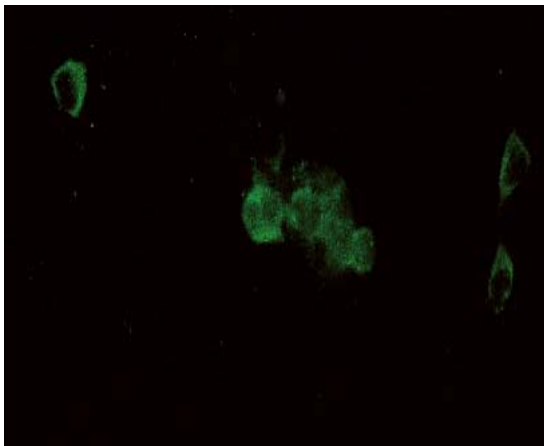


Abb.11b Zellen in CG – 4 – Medium  
positiv für CCR1

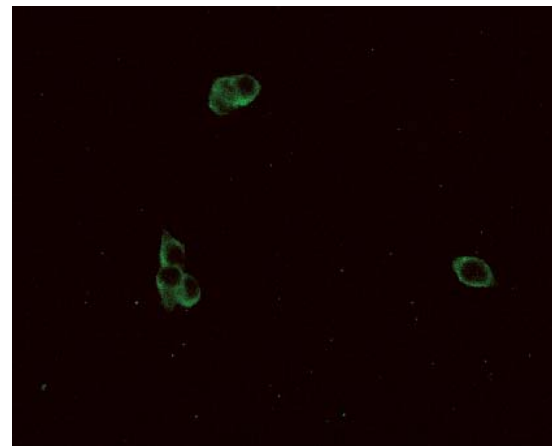


Abb.12b Zellen in CG – 4 – Medium  
positiv für CCR3

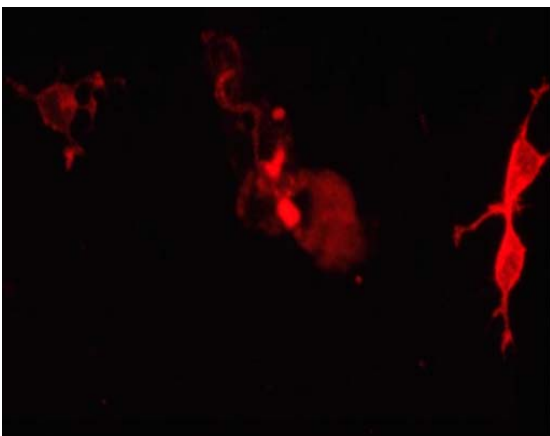


Abb.11c Zellen im CG – 4 – Medium  
positiv für A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>

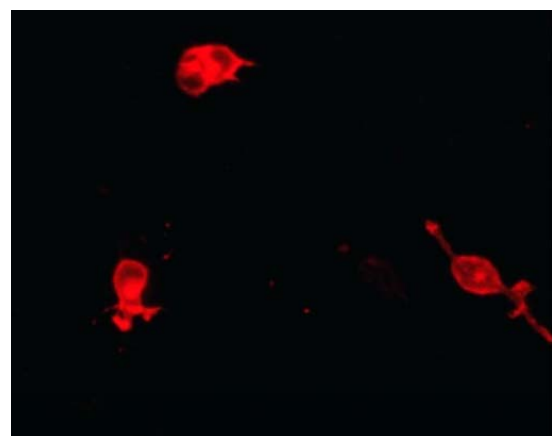


Abb.12c Zellen im CG – 4 – Medium  
positiv für A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>

