

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Murines und humanes Gewebe

BALB/c Mäuse	Versuchstierzucht des BgVV, Berlin
Rag-2 <sup>-/-</sup> BALB/c Mäuse	Taconic, Germantown, NY, USA
GDF-3 <sup>-/-</sup> B16/SV129 Mäuse	Charles River/ Genetics Institute, Boston, MA, USA
humane Milz	Prof. Krenn, Pathologie, Charité Berlin
humanes Knochenmark	Prof. Krenn, Pathologie, Charité Berlin

#### 2.1.2 Antikörper und MACS MicroBeads

Die Antikörper wurden, sofern nicht anders angegeben, von Mitarbeitern des DRFZ aus den Überständen von Maus Hybridom-Zelllinien gewonnen. Bei biotinylierten oder mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern variieren die in den Versuchen eingesetzten Antikörper Konzentrationen von Charge zu Charge, da die Konjugationen unterschiedlich effizient sind. Die einzusetzenden Konzentrationen wurden individuell durch Titration für jede Charge neu festgelegt.

anti B220-FITC (CD45R)	DRFZ
anti CD11b-FITC (Mac-1)	DRFZ
anti CD11b-Biotin (Mac-1)	DRFZ
anti CD11c-Cy5 (N418)	DRFZ
anti CD45-PE (LCA)	BD PharMingen, Heidelberg
anti DX5-PE	BD PharMingen, Heidelberg
anti Thy1.2-PE (CD90)	DRFZ
_____	_____
Anti-NK Cell (DX5) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD11b (Mac-1) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD11c (N418) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD45R (B220) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD90 (Thy1.2) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mouse CD45 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 2.1.3 Plasmide

- pBlueSK/GDF3 Nde/Nsi (GDF-3 'Standard'; 807bp Fragment des 3'Bereiches, welches das LightCycler Amplikon enthält)
- pBlueSK/ISHprobe3 Nde/Nsi, Klon3.1 (Template für GDF-3 RNA Sonden für die *in situ* Hybridisierung)

### 2.1.4 Oligonukleotide

Nachfolgend aufgeführte Oligonukleotide (Primer und Sonden) wurden von TibMolbiol, Berlin synthetisiert.

GDF-3 Primer für 'Standard'	#144694	GDF3Ndeup	5' ATgCAGCCTTATCAACggCTT
	#144695	GDF3Nsi/3do	5' ATgACggTggCAGAAgTTCCT
βActin Primer (cDNA-check)	#139466	β-Act up	5' gTggggCgCCCCAggCACCA
	#139467	β-Act do	5' CTCCTTAATgTCAAGCACgATTTC
hGDF3 primer (Thermocycler)	#256829	hGDF-3up2	5' CAGAAgTTCCAACCTgTgCCTT
	#256830	hGDF-3do1	5' CACACATgAggCTCCTgAACCA
GDF-3 LC Primer	#211269	GDF3LCup2x	5' gACCTTTTgCAGTTTCTgggAT
	#199191	GDF3LCdo2	5' CCAAATTCTTCAGTCggTTgCT
GDF-3 LC Sonden	#200797	GDF3 FL	5' CCCACgAACACCCAgCTCCTTCAC-FL
	#200798	GDF3 LC	5' LC-AgCATAAgtCCTgCgAggCCCCACT
βActin LC Primer	#135505	mu βAct se	5' CCgTgAAAAGATgACCCAgAT
	#135506	mu βAct as	5' CTCAGCTgTggTggTgAAgC
βActin LC Sonden	#171008	mu βAct FL	5' TCTCCCTCACgCCATCCTgCgTCT-FL
	#171009	mu βAct 640	5' LC-ACCTggCTggCCgggACCTgA
HPRT LC Primer	#279651	HPRT se	5' gCTggTgAAAaggACCTCT
	#279652	HPRT as	5' CACaggACTAgAACACCTgC
HPRT LC Sonden	#279653	HPRT 3FL	5' AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgTTgA-FL
	#279654	HPRT 5LC	5' LC-TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTG
GDF-3 Primer für Sonde (in situ)	#144699	GDF3pro3up	5'gATCgCATATggAgCAGAAACCgACTgAA
	#144695	GDF3Nsi/3do	5'gAATCATgCATgACggTggCAGAAgTTCCT
Oligo dT (RT-PCR)	#140978	(dT)15	5' TTTTTTTTTTTTTTTT

