

3 METHODEN

3.1. Zellkultur

3.1.1 Anzucht, Konservierung und Pelletierung der CG – 4 – Zellen

Die Zellreihe wurde zur Konservierung im Kühlschrank bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Danach wurden die Zellen aufgetaut, in Volumina von neun bis zehn ml CG – 4 – Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche gefüllt, um dann bei einer optimalen Zelldichte von $1 - 2 \times 10^6$ / Flasche bei 37°C und einer CO_2 – Konzentration von 5% inkubiert werden zu können. Die CG – 4 – Zellen wurden in 80 cm^2 – Kulturflaschen aufgezogen, die vorher mit Polylysin (0,1mg/ml) für 30 Minuten beschichtet worden waren. Nach 72 Stunden hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet. Von diesem Zeitpunkt aus konnten die Zellen pelletiert, wieder konserviert oder zur Weiterzucht passagiert werden. In jedem Fall wurden die Zellen mit PBS gewaschen, danach wurden drei ml Trypsin – EDTA/ Flasche für zwei – drei Minuten dazugegeben. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop wurde der Ablöseprozess durch ein ml Trypsininhibitor unterbrochen. Die Suspension wurde in ein 15 ml – Falconröhrchen gegeben und die Flasche nochmals mit fünf ml PBS nachgespült, welches ebenfalls in das Falconröhrchen gegeben wurde. Die Zellsuspension wurde bei 25°C und $300 \times g$ zehn Minuten lang zentrifugiert.

- Zur Pelletierung wurde der Überstand abgegossen, die Zellen in RNase – freiem PBS in einem 1,5 ml – Eppendorfgefäß resuspendiert und kurz abzentrifugiert. Der Puffer wurde abgenommen und die Zellen in flüssigen Stickstoff getaucht, um dann bei -70°C für die nachfolgende mRNA – Isolierung aufbewahrt zu werden.
- Um die Zellen zu konservieren, wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in einem Cryoröhrchen mit CG – 4 – Medium mit 10% DMSO resuspendiert. Das Cryoröhrchen wurde in einem Cryo – freezing – Container bei -70°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen mit den Zellpellets in flüssigen Stickstoff transferiert.
- Um die Zellen zu passagieren, wurde der Überstand abgegossen und in Dulbecco's DMEM resuspendiert. Damit die optimale Zellmenge zur Weiterkultivierung ermittelt

werden konnte, erfolgte die Zählung der vitalen CG – 4 – Zellen in der Fuchs – Rosenthal – Kammer nach Anfärbung der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau. Die erforderliche Zellmenge konnte dann in die Flaschen verteilt werden, welche mit CG – 4 – bzw. mit N₂B₃ – Medium gefüllt waren. Zur Weiterpassagierung wurden nur Zellen verwendet, welche sich ausschließlich in CG – 4 – Medium befunden hatten. Zellen, die durch N₂B₃ – Medium ernährt wurden, wurden nach 14 Tagen Inkubation und mehrfacher Mediuerneruerung für die nachfolgende mRNA – Isolierung vorbereitet.

3.1.2 Bedingungen für Zellen im CG – 4 – Medium und Zellen im N₂B₃ – Medium

Die CG – 4 – Zellen wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, aufgetaut und in die Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden unter identischen Bedingungen (Aussaatanzahl, Zellkulturmedium, Wachstumszeit) gehalten. Für Zellen im CG – 4 – Medium bedeutete dies eine Ausgangszahl von ca. 10000 Zellen und eine Kultivierungszeit von 72 Stunden. Ein Mediumwechsel erfolgte nicht. Nach dieser Zeit konnten die etwa 1000000 Zellen zur Weiterverarbeitung geerntet werden.

Zellen, welche im N₂B₃ – Medium kultiviert wurden, wurden in einer Dichte von 900000 – 1000000 Zellen/ Kulturflasche ausgesät, da sie aufgrund des nicht mitogenen Mediums sich eher spärlich vermehrten.

Die Kultivierungszeit betrug 14 Tage, um eine Reifung der Zellen zu ermöglichen. Diese Zellen zeigten eine Neigung, in Typ II – Astrozyten zu differenzieren (siehe 2.2.1). Aufgrund der langen Kultivierungszeit war ein mehrmaliger Mediumwechsel (alle 3 – 4 Tage) erforderlich.