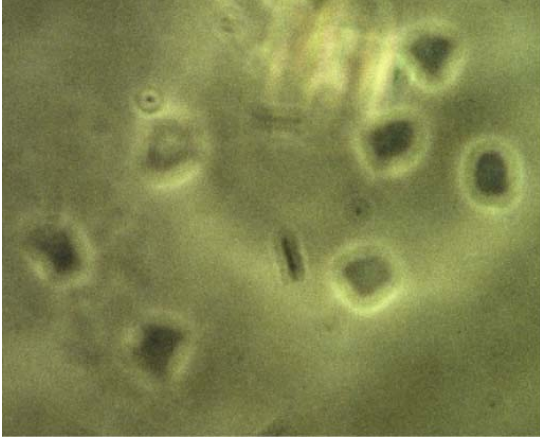


Abb.13a Zellen im CG – 4 – Medium  
im Phasenkontrast

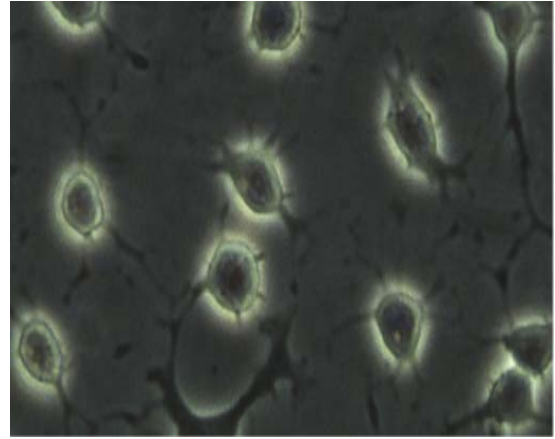


Abb.14a Zellen im CG – 4 – Medium  
im Phasenkontrast

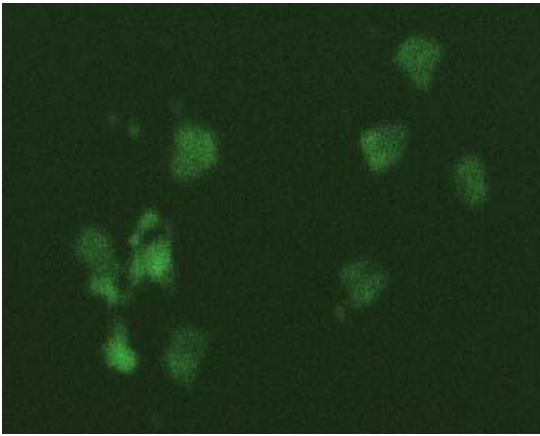


Abb.13b Zellen im CG – 4 – Medium  
positiv für CXCR2

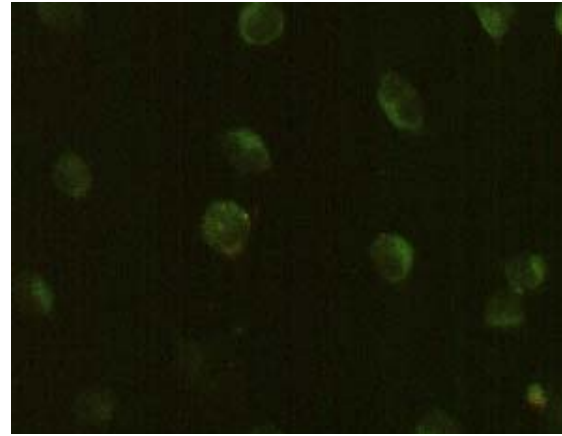


Abb.14b Zellen im CG – 4 – Medium  
positiv für CX3CR1

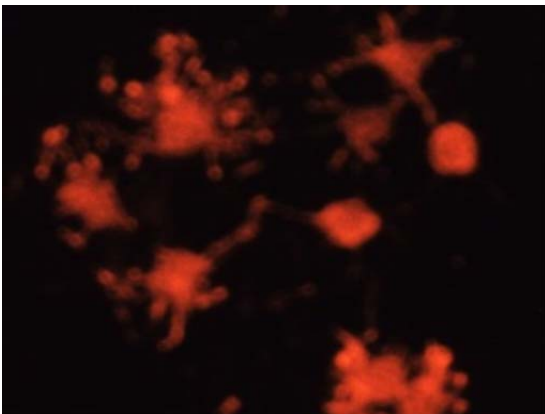


Abb.13c Zellen im CG – 4 – Medium pos. für A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>

Die folgenden Färbungen stellen die Rezeptoren CCR1 (Abb. 14a – c), CCR3 (Abb. 15a – c), CXCR2 (Abb. 16a – c), CX3CR1 (Abb. 17a und 17b) an Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium dar.