## 2.1.5 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchfluscytometer FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Fotodokumentation	Cybertech/ peqlab, Erlangen
Gelelektrophorese-Kammern	peqlab, Erlangen
LightCycler Instrument	Roche, Mannheim
MACS Separation Columns (Trennsäulen)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotom HM 500 OM	Mikrom, Heidelberg
MiniMACS/ MidiMACS Separator (Magneten)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Rotor-Stator Homogenisator	Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Stauffen
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

## 2.1.6 Enzyme

DNase	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim; NEBiolabs, Frankfurt a.M.; MBI Fermentas, Vilnius, Litaun
SA-AP (Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase)	Roche, Mannheim
SuperSCRIPT II (Reverse Transkriptase)	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
T3 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	peqlab, Erlangen
Taq-Polymerase	eigener Klon

## 2.1.7 Reaktionskits

Jetsorb Gelextraction Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
LightCycler RNA Amplification Kit Hybridisation Probes	Roche, Mannheim
LightCycler DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes	Roche, Mannheim
Oligotex mRNA Mini/Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini/Midi Kit	Qiagen, Hilden

## 2.1.8 Puffer

Beschichtungspuffer Objektträger ( <i>in situ</i> Hybr./ Immunohistochemie)	Aceton 2% APES
Entwicklungspuffer für Fuchsin Färbung (pH 9,75)	8,7g NaCl 1,5g Tris-HCl 4,9g Tris Base add 1Liter aqua dest.
FACS Puffer	PBS 0,5% BSA 0,01% NaN <sub>3</sub>
Hybridisierungspuffer ( <i>in situ</i> Hybridisierung)	100% Formamid 5mM NaCl 1M Tris-HCl (pH 7,6) 0,5M EDTA 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,0) 40% Dextran Sulfat 50% Denhardts 10mg/ml Hefe RNA
Ligationspuffer (T4 Ligase)	peqlab, Erlangen

PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/BSA	PBS 0,5% w/v BSA
20x SSC	175g NaCl 88g Na <sub>3</sub> -Citrat
PCR Puffer	Genexpress, Berlin
TAE	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA
TBS (pH 7,4)	25mM Tris-HCl 150mM NaCl
TE	10mM Tris-HCl, pH 8 0,1mM EDTA
TES	10mM Tris-HCl 1mM EDTA 0,1% SDS
Transkriptionspuffer (RT), DTT	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Transkriptionspuffer (RNA Pol.)	Roche, Mannheim

## 2.1.9 Chemikalien und Radiochemikalien

Acetanhydrid	Sigma, Steinheim
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (Ultrapure)	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Steinheim
APES	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
Cyo-Einbettmedium Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
DEPC	Sigma, Steinheim
dNTPs	peqlab, Erlangen
DPX zum Einbetten histolog. Schnitte	Fluka/ Sigma, Steinheim
Entwickler D-19	Kodak, Stuttgart
Eosin	Merck, Darmstadt
EtBr	Sigma, Steinheim
EtOH absolut	Merck, Darmstadt
FCS	Sigma, Steinheim
Fixierer	Kodak, Stuttgart
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma, Steinheim
Glycogen	Roche, Mannheim
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Ionomycin	Sigma, Steinheim
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
LB Medium (Kapseln)	BIO 101, CA USA
Levamisol	Sigma, Steinheim
L-Glutamat	Seromed, Berlin
LiCl	Merck, Darmstadt
LPS	Sigma, Steinheim
MACS MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim

Molekulargewichtsstandards (Marker VI+VII)	Roche, Mannheim
NaCl	Sigma, Steinheim
NaNO <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim
Naphtol AS-Mix-Phosphat	Sigma, Steinheim
Neufuchsin	Sigma, Steinheim
NTPs	Roche, Mannheim
Ovalbumin	zur Verfügung gestellt durch Dr. Kramer, Charité, Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim
PBS	Sigma, Steinheim
Penicillin	Seromed, Berlin
Photoemulsion NTB-2	Kodak, Stuttgart
PMA	Sigma, Steinheim
Orange G (Probenpuffer für Agarose Gele)	Sigma, Steinheim
Propandiol	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
RNasin (40U/μl)	Roche, Mannheim
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Rotisol	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
SA-AP	Roche, Mannheim
SEB	Sigma, Steinheim
Streptomycin	Seromed, Berlin
Triethanolamin (TEA)	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
TrypanBlue Solution (0,4%)	Sigma, Steinheim
UTP <sup>33</sup>	Amersham, Freiburg
Yeast RNA	GibcoBRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

### 2.1.10 Medien

Agar	LB Medium 1,5g Agar-Agar add 100ml aqua dest.
LB Medium	10g Tryptone 5g Hefeextrakt 10g NaCl add 1l aqua dest.
RPMI plus (Kulturmedium mit Zusätzen)	RPMI 1640 10% FCS 10mM L-Glutamat 100U/ml Penicillin 100ug/ml Streptomycin

### 2.1.11 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchsmaterialien

Kanülen, Spritzen	Braun, Melsungen
Kunststoffschalen (zum Einbetten von Gewebe)	Miles Inc., Elkhart, USA
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Objektträger (Menzel)	Roth, Karlsruhe
Petrischalen, Pipetten, Zellkulturflaschen	Corning/Costar, Bodenheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rnase-freie Pipettenspitzen mit Filter (ART)	Fisher Scientific, Heidelberg
Zellschaber	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, Cellstrainer	Falcon, Heidelberg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Strategie zur Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen

Zur Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen wurde eine Kombination aus quantitativer RT-PCR, Zellsortierung und *in situ* Hybridisierung gewählt (Abb.5). Lymphatische Gewebe wurden dazu 6-8 Wochen alten, männlichen BALB/c Mäusen entnommen, die mRNA präpariert und in cDNA umgeschrieben. Alternativ wurden definierte Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (*magnetic cell sorting*, MACS) separiert und von diesen Zellen ebenfalls die mRNA bzw. cDNA gewonnen. Die cDNA Proben wurden anschließend im LightCycler quantitativ analysiert. Für den Nachweis des GDF-3 Transkripts im morphologischen Zusammenhang wurden 6µm dicke Gewebeschnitte der Milz angefertigt und diese durch *in situ* Hybridisierung untersucht.

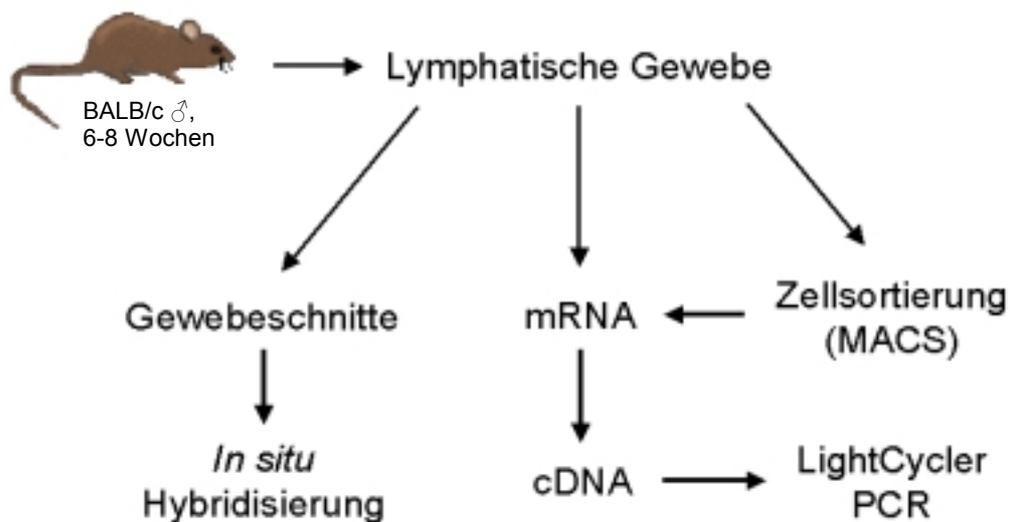


Abb.5: Strategie zur Identifizierung der GDF-3 'Quelle'. Erklärungen im Text.