Für Anzucht in 12 – Well – Platten wurden Zellen, die im CG – 4 – Medium gehalten wurden, zu ca. 5000 ausgesät, etwas 13000 – 15000 Zellen wurden für die 14tägige Kultur im N₂B₃ – Medium verwendet.

3.1.3 Kultivierung der B – 104 – Zellreihe und Gewinnen des B – 104 – Überstandes

Die B – 104 – Zellen (ca. 1000000) wurden in 80 cm² – Kulturflaschen in serumhaltigen B – 104 – Kulturmedium über 24 Stunden angezüchtet und wachsen gelassen. Danach wurde der Überstand aus der Flasche abgezogen und verworfen, die Zellen zweimal mit Hank's Solution gewaschen. Dann wurden die Zellen in 13 ml serumfreien Kulturmedium resuspendiert und in eine 80 cm² – Kulturflasche übertragen. Die Zellen konnten über drei Tage wachsen, danach wurden die Überstände abgenommen und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit 0,2µ – Filtern steril filtriert und portionsweise bei – 20°C für die weitere Verwendung gelagert.

3.2 Zellcharakterisierung und Nachweis von Chemokinrezeptoren durch immunhistochemische Färbung

3.2.1 Anzucht von Zellen in 12 – Well – Platten

Ähnlich der Kultivierung in 80 cm² – Kulturflaschen wurden die Zellen in einer 12 – well – Platte auf polylysinbeschichteten Deckgläsern angezchtet. Für Zellen im CG – 4 – Medium wurden 10000 Zellen/ Deckglas über 72 Stunden Inkubationszeit eingesetzt. Bei Zellen im N₂B₃ – Medium wurden 10000 – 15000 Zellen/Deckglas bei 14 Tagen Inkubationszeit verwendet.

3.2.2 Färbemethoden und Antikörper

Zur Charakterisierung wurden verschiedene Antikörper verwendet. A₂B₅ für Oligodendrozytenvorläuferzellen, O4 für weiterentwickelte Vorläuferzellen, Galactocerebroside (GalC) und Myelin Basic Protein (MBP) für unreife Oligodendrozyten, Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) für Astrozyten.

Der Markierungsart liegt folgendes Prinzip zugrunde:

Der monoklonale Primärantikörper (bzw. polyklonal für GFAP) bindet mit dem Fab – Ende an die jeweilige antigene Komponente der betreffenden Zelle. Ein Sekundärantikörper, welcher mit einer fluoreszierenden Komponente beladen ist, verknüpft sich mit dem zugehörigen Fc – Teil des Primärantikörpers. Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann die Antikörperkette an ihrem Bindungsort an der Zelle sichtbar gemacht werden.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurde immer eine Negativkontrolle bestimmt, bei der kein Primärantikörper dazugegeben wurde.

3.2.3 Charakterisierung der Zelllinie bezüglich Identität und Entwicklungsgrad

Färbemethode:

- für intrazelluläre Marker GFAP und MBP die Zellen einmal mit PBS spülen, dann Fixation mit vierprozentigem Paraformaldehyd für 10 Minuten, danach Fixation mit Methanol (bei – 20°C) für zehn Minuten , trocknen lassen und anschließend Triton X – 100 0,2% für 15 Minuten dazugeben
- für Oberflächenmarker GalC, A₂B₅ und O4 erst Primärantikörperinkubation (siehe unten) und danach Fixation wie oben beschrieben
- Blockierung für 30 Minuten bei 37°C mit fünfprozentigem Goatserum (GS)

- Primärantikörper für eine Stunde bei 37°C einwirken lassen (Verdünnung mit zweiprozentigem GS, GFAP 1:100, MBP 1:100, A₂B₅ 1:1, GalC 1:1, O4 1:20), danach dreimal gründlich mit PBS spülen
- Sekundärantikörper (goat anti rabbit Cy 2 IgG für GFAP, GalC/ goat anti mouse Cy3 IgM für A₂B₅, O4, MBP) in der Verdünnung 1:100 mit zweiprozentigem GS für 45 – 60 Minuten bei 37°C einwirken lassen
- Zweimal gründlich mit PBS spülen, danach das Plättchen in destilliertem Wasser schwenken und mit 1 – 2 Tropfen Glycerol auf den Objektträger geben (evt. mit Lack fixieren)