Die Untergruppen a – c bzw. a und b entsprechen demselben Zellausschnitt.

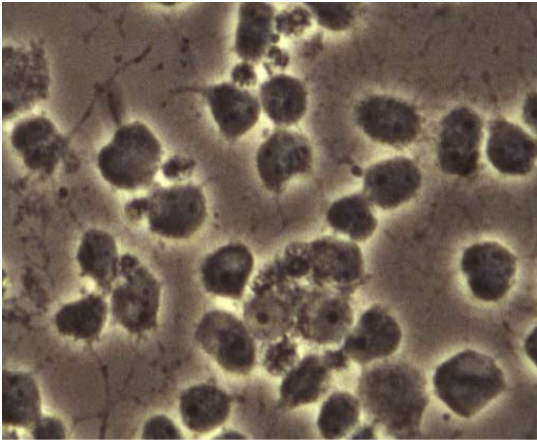


Abb.15a CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium im Phasenkontrast

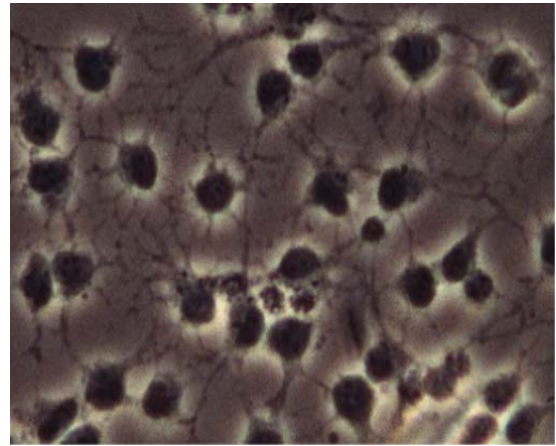


Abb.16a CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium im Phasenkontrast

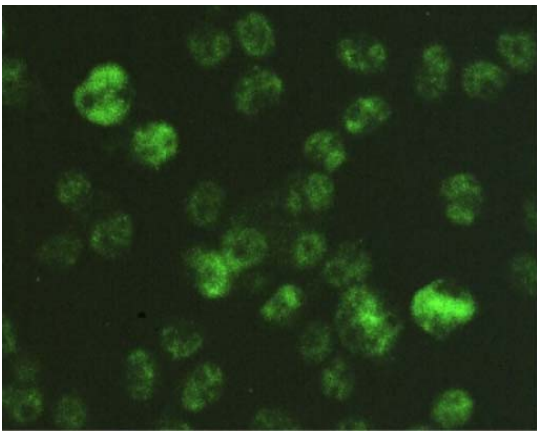


Abb.15b CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium positiv für CCR1

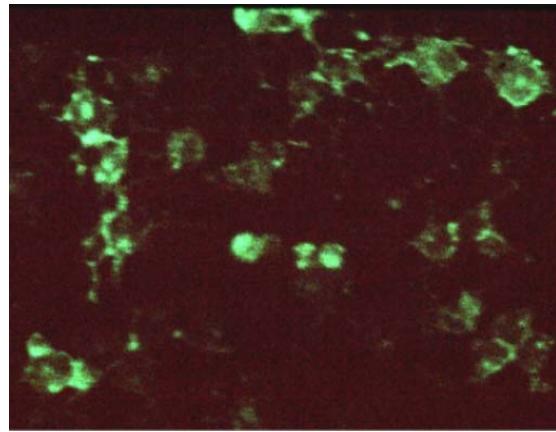


Abb.16b CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium positiv für CCR3