### 2.2.2 Isolation der lymphatischen Gewebe

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Um die Milz zu entnehmen, wurden die Tiere auf den Bauch gelegt und linksseitig mit einer sterilen Schere ein ca. 1,5cm langer longitudinaler Hautschnitt geführt, das Peritoneum geöffnet und die Milz mit Hilfe einer stumpfen, sterilen Pinzette entnommen. Zur Präparation der RNA aus Gesamtmilz wurde das

Organ direkt in Lysispuffer überführt. Zur MACS Separierung bzw. zur Kultivierung wurde unter sterilen Bedingungen zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt (s.2.2.5).

Zur Entnahme des Thymus wurden die getöteten Tiere dorsal an Vorder- und Hinterbeinen auf einer Präparierplatte fixiert, der Brustkorb und Halsbereich mit einer Schere geöffnet und das über dem Herzen liegende Organ vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette entfernt.

Das Knochenmark wurde aus dem linken und rechten Femur entnommen. Dazu wurde der Knochen mit einer Schere zunächst freigelegt, der Muskel entfernt, und der Knochen mit Hilfe einer Pinzette aus Hüft- und Kniegelenk gelöst. Die Knochen wurden dann in eine mit PBS gefüllte kleine Petrischale überführt, an den Enden mit einer Knochenschere geöffnet und das Gewebe mit einer Spritze aus dem Knochen gespült. Dazu wurde eine 23G Kanüle verwendet. Die Zellen wurden durch Resuspendieren mit einer 1ml Pipette vereinzelt und anschließend 10min bei 1200rpm zentrifugiert. Die Präparation der Knochenmarkzellen wurde auf Eis durchgeführt.

Es wurden sowohl Darm-assoziierte (mesenterische) als auch periphere Lymphknoten (inguinal, paraaortisch, poplietal, brachial, axial) präpariert. Dazu wurden die Tiere zunächst in dorsaler Position an den Extremitäten fixiert und die Haut durch einen longitudinalen Schnitt über den gesamten Brust- und Bauchraum hinweg aufgetrennt. Mit Hilfe einer stumpfen Pinzette wurde die Haut dann vom darunter liegenden Peritoneum gelöst und die peripheren Lymphknoten so zugänglich gemacht. Zur Entnahme der mesenterischen Lymphknoten wurde im Anschluss das Peritoneum geöffnet und der Darm freigelegt.

### 2.2.3 mRNA Präparation

Eine entscheidende Voraussetzung für den sensitiven Nachweis von Transkripten in der RT-PCR bzw. *in situ* Hybridisierung ist die Qualität der RNA sowie ein konsequentes RNase-freies Arbeiten. Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme. Sie sind schwierig zu inaktivieren, und bereits kleinste Mengen sind ausreichend, um RNA zu zerstören. Beim Umgang mit RNA mussten daher einige Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, um eine RNase-Kontaminationen zu vermeiden:

- bei allen Arbeiten wurden RNase-freie Handschuhe getragen,
- wenn möglich wurden sterile Einmal-Kunststoff-Artikel (Pipetten, Reaktionsgefäße, etc.) verwendet,
- benötigte Glaswaren wurden mind. 4 Std. bei 240°C gebacken,

- alle Lösungen wurden mit speziell für RNA-Arbeiten vorbehaltenen Chemikalien angesetzt, 12 Std. mit 0,1% DEPC behandelt und anschließend 15min autoklaviert
- Puffer, die Tris enthalten und daher nicht mit DEPC behandelt werden konnten, wurden mit DEPC-vorbehandeltem Wasser angesetzt.

