

2 MATERIAL

2.1. Geräte und Arbeitsutensilien

| Produkt | Hersteller |
|-------------------------------------|--------------------|
| 12-well Platte | Nunc |
| 15ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen | Falcon |
| Combitips | Eppendorf |
| Cryo Freezing Container | Nalgene |
| Cryoröhrchen | Nalgene |
| Deckgläser 18mm | Marienfeld |
| Elektrophorese- Mikrocomputer | Renner GmbH |
| Elektrophorese-Kammer | Bio-Rad |
| Eppendorfpipetten | Eppendorf |
| Fluoreszenzmikroskop | Leitz |
| Filter 0,2 | Millipor |
| Heizblock | Eppendorf |
| Hybridisierungskammer | Bachhofer |
| Kamera | Leica |
| Kühlblock | Eppendorf |
| Kunststoffpipetten (5ml,10ml,25ml) | Falcon |
| Lamina-flow Sterilbank | BSK, Barsinghausen |
| Magnethalter | Dynal |
| Mikroskop | Nikon |
| Objekträger 76 x 26 mm | Menzel |
| Pasteurpipetten aus Glas | Brand |
| PCR-Reaktionsgefäße | Eppendorf |
| Amplifikator | Perkin Elmer Ceput |
| Pipettenspitzen | Eppendorf |

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| Pipetus-akku (Pipettierhilfe) | Hirschmann |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Eppendorf |
| UV-Kamera | Renner GmbH |
| Zellkulturbrutschrank | Heraeus |
| Zellkulturflaschen mit Filterkappen | Nunc |
| Zellzählkammer | Fuchs- Rosenthal |
| Zentrifuge | Braun |

2.2 Biologische und pharmakologische Substanzen

| Substanz | Hersteller |
|---|-------------------------|
| Adenin/Guanin/Cytosin/Thymin = dNTP-Mix | Gibco |
| Agarosegel | Bio Rad |
| DNase I | Gibco |
| Donkey Serum | Jackson Immuno Research |
| Goat Serum | DAKO |
| Oligo(dT)25- Beads | Dynal |
| Polylysin | Sigma |
| Primer * | Gibco |
| Reverse Transkriptase 200 U | Biogene |
| RNaseOut 40 U | Gibco |
| Taq-Polymerase | Promega |

* genauere Zusammensetzung im Teil Methoden

Antikörper

| | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Cy 2 – Conjugated – anti goat IgG | Jackson Immuno Research |
| Cy 2 – Conjugated – anti rabbit IgG | Jackson Immuno Research |
| Cy 3 – Conjugated – anti mouse IgM | Jackson Immuno Research |
| Fusin G19 polyklonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Goat anti rat CCR1 polyklonal | Santa Cruz Biotechnology |

| | |
|---|--------------------------|
| Goat anti rat CCR3 polyklonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Goat anti rat CXCR2 polyklonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Rabbit anti rat CX3CR1 polyklonal | R&D Systems |
| Mouse anti A ₂ B ₅ monoklonal | Ecacc/ hybrid collection |
| Mouse anti MBP monoklonal | Boehninger Mannheim |
| Mouse anti O4-Antikörper monoklonal | Chemicon |
| Mouse – anti – Rat GalC monoklonal | Ecacc/ hybrid collection |
| Rabbit – anti – Rat GFAP polyklonal | DAKO |

2.3. Chemikalien

| Substanz | Hersteller |
|-------------------------------------|-------------------|
| 100Basenpaar-Leiter | Gibco |
| 10xDNAse Reaction-buffer | Gibco |
| 5x Incubationmix | Invitrogen |
| Agarosegel | BioRad |
| Aqua destillata | B.Braun-Melsungen |
| Aqua injectabilia | B.Braun-Melsungen |
| Basenpaarmarker | GenSura |
| Bromophenol | Sigma |
| Concert Rapid Gel Extraction System | Gibco |
| DTT | Gibco |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma |
| EDTA 25mM | Gibco |
| Ethanol | Merck |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Glycerol | Sigma |
| Kaliumchlorid (KCL) | Merck |
| Ladepuffer | GenSura |
| Lysis – Binding - Puffer | Merck |

| | |
|-----------------------------------|--------------------|
| Methanol | Merck |
| MgCl ₂ 25mM | Promega |
| Mineralöl | Sigma |
| Natriumacetat | Merck |
| Paraformaldehyd | Merck |
| PBS | Biochrom AG Berlin |
| SDS | Merck |
| Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) | Merck |
| Thermophilic DNA 10xPuffer | Promega |
| Trisacetat (TAE) | Merck |
| Tris-Puffer | Merck |
| Triton X – 100 | Merck |
| Trypanblau | Sigma |
| Trypsin-EDTA | Biochrom |
| Trypsininhibitor | Sigma |

Zusammensetzung der Puffer:

- DNase 10x Reaction – Buffer enthält 10mM Tris – HCL (pH 9.0 bei 25 °C), 50mM KCL und 0,1% Triton X – 100
- Ladepuffer enthält 0,25% Bromophenolblau, 69,75% dH₂O und 30% Glycerol
- Lysis - Binding - Puffer enthält 100mM Tris- HCL (pH 8.0), 0,5 M NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) und 5 mM DTT.
- SDS – haltiger Puffer : 100g SDS werden in 900 ml dH₂O gelöst und mit HCl bis pH 7,2 gesäuert, anschließend bis 1l Flüssigkeit mit dH₂O aufgefüllt
- TAE – Puffer enthält auf 500 ml Aqua Dest. 48,4g Trispuffer, 6,8g NaAc, 3,7g EDTA.