3.2.3 *Nachweisen von spezifischen Chemokinrezeptoren*

- Zellen einmal mit PBS spülen, danach mit vierprozentigem Paraformaldehyd für zehn Minuten inkubieren, daraufhin für weitere 15 Minuten mit Triton X – 100 0,2% inkubieren
- Blockierung mit fünfprozentigem Donkeyserum (DS) für 30 Minuten
- Primärantikörper CCR1/ CCR3 1:30, CX3CR1 1:100 mit zweiprozentigem DS verdünnen und für 60 Minuten bei 37°C inkubieren, danach dreimal gründlich mit PBS spülen
- Sekundärantikörper (für CCR1/CCR3 donkey anti goat Cy2 IgG, für CX3CR1 donkey anti rabbit Cy2 IgG) 1:100 mit zweiprozentigem DS verdünnen und bei 37°C mind. 45 min inkubieren
- Zweimal mit PBS spülen, Plättchen in destilliertem Wasser schwenken und mit Glycerol auf den Objektträger geben

3.3 mRNA - Isolierung aus CG – 4 – Zellpellets

Wichtig ist hier ein Arbeiten mit RNase – freien Werkzeugen und Materialien. Die Methode ist für ca. 1×10^6 Zellen optimiert. Für jeden Ansatz wurde DNase I – Reaction Buffer 1:9 und 5x Incubation – Mix 1:5 verdünnt. Die Oligo(dT)25 – Beads wurden im Magnethalter zweimal mit Lysis – Binding – Puffer gewaschen. Das bei – 70°C konservierte Zellpellet wurde in Lysis –

Binding – Puffer für mindestens fünf Minuten resuspendiert. Zu den Beads wurde das Zelllysate nun hinzugegeben und sollte mindestens fünf Minuten lang binden. Nach jedem folgenden Waschschrift wurde der nicht bindende Überstand im Magnethalter verworfen. Danach wurden die Beads mit der gebundenen mRNA einmal mit SDS – haltigen Puffer und danach einmal mit Puffer ohne SDS gewaschen. Nun wurden die Beads mit dem DNase I – Reaction Buffer – Ansatz zweimal gewaschen. Zu den Beads wurden 15µl dH₂O, 2µl DNaseI Rct.Buffer, 2µl 10mM DTT und 1µl RNaseOUT gegeben und dieser Inhalt in ein neues Tube transferiert. Jetzt wurde 2µl DNase I hinzugegeben und bei 12 – 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 2µl 25mM EDTA zugegeben und bei 65°C 10 Minuten inkubiert und danach wurden die Beads zweimal mit dem Incubationmix – Ansatz gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz mit 12µl dH₂O, 4µl incubation mix, 2µl 0,1M DTT, 1µl 10 mM dNTP- Mix, 1µl RNaseOut und 1µl Reverse Transkriptase versetzt und für eine Stunde in der Hybridierungskammer bei 48°C rotiert.

Die folgenden Arbeitsschritte verlangten keine RNasefreien Instrumente. Zu den Beads wurden 50 µl 10mM Trispuffer /HCL pH 8 gegeben und auf 75°C erhitzt. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Beads mit 20 µl Trispuffer /HCL resuspendiert und für die nachfolgende PCR bei 4°C aufbewahrt.

3.4 Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

3.4.1 Zusammensetzung der Reagenzien, Modalitäten

Für einen Ansatz wurden 2,5µl TMAC, 5µl 10 x DNase Reaction Buffer, 4µl MgCl₂, 4µl dNTP- Mix, sowie 1µl Forward-Primer und 1µl Reverse – Primer vermischt. Die Menge von destilliertem H₂O richtete sich nach der Menge DNA, um eine Gesamtmenge von 50µl zu erlangen. Die Primer waren auf 20 pmol/µl verdünnt. Für die Amplifikation von cDNA wurden 3µl eingesetzt. Für die Reamplifikation wurde 1µl PCR – Produkt mit 9µl dest. H₂O verdünnt und 2 µl davon in der folgenden PCR als Ausgangsfaktor verwendet.

PCR – Konditionen:

Es wurden zwei Programme verwendet, welche sich in der annealing – Temperatur unterschieden.

Eine PCR bestand aus einem ersten Zyklus (3 min bei 94 °C, 30 sek bei **56°C / 53°C**, 30 sek bei 72 °C), danach wurden 0,5µl Taq – Polymerase / Ansatz dazugegeben. Anschließend folgte der zweite Zyklus (15 sek bei 94 °C, 30 sek bei **56°C / 53°C**, 30 sek bei 72 °C), welcher 34 x wiederholt wurde. Der dritte Zyklus wurde mit 30 sek bei 94°C, 30 sek bei **56°C / 53°C** und 10 min bei 72 °C durchgeführt. Danach wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt, um für die folgende Gelelektrophorese verwendet zu werden.

