

## 2 MATERIAL

### 2.1 Versuchstiere

<b>Mausstamm</b>	<b>Anbieter</b>
B10.PL	Jackson Laboratories, Boston MA, USA
BALB/c	Charles River, Sulzfeld, D
TG4	Cambridge University, Cambridge, UK
DO11.10	Dt. Rheumaforschungszentrum, Berlin, D

Alle Tiertötungen waren unter der Nummer T 0181/99 (Verantwortlicher: Prof. Dr. Robert Nitsch) und alle Tierversuche unter der Nummer G 0067/04 (Verantwortlicher: Dr. Sven Hendrix) vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt und wurden unter Einhaltung der dort vorgeschriebenen Regeln durchgeführt.

### 2.2 Chemikalien

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, D
100 bp DNA Ladder	Promega, Mannheim, D
2-Mercaptoethanol	Stratagene, Cedar Creek TX, USA
2-Methylbutan	Merck, Darmstadt, D
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Agarose	FMC, Rockland ME, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen, D
Citronensäure	Sigma, Taufkirchen, D
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Taufkirchen, D
Desoxyribonuclease (DNase I)	Ambion, Austin TX, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Riedel de Haen, Seelze, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D

Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Merck, Darmstadt, D
DNA-Probenpuffer 5x Blue Run	Promega, Mannheim, D
dNTP Set	Amersham, Freiburg, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, unvergällt	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
FACS Clean	BD Pharmingen, Heidelberg, D
FACS Flow	BD Pharmingen, Heidelberg, D
FACS Rinse	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Glucose-20	BBraun, Melsungen, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Histopaque-1083	Sigma, Taufkirchen, D
Insulin crystalin	Gibco, Karlsruhe, D
Ionomycin Calciumsalz	Sigma, Taufkirchen, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Ketamin	CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, D
Kollagen Typ I	Fluka, Buchs, CH
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, D
MEM HEPES	Gibco, Karlsruhe, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
M-MLV Reverse Transkriptase-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5 %	Gibco, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
oligo DT	Amersham, Freiburg, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)	Sigma, Taufkirchen, D

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Taufkirchen, D
Ribonuclease-Inhibitor (RNAsin)	Promega, Mannheim, D
Rompun	Bayer HealthCare, Leverkusen, D
Saccharose	Sigma, Taufkirchen, D
Salzsäure	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, D
Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, D
t-Octylphenoxypolyethoxy Ethanol (Triton X-100)	Sigma, Taufkirchen, D
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)	Sigma, Taufkirchen, D
Trypanblau- Lösung	Sigma, Taufkirchen, D
Vitamin C	Sigma, Taufkirchen, D
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, D
Xylen Cyanol FF	Sigma, Taufkirchen, D

### 2.3 Peptide

Peptid	Sequenz	Hersteller
MBP Ac1-11	NH <sub>2</sub> -Ac-ASQ KRP SQR SK-CONH <sub>2</sub>	Biosynton, Berlin, D
OVA 323-339	NH <sub>2</sub> -ISQ AVH AAH AEI NEA GR-COOH	Pepscan, Lelystad, NL

### 2.4 Rekombinante Proteine

Produktbezeichnung	Hersteller
Human NT-3	Tebu-Bio, Offenbach, D
Human NT-4	Tebu-Bio, Offenbach, D
Mouse IFN- $\gamma$	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Mouse IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, D
Mouse IL-4	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Mouse IL-10	Tebu-Bio, Offenbach, D
Mouse IL-12	R&D Systems, Wiesbaden, D
Mouse IL-13	Tebu-Bio, Offenbach, D
Mouse NGF (7S)	Sigma, Taufkirchen, D