2.4 Lösungen, Medien, Zusätze für die Zellkultivierung und –verarbeitung

| Substanz | Hersteller |
|--|----------------|
| Biotin | Sigma |
| Dulbecco's DMEM | Biochrom |
| Dulbecco's PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) | Biochrom |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Biochrom |
| Glutamin | Sigma |
| Hank's Solution | Biochrom |
| ITS | BD Biosciences |
| Penicillin(10 kU/ml)/ Streptomycin (10mg/ml) | Biochrom |
| Progesteron | Sigma |
| Putrescin | Sigma |
| Thyroxin (T4) | Sigma |
| Trijodthyronin (T3) | Sigma |

Es wurden für CG – 4 – Zellen zwei verschiedene Kulturmedien angesetzt:

CG – 4 Medium

67% DMEM

1% ITS

1% Streptomycin/Penicillin – Lösung

30% B104 – Zellüberstand

0,001% Progesteron (74 ng/ml)

0,001% Biotin (10 ng/ml)

0,01% Putrescin (16µg/ml)

N₂B₃ – Medium

97,5% DMEM

1% ITS

1% Streptomycin/Penicillin - Lösung

0,5% FKS

0,001% Progersteron

0,001% Biotin

0,01% Putrescin

0,001% T3 (400ng/ml)

0,001% T4 (400ng/ml)

Es wurden für B – 104 – Zellen zwei verschiedene Kulturmedien angesetzt:

| B 104 – Kulturmedium serumhaltig | B 104 – Kulturmedium serumfrei |
|---|---------------------------------------|
| 93 % DMEM | 97 % DMEM |
| 5 % FKS | 1% ITS |
| 1 % Glutamin | 1 % Glutamin |
| 1 % Streptomycin/Penicillinlösung | 1 % Streptomycin/Penicillinlösung |

2.5 Zelllinien

2.5.1 CG-4-Zellen

Die CG-4 – Zelllinie wurde durch J. Louis (Louis et al. 1992a) erstmalig beschrieben. Es handelt sich um spontan entstandene Oligodendrozytenvorläuferzellen, welche klein, rund und mono – oder bipolar sind. Sie sind noch nicht in der Lage, Myelin zu bilden.

Diese Zelllinie ist ähnlich den OPC. Zur Entwicklung der CG – 4 – Zelllinie wurden OPC neugeborener Sprague – Dawley – Ratten kultiviert. Durch ein spezielles Nährmedium, welches Mitogene aus dem B – 104 – Zellkulturüberstand enthielt (CG – 4 – Medium), konnten die Zellen proliferieren. Die Zellen konnten durch bestimmte Oberflächenmarker charakterisiert werden. A_2B_5 ist der Oberflächenmarker, welcher bei den unreifen Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimiert wird. Die Immunzytochemie für Galactocerebroxid (GalC), sowie für Myelin Basic Protein (MBP) und Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) ist bei diesen Zellen negativ.

Nach Abziehen des Mitogens und Kultivierung im N_2B_3 – Medium entwickelten sich die Zellen zu reiferen Oligodendrozyten. Diese wurden mit zunehmendem Alter multipolarer und auch das Färbeverhalten änderte sich hinsichtlich einer vermehrten Markierung durch GalC und MBP. Die Anfärbarkeit für A_2B_5 nahm auch mit zunehmendem Alter und Reifegrad ab.

Aufgrund ihrer bipotentialen Eigenschaften entwickelten sich aus den CG – 4 – Progenitorzellen zu einem bestimmten Anteil Typ II – Astrozyten. Diese zeichneten sich durch die Anfärbarkeit mit GFAP besonders aus. Der Unterschied zu in – vivo vorkommenden Typ I – Astrozyten ist allerdings ihre gleichzeitige Anfärbarkeit durch A_2B_5 .

Die Umwandlung der CG – 4 – Zellen in Typ II – Astrozyten ist stark abhängig von der Konzentration des FKS. Bei einem 5%igen Anteil im Nährmedium beträgt ihr Anteil nach einer

Woche Wachstum etwa 5 %. Ist die Konzentration allerdings höher, würde der Anteil an Typ II – Astrozyten ebenfalls ansteigen, und zwar bis zu 50 %.

Die differenzierten Oligodendrozyten benötigen FKS als Bestandteil ihres Nährmediums. Um den Anteil an Astrozyten möglichst gering zu halten, wurde FKS erst zwei Tage nach Umsetzen der Zellen in eine neue Zellkulturflasche gegeben, da FKS bei reiferen Oligodendrozyten kaum noch eine Umwandlung in Astrozyten Typ II induziert. (Louis et al. 1992).

2.5.2 B – 104 – Zelllinie

Die B104 – Zellen entsprechen einer Neuroblastom – Zelllinie, welche zur Herstellung des mitogenenreichen B – 104 – Überstandes dient.