Bei einer DNA – Amplifikation aus dem direkten Produkt der mRNA – Isolierung wurde das Programm mit 53°C annealing – Temperatur verwendet, bei einer Reamplifikation das Programm mit der annealing – Temperatur von 56°C.

3.4.2 Primer

Zur Herstellung der Primer wurden publizierte Sequenzen der Ratte auf spezifische Abschnitte der bekannten Chemokinrezeptorsequenzen untersucht. Es wurden mehrere Primerpaare für einen Rezeptor eingesetzt, um eine optimale cDNA – Ausbeute zu ermitteln. Die betreffenden Rezeptoren mit ihren Sequenzen sind im Folgenden aufgelistet

Die Primerpaare, welche letztlich die deutlichsten Banden der jeweiligen Rezeptoren erzielten, sind fett markiert:

Primersequenzen: (5' to 3')

CCR1

F GGAGTTCACTCACCATACCTGTAG
R GGTCAGAGGAGGAAGAATAGAAG

CCR2

F CGCAGAGTTGACAAGTTGTG
F1 ACCCTGTTTCGCTGTAGGAAT
F2 GTAACGTGTGGTTGACATGC
R GCCATGGATGAACTGAGGTA
R1 CACCACCCAAGTGACTACAC
R2 GATTGTGGCAATGTGCTTTC
R3 CACTCGGTCTGCTGTCTCCCTA

CCR3

F GGCATCCAACGAAGAGGAACTGAA
F1 ACTCTGCTTAGATGCCCAAT
R ATCTCGCTGTACAAGGCCAGGTAA
R1 CCTCTACCAACAAAGGCATA

CCR4

F TCATGGATGTACCTGGTGGGCTTC
R TGTCTCAGGGTCTGATGATCATG

CCR5

F AACCTGGCCATCTCTGACCTG
F1 ACCCTGTTTCGCTGTAGGAAT

CCR10

F CTTCTTCCTGCTGTGGTTCC
R AGGTACTGGCGGAAACTGTG

CX3CR1

F CACTTCTGTGCTGACCCAAA
R TTTGGAAGTTGAGGGAGACG
F1 CACAGCCCAGATCATTGAGA
R1 AAAGGTGACGGTTGGAGCTA

CXCR1

F TGCATCAGTGTGGATCGATA
F1 GCGCTACTTGGTTAAATTCG
F2 TCTCTGAGCTGCAGGCTTCTC
F3 CAGGCTTCTCCAGCACACAAG
R CACATACATGCACGCACATA
R1 TAGTGGTGAGAGACGTGCGA
R2 TTGGTCATTGGAACCCCTCTTAC
R3 TTAACCAAGTAGCGCTTTCGG
R4 AGGTGCCCATGCATACGAATT

CXCR2

F TGCTGTGGTTGTATATAGC
F1 GCAAACCCTTCTACCGTAG
F2 TCACTTTCTTCCAGTTCAACCAG
F3 GAGACTTGGGAGCCACTCCAC

F2 GCAAGTCAATCCTGATCGTGT
 R GTAGCAGATGACCATGAC
 R1 ACACGATCAGGATTGACTTGC
 R2 TCAGCTTTCAAAGACCCAATC
 R3 TGTGGCTAAAGAAGAGTTTGG
 R4 GGCTAAAGAAGAGTTTGGGAAT

CCR7

F GTGTGCTTCTGCCAAGATGA
F1 TGGTTATCATCCGCACTCTG
 R AGGACTTGGCTTCGCTGTAG
R1 CAGCCCAAGTCCTTGAAGAG

Beta – Actin

F CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGG
 R ACCTTCAACACCGGAGCCATGTACG

rGFAP

F ATCTGGAAGAACCCTGACGAT
 R CCATACTTAGGGGCCAGAGAG

rCD11b

F CAGGGCAATCTGCTATTTGAC
 R CAAGCTTGTATAGGCCAGCAG

R GGTAGTGGAGGTGTTTCGCT
R1 AGAAGTGGATGGCGAAATT
 R2 GGGCAGCATCTGACAGAGTAAAG
 R3 CTGTTGATATCTAGGTTTCGCTG
R4 GGTTCCTTAACAGTAGTCCGA