## 2.5 Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
Anti-mouse CD 8a Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Anti-mouse CD11b Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Anti-mouse CD45R Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Chicken anti-human NT-3	Promega, Mannheim, D
Chicken anti-human NT-4	Promega, Mannheim, D
Chicken control IgY	Sigma, Taufkirchen, D
Donkey anti-goat FITC	Dianova, Hamburg, D
Goat anti-mouse NF-L	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	Molecular Probes, Leiden, NL
Goat anti-rat Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Leiden, NL
Isolectin-B4 FITC	Sigma, Taufkirchen, D
K252a	Calbiochem, Schwalbach, D
Streptavidin PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Rabbit anti-mouse GAP43	Biozol, Eching, D
Rabbit anti-mouse GFAP	Dako, Hamburg, D
Rabbit anti-mouse NF 200	Sigma, Taufkirchen, D
Rabbit anti-mouse NGF	IBT, Reutlingen, D
Rabbit anti-mouse p75NTR	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Rabbit anti-mouse TrkA	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Rabbit anti-mouse TrkB	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Rabbit anti-mouse TrkC	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Rabbit control IgG	IBT, Reutlingen, D
Rat anti-mouse CD4 FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Rat anti-mouse CD25 PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Rat anti-mouse GFAP	Zymed, San Francisco CA, USA
Rat anti-mouse IL-4	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Rat anti-mouse IL-12	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Rat anti-mouse IFN- $\gamma$	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Rat anti-mouse V $\beta$ 8.1/2	BD Pharmingen, Heidelberg, D

## 2.6 Seren

Produktbezeichnung	Hersteller
Esenserum (DS)	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D
Normales Pferdeserum (NHS)	Gibco, Karlsruhe, D
Normales Ziegenserum (NGS)	Linaris, Wertheim, D

## 2.7 Medien

Produktbezeichnung	Hersteller
DMEM	Gibco, Karlsruhe, D
HBSS	Gibco, Karlsruhe, D
RPMI 1640 mit Glutamin	Gibco, Karlsruhe, D

## 2.8 Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
Absolutely RNA RT-PCR Microprep Kit	Stratagene, Cedar Creek TX, USA
Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit	Stratagene, Cedar Creek TX, USA
AmpliTaq DNA Polymerase mit GeneAmp	Applied Biosystems, Foster City CA, USA
BDNF Emax ImmunoAssay System	Promega, Mannheim, D
First Strand cDNA Synthese Kit	Amersham, Freiburg, D
NGF Emax ImmunoAssay System	Promega, Mannheim, D
NT-3 Emax ImmunoAssay System	Promega, Mannheim, D
NT-4 Emax ImmunoAssay System	Promega, Mannheim, D
OptEIA Set Human TGF- $\beta$	BD Pharmingen, Heidelberg, D
OptEIA Set Mouse IFN- $\gamma$	BD Pharmingen, Heidelberg, D
OptEIA Set Mouse IL-4	BD Pharmingen, Heidelberg, D
OptEIA Set Mouse IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg, D
OptEIA Set Mouse IL-10	BD Pharmingen, Heidelberg, D
OptEIA Set Mouse TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg, D

## 2.9 Primer

Primer		Sequenz 5' > 3'	Produkt	Annealing
β-Aktin	fw rv	CTA GGC ACC AGG GTG TGA TGG CGT AGA TGG GCA CAG TGT GGG	387 bp	62°C
BDNF	fw rv	GCA GGT TCG AGA GGT CTG AC CTT CAG TTG GCC TTT TGA TAC C	389 bp	55°C
IFN-γ	fw rv	AAC GCT ACA CAC TGC ATC T GAC TTC AAA GAG TCT GAC G	236 bp	55°C
IL-1β	fw rv	TTG AAG AAG AGC CCA TCC TCT G GAT CCA CAC TCT CCA GCT GC	321 bp	61°C
IL-2	fw rv	GCA GGA TGG AGA ATT ACA GGA TCA GAG CCC TTT AGT TTT AC	225 bp	55°C
IL-4	fw rv	ACG GAG ATG GAT GTG CCA AAC GTC ACG AGT AAT CCA TTT GCA TGA TGC	278 bp	64°C
IL-10	fw rv	AGA CTT TCT TTC AAA CAA AGG A ATC GAT GAC AGC GCC TCA G	231 bp	55°C
NGF	fw rv	GAT CGG CGT ACA GGC AGA AC CCA TGT GGA AGA CTG GGT GG	353 bp	57°C
NT-3	fw rv	CAG CCA ATG ATT GCA ACG GA GGC CTG GCT TCT TTA CAT CTC G	355 bp	55°C
NT-4	fw rv	GTC AGT ACT TCT TCG AGA CGC G TGA GAG TCT GCA GTC AAC GC	153 bp	57°C
TGF-1β	fw rv	GCT GCG CTT GCA GAG ATT AAA TTG CTG TAC TGT GTG TCC AG	551 bp	57°C