Um aus Gesamtgeweben bzw. gereinigten Zellpopulationen mRNA zu gewinnen, wurden die Proben im ersten Schritt mit einem Rotor-Stator Homogenisator in Lysis Puffer homogenisiert. Die mRNA wurde dann in zwei Schritten präpariert. Zunächst wurde mit Hilfe des 'RNeasy Midi Kits' die Gesamt-RNA (*total RNA*) isoliert; anschließend wurde das 'Oligotex mRNA Mini oder Midi Kit' verwendet, um die polyA<sup>+</sup> RNA aus Gesamt-RNA zu gewinnen. Diese Vorgehensweise erlaubt in der Regel eine höhere Anreicherung der mRNA, da eine Behinderung durch andere zelluläre Komponenten ausgeschlossen werden kann.

Die Präparation der Gesamt-RNA beruht auf der Bindung und späteren Elution der Ribonukleinsäuren unter spezifischen Pufferbedingungen auf einer speziell entwickelten Säule. Die mRNA Isolation erfolgte mit Oligo-dT-beschichteten Latex-Partikeln (Oligotex), welche unter Hochsalz-Bedingungen spezifisch an die polyA<sup>+</sup> Bereiche der mRNA hybridisieren und auf einer Säule gebunden werden, von welcher die mRNA schließlich mit H<sub>2</sub>O eluiert werden kann.

#### 2.2.4 cDNA Präparation

Für die cDNA Präparation wurde mRNA eingesetzt. Als Enzym wurde die RNase-freie Reverse Transkriptase *SuperScript II* der Firma BRL Gibco verwendet. Sie wird mit dem dazugehörigen Transkriptionspuffer (*5x First Strand Buffer*) und DTT geliefert. Nach den Angaben des Herstellers wurden für einen 20µl Ansatz folgende Komponenten in einem RNase-freien Reaktionsgefäß zusammengegeben:

- 1µl Oligo(dT)<sub>15</sub> (500µg/ml)
- 1µl dNTPs (10mM je dNTP)
- 200-500ng mRNA
- RNase-freies aqua dest. add 12µl

Das Gemisch wurde im Thermocycler 5min bei 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

- 4µl 5x *First Strand Buffer*
- 2µl 0,1M DTT

Es folgte eine 2minütige Erwärmung bei 42°C, bevor 1µl SuperScript (200U) dazugegeben wurde. Alle Komponenten wurden mit der Pipette gründlich vermischt und dann 50min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Die RT-Reaktion wurde im Anschluss 10min bei 70°C hitze-inaktiviert.

Bevor die fertige cDNA zur Analyse im LightCycler eingesetzt wurde, wurde ihre Qualität durch eine βActin PCR im Thermocycler überprüft (cDNA-check). Für eine 20µl Reaktion wurden in der Regel 0,5µl der cDNA eingesetzt, und nach der PCR 10µl dieser Reaktion gelelektrophoretisch analysiert. Das PCR-Gemisch hatte folgende Zusammensetzung:

- 0,5µl cDNA
- 2µl 10x PCR Puffer
- 1µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0,2 µl dNTPs (25mM)
- 0,4µl Taq Polymerase
- 0,4µl Primer βAct up (50µM)
- 0,4µl Primer βAct do (50µM)
- 15,1µl bidest

Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

95°C	1min	
95°C	1min	} 32x
62°C	1min	
72°C	1min	
72°C	10min	
4°C		

### 2.2.5 Zellsortierung (MACS)

Zellen können mit Hilfe der MACS Technologie (*magnetic cell sorting*) in hoher Reinheit aus komplexen Zellgemischen gewonnen werden. Dazu werden sie spezifisch mit paramagnetischen Partikeln, den MACS *MicroBeads*, markiert und auf eine Trennsäule gegeben, welche in einem starken Magneten platziert ist. In der Matrix der Säule entsteht ein magnetisches Feld, in welchem markierte Zellen zurückgehalten werden, während nicht-

markierte Zellen die Matrix ungehindert passieren. Nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld werden die magnetisch zurückgehaltenen Zellen eluiert. Markierte Zellen (angereicherte/positive Fraktion) und unmarkierte Zellen (depletierte/negative Fraktion) können so fast vollständig wiedergewonnen werden (Abb.6). Die Reinheit der einzelnen Fraktionen kann im FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorter*) überprüft werden (s.2.2.7).