CXCR3

F TGCCAGTACAACCTTCCCACA
 R CCATACTTAGGGGCCAGAGAG

CXCR4

F TCCAAGCTGTCCACTCCAA
R AGCCTCTGCTCATGGAATTG

3.5 Gelelektrophorese

3.5.1 Auftragen und Ablesen der PCR- Produkte

Es wurden 2%ige Agarosegele mit TAE-Puffer und BioRad Agarosegel angesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit 1µl Laufmittel verdünnt in einer Gesamtmenge von 10-20 µl aufgetragen und in der Elektrophoresekammer aufgetrennt. Dazu wurde zur Bestimmung der Bandenhöhe ein Basenpaar-Marker aufgetragen. Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad (0,5%) gelegt und nach 20 min in einem Wasserbad bei weiteren 20 min gewaschen. Die Höhe der Banden konnte nun durch UV – Licht sichtbar gemacht werden.

3.5.2 Größe der einzelnen Rezeptorsequenzen

Tabelle 4 zeigt die Position der Schnittstellen der jeweiligen Primerpaare und die sich daraus ergebende Größe der entsprechenden DNA.

Tabelle 4

Primerpaar	Positionen		Größe
	Anfang	Ende	
CCR1 – F/R	528	759	232
CCR2 – F2/R3	863	1068	206

CCR3 – F1/R1	899	1147	249
CCR4 – F/R	340	692	352
CCR5 – F/ R	301	731	430
CCR5 – F/R1	301	1093	792
CCR5 – F1/R1	747	1093	346
CCR5 – F1/R2	747	1291	544
CCR5 – F1/R3	747	1395	648
CCR5 – F1/R4	747	1392	645
CCR5 – F2/R2	1092	1291	199
CCR5 – F2/R3	1092	1395	303
CCR5 – F2/R4	1092	1392	300
CCR7 – F/R	189	493	304
CCR7 – F1/R1	860	1166	306
CCR10 – F/R	908	1102	195
CXCR1 – F/R	478	1266	788
CXCR1 – F/R1	478	1118	640
CXCR1 – F1/R	537	1266	729
CXCR1 – F1/R1	537	1118	581
CXCR1 – F2/R2	8	203	195
CXCR1 – F2/R3	8	551	543
CXCR1 – F3/R2	19	203	184
CXCR1 – F3/R3	19	511	492
CXCR2 – F/R	276	1203	927
CXCR2 – F/R1	276	1103	827
CXCR2 – F/R4	276	699	423
CXCR2 – F1/R	693	1203	510
CXCR2 – F1/R1	693	1103	410
CXCR2 – F2/R2	15	240	225
CXCR2 – F2/R3	15	271	256
CXCR2 – F2/R4	15	699	684
CXCR2 – F3/R2	67	240	173
CXCR2 – F3/R3	67	271	204
CXCR2 – F3/R4	67	699	632
CXCR3 – F/R	752	1049	297
CXCR4 – F/R	661	961	300
CX3CR1 – F1/R1	2366	2667	301

3.6 DNA-Aufreinigung

Die unter dem UV – Schirm identifizierten Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden mittels der Concert Rapid Gel Extraction (Gibco) aufgereinigt. Danach wurde die aufgereinigte DNA gefällt. Bei einem Gesamtvolumen von 50µl DNA wurden 5,5µl Natriumacetat (3 Molar) und 150µl 100%iges Ethanol, welches bei –20C° lagerte, dazugegeben. Der Ansatz wurde für mindestens zwei Stunden bei –20C° aufbewahrt. Danach wurde der Probenansatz bei 0C° und 13000g 35 Minuten und lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer feinen Glaspipette abgesaugt. Anschließend wurden 500µl 70%igen Ethanols zugegeben, welches bei 4C° aufbewahrt wurde. Der Zentrifugationsschritt wurde

wiederholt. Der Überstand wurde wieder mit einer feinen Glaspipette abgenommen. Der Niederschlag wurde daraufhin getrocknet. Die DNA wurde in 7µl dH₂O resuspendiert und in ein 100µl – Aufbewahrungsgefäß übertragen, um dann zur Sequenzierung einschickt werden zu können.

3.7 Sequenzierung

Die Proben wurden bei seqlab/ Göttingen sequenziert. Nach Erhalt der Sequenzierungsergebnisse konnten die Daten durch das „blast – search – Programm“ www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST im Internet verglichen werden. Das Programm prüft Übereinstimmungen der Sequenzergebnisse mit schon bekannten Rezeptorsequenzen.