

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	Boehringer 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 Galactocerebroside (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 Färbverhalten änderte sich hinsichtlich einer vermehrten Markierung durch GalC und MBP. Die Anfärbbarkeit 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 Anfärbbarkeit mit GFAP besonders aus. Der Unterschied zu in – vivo vorkommenden Typ I – Astrozyten ist allerdings ihre gleichzeitige Anfärbbarkeit 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.