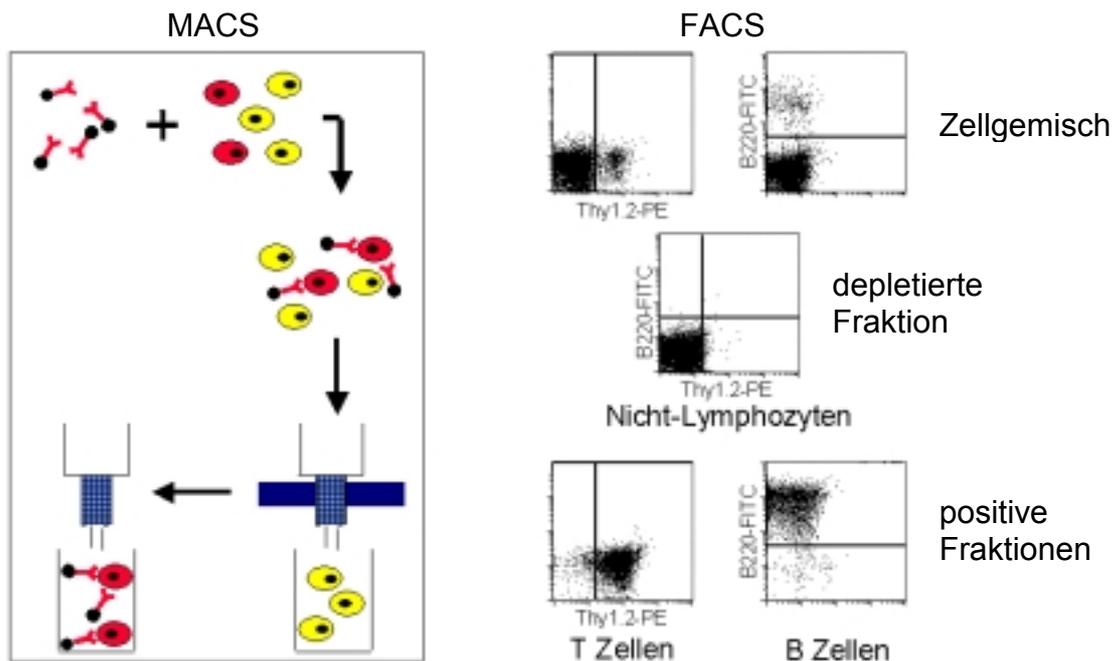


Abb.6: Schematische Darstellung der Zellsortierung mit Hilfe der MACS Technologie (links). Zellen eines Zellgemisches werden mit Antikörper-konjugierten magnetischen Partikeln spezifisch markiert und anschließend in der Matrix einer Trennsäule im magnetischen Feld zurückgehalten, während die nicht-markierten Zellen die Säule ungehindert passieren. Die markierten Zellen können nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wird im FACS überprüft (rechts). Gezeigt ist das Ergebnis einer MACS Separierung am Beispiel der Lymphozyten-Trennung.

Die MACS Zellseparation wurde innerhalb weniger Stunden auf Eis durchgeführt. Aufgrund der schonenden Behandlung der Zellen sowie der geringen Größe der magnetischen Beads ist eine Beeinflussung der Zellfunktion oder –vitalität nicht zu erwarten.

Um die Zellen verschiedener lymphatischer Gewebe markieren und sortieren zu können, ist es zunächst erforderlich, eine **Einzelzellsuspension** herzustellen. Dazu wurde das Organ in ein engmaschiges Metallsieb gelegt und in eine Petrischale auf Eis getaucht, welche PBS/BSA

oder Medium enthielt. Mit Hilfe eines Spritzenkolbens wurde das Gewebe durch das Sieb hindurch gepresst und mit einer 1ml Pipette homogenisiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 200g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend gewaschen und in etwas PBS/BSA resuspendiert. Zelldebris wurde mittels eines sogenannten *Cellstrainers* (Plastikfilter mit 70µm Poren) entfernt. 100µl der Zellsuspension wurden entnommen, um die Zellzahl zu bestimmen (s.2.2.11).