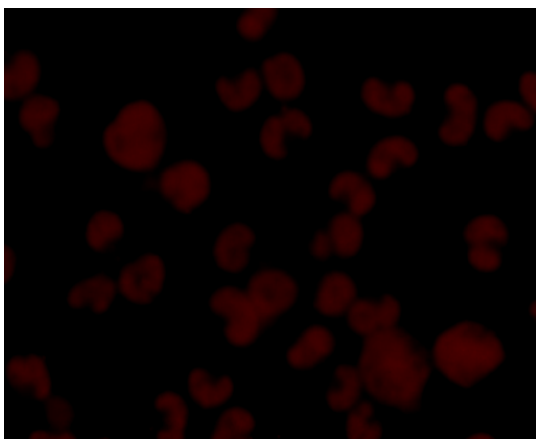


Abb.15c CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium schwach anfärbbar durch A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>

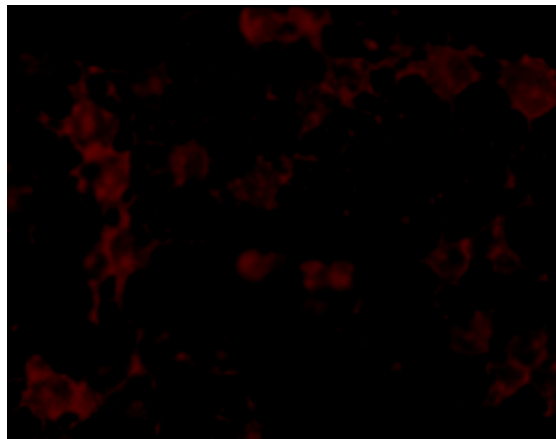


Abb.16c CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium schwach anfärbbar durch A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>

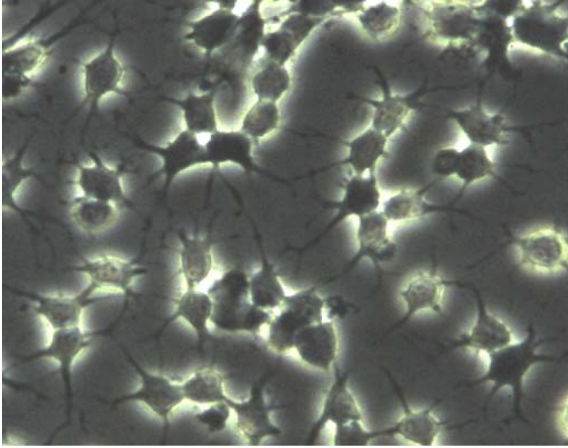


Abb.17a CG – 4 – Zellen im  
N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium im Phasenkontrast

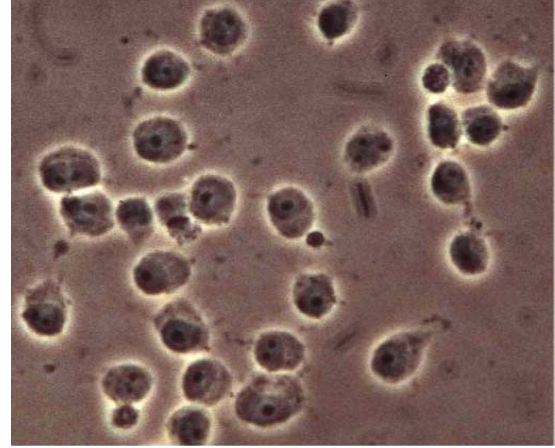


Abb.18a CG – 4 – Zellen im  
N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium im Phasenkontrast

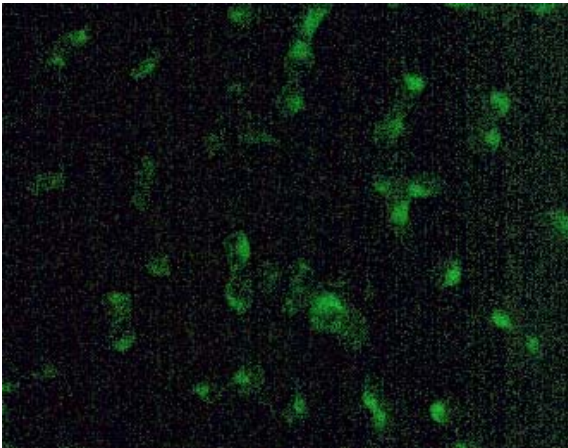


Abb.17b CG – 4 – Zellen im  
N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium positiv für CXCR2