## 2.10 Zubehör

Produktbezeichnung	Hersteller
Dako Pen	Dako, Hamburg, D
Deckgläschen	Merck, Darmstadt, D
Einbettmedium	Jung, Nussloch, D
Einfrierbox	Roth, Karlsruhe, D
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
FACS-Röhrchen	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Immu-Mount	Shandon, Pittsburgh PA, USA
Kanülen (0,9x40/0,5x25 mm)	BBraun, Melsungen, D

Küvetten	VWR, Darmstadt, D
Metamorph Software	Visitron Systems, Puchheim, D
Midi MACS LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Midi MACS Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mikroliterspritze Hamilton (10 µl)	Roth, Karlsruhe, D
Millipore Membranen (0,4 µm)	Millipore, Eschborn, D
Neubauer-Zählkammer	VWR, Darmstadt, D
Neutralit-Teststäbchen	VWR, Darmstadt, D
Objektträger	VWR, Darmstadt, D
Pasteurpipetten	Fisher scientific, Loughborough, UK
Petrischalen (35x10/100x20 mm)	Nunc, Wiesbaden, D
Pipetten (2/5/10/25 ml)	Falcon/BD, Heidelberg, D
Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Präparierbesteck	Aesulap, Tuttlingen, D
Spritzen (2/5/10 ml)	BBraun, Melsungen, D
Sterilfilter	Falcon/BD, Heidelberg, D
Superfrost Plus Objektträger	Roth, Karlsruhe, D
Wound Autoclip, Clay Adams	BD, Heidelberg, D
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, D
Zellkulturplatten (6/24/96 wells)	Falcon/BD, Heidelberg, D
Zellkulturröhrchen (15/50 ml)	Falcon/BD, Heidelberg, D
Zellkulturschalen quadriperm (4 wells)	VWR, Darmstadt, D
Zellsiebe	Falcon/BD, Heidelberg, D

## 2.11 Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Binokkular GZ 6	Leica, Bensheim, D
Brutschrank	Heraeus Instruments/Thermo Electron, Langenselbold, D
Digitale Kamera Photometric Coll Snap ES	Visitron Systems

Digitale Kamera Intas	Intas, Göttingen, D
Easycast B1A Electrophoresis System	Bio-Rad, München, D
Easycast B2 Electrophoresis System	Bio-Rad, München, D
ELISA Washer Opsys MW	Dynex Technologies, Sullyfield Circle V, USA
Elix-5 Water Purification System	Millipore, Eschborn, D
FACS Calibur	BD, Heidelberg, D
Fluoreszenz/Durchlichtmikroskop Olympus BX 50	Olympus, Hamburg, D
Fluoreszenz/Durchlichtmikroskop Olympus BX 51	Olympus, Hamburg, D
Gel Imaging System	Herolab, Wiesloch, D
Heizplatte und Rührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen, D
Inverses Fluoreszenz/Durchlichtmikroskop Olympus IX 70	Olympus, Hamburg, D
Kryostat CM 1900	Leica, Bensheim, D
Milli-Q Synthesis A10 System	Millipore, Eschborn, D
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad, München, D
Peltier Gradient Thermocycler	MJ Research, Waltham MA, USA
pH Meter	Schott Instruments, Mainz, D
Plattenreader ELX 800	Biotech Instruments, Bad Friedrichshall, D
Schüttler Titramax 100	Heidolph, Schwabach, D
Sterilbank Antares 48	Anthos Mikrosysteme, Köln, D
Sterilbank Laminar Flow	Steag, Pliezhausen, D
Tissue chopper	Technical Products International, St. Louis MO, USA
Vortex	NeoLab, Heidelberg, D
Wasserbad E 100	Lauda, Lauda-Königshofen, D
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Megafuge 1.0	Kendro/Thermo Electron, Langenselbold, D



## 2.12 Lösungen und Puffer

### Millipore Typ I Wasser

Milli-Q Synthesis A10 System

Aus Elix-5 Water Purification System:

Ultrareines Wasser, für molekularbiologische Zwecke geeignet.