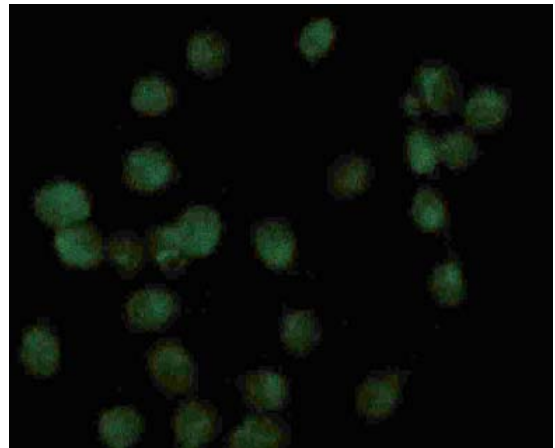


Abb.18b CG – 4 – Zellen im  
N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium positiv für CX3CR1

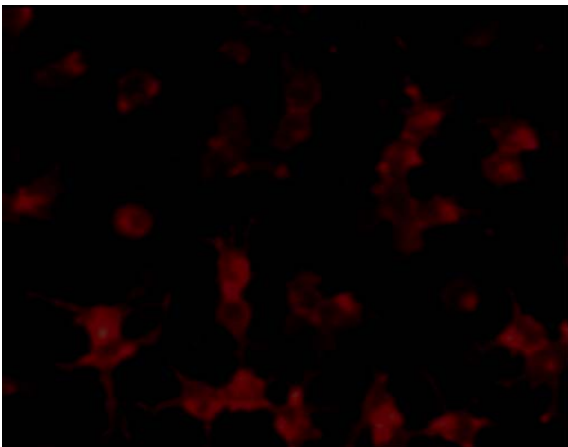


Abb.17c CG – 4 – Zellen im N<sub>2</sub>B<sub>3</sub> – Medium  
schwach anfärbbar durch A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>

#### 4.4 Ergebnisbestätigung durch Sequenzierung

Durch die Sequenzierung wurde die Spezifität der PCR überprüft, um falsch positive PCR – Ergebnisse auszuschliessen. Nur ein positives Ergebnis in der Sequenzierung konnte das Vorhandensein des Rezeptors endgültig belegen.

Die DNA wurde aufgereinigt und nach Göttingen zum Labor „seqlab“ zur Sequenzierung geschickt. Mit Hilfe des frei zugänglichen Programms Chromas (Version 1.42) konnten die Sequenzen grafisch dargestellt werden. Das folgende Beispiel gibt einen Ausschnitt der Basenpaarfolge des Chemokinrezeptors CCR7 wieder (Abb.17).

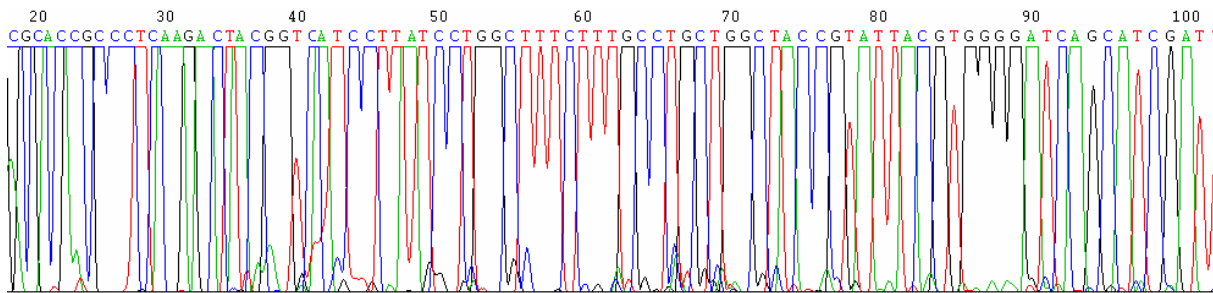


Abb.19 Ausschnitt aus der Basenpaarfolge des Rezeptors CCR7