### Millipore Typ II Wasser

Elix-5 Water Purification System

Aus Leitungswasser:

Deionisiertes und gefiltertes Wasser, für analytische Zwecke geeignet.

Soweit keine anderen Angaben, wurde immer Millipore Typ II Wasser verwendet.

### Phosphatpuffer pH 7,4 (PB)

0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0,1 M Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

in Millipore Typ II Wasser

### Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4 (PBS)

140 mM Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )

2,7 mM Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ )

10 mM Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )

1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

in Millipore Typ II Wasser

### Salzsäure für pH Werteinstellung

1 M Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) in Millipore Typ II Wasser

### Natronlauge für pH Werteinstellung

1 M Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ) in Millipore Typ II Wasser

### EDTA-Lösung für Blut

200 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) in PBS

**Lysepuffer für T-Zellen**

9 ml 0,16 M Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) in Millipore Typ II Wasser

1 ml 0,17 M Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase) in Millipore Typ II Wasser

**Präparationsmedium für T-Zellen**

10 % FCS in RPMI 1640 Medium mit Glutamin

**Inkubationsmedium für T-Zellen**

10 % FCS

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)

0,1 % 2-Mercaptoethanol

in RPMI 1640 Medium mit Glutamin

**Einfriermedium für T-Zellen**

10 % FCS in Dimethylsulfoxid (DMSO)

**MACS-Puffer**

1% FCS

0,01 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

in PBS

**FACS-Puffer**

2 % FCS

0,01 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

in PBS

**Essigsäure für Kollagen-Kokulturen**

0,1 M Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) in Millipore Typ II Wasser

**Kollagen-Rekonstituierungspuffer**

0,8 M Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )

2,2 % Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

in Millipore Typ II Wasser

**Kollagenlösung**

2 mg/ml Kollagen in 0,1 M Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH)

**Kollagenlösung pH 7,4**

1ml Kollagenlösung  
50µl DMEM Medium  
100µl Rekonstituierungspuffer

**Präparationsmedium für Kollagen- und Membran-Kokulturen pH 7,4**

16 g/L MEM  
2 mM L-Glutamin  
0,8 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)  
in Millipore Typ II Wasser

**Inkubationsmedium für Kollagen- und Membran-Kokulturen pH 7,4**

25 % NHS  
25 % HBSS Medium  
4 mg/L Insulin  
0,8 mg/L Vitamin C  
5 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)  
4 mM L-Glutamin  
0,58 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5 % (NaHCO<sub>3</sub>)  
1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)  
1,2 % Glucose-20  
8 g/L MEM  
in Millipore Typ II Wasser

**Fixierlösung für Membran-Kokulturen und Gehirne**

4 % Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M PB

**Saccharosepuffer für Membran-Kokulturen**

0,8 M Saccharose  
0,01 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)  
in Millipore Typ II Wasser

**Saccharosepuffer für Gehirne pH 6,9**

10 % Saccharose  
70 mM Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
30 mM Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ )  
0,01 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )  
in Millipore Typ II Wasser

**Trisbase-Borsäure-EDTA-Puffer pH 7,5 (TBE-Puffer)**

90 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trisbase)  
90 mM Borsäure  
2 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)  
in Millipore Typ II Wasser

**Agarose-Gel**

1,5 % Agarose in TBE-Puffer

**Ketamin-Rompun-Gemisch zur Anästhesie**

2 % Ketamin  
0,8 % Rompun 2 %  
in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung ( $\text{NaCl}$ )