Zur magnetischen Markierung wurden die Zellen in 90µl PBS/BSA pro  $10^7$  Zellen resuspendiert und nach den Vorgaben des Herstellers 10µl MicroBeads pro  $10^7$  Zellen dazugegeben. Das Gemisch wurde im Kühlschrank (10°C) 15min inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellen mit dem entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörper, welche eine spätere Analyse der Trennung im FACS ermöglicht. Verwendet wurden Antikörper, welche jeweils das gleiche Oberflächenmolekül wie zuvor die magnetischen Beads erkennen. Die Inkubation erfolgte für ca. 8min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in 500µl PBS/BSA pro  $10^8$  Zellen resuspendiert. Die Kapazität der zur Trennung verwendeten Säule bzw. Magneten richtete sich nach der Anzahl der zu separierenden Zellen. Die entsprechende Säule wurde mit eiskaltem PBS/BSA äquilibriert, die Zellsuspension aufgetragen und die Säule nach den Angaben des Herstellers gewaschen. Die negative Fraktion wurde in einem Reaktionsgefäß auf Eis aufgefangen. Schließlich wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, und die positiven Zellen mit Hilfe eines Spritzenstempels unter leichtem Druck eluiert. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde überprüft, indem ein Aliquot der Zellen im FACS analysiert wurde. Um die Reinheit einzelner Fraktionen zu erhöhen, wurde der Vorgang gegebenenfalls mit einer weiteren Säule wiederholt.

### 2.2.6 Trennung lymphatischer Zellen durch Adhärenz

Zellen lymphatischer Gewebe unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zu adhärentem Wachstum. Zellen, die sich während der Kultivierung an die Oberfläche von Plastikgefäßen anheften, lassen sich daher von den übrigen Zellen des Gewebes trennen. Zur Trennung der Zellen wurde zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt (s.2.2.5), die Zellzahl bestimmt (s.2.2.11) und die Zellen in RPMI plus Medium resuspendiert. Mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen dann im Kulturgefäß ausgesät und 3 Std. im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert<sup>97</sup>. Anschließend wurden die nicht-adhärennten Zellen vorsichtig mit

einer Pipette zusammen mit dem Medium abgenommen. Die zurückbleibenden adhärenen Zellen wurden mehrmals mit PBS gespült, mit Hilfe eines Zellschabers von der Plastikoberfläche entfernt und abpipettiert.

### 2.2.7 Durchflusscytometrie (FACS)

Die Durchflusscytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung gefärbter Einzelzellen in Suspension anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Beim Durchflusscytometer findet eine gleichzeitige Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzfarben statt. Zur Analyse wird die Zellsuspension in ein Probenröhrchen gegeben. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich geleitet. Hier treten sie in eine haarfeine Messküvette ein, die von einem fokussierten Argon-Laser (488 nm, 200 mW) durchstrahlt wird. Die Zellen können den Laser nur einzeln passieren. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden durch Spiegel- und Filtersysteme auf die verschiedenen Photoverstärkerröhren geleitet. Über einen angeschlossenen Computer werden die Messdaten verarbeitet und gespeichert. Von jeder Zelle werden die folgenden fünf Parameter analysiert :

- Vorwärtslichtstreuung (FSC, *forward scatter*; 2-10° zum einfallenden Licht), welche proportional zur Zellgröße ist,
- Seitwärtslichtstreuung (SSC, *sideward scatter*; 90° zum einfallenden Licht), welche proportional zur Oberflächenstruktur (Membranfaltung) und Granularität der Zelle ist,
- Fluoreszenzintensität 1 (FL 1), welche proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist. FITC hat ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 520 nm und 530 nm.
- Fluoreszenzintensität 2 (FL 2), welche proportional zu der Intensität der Anfärbung einer Zelle mit R-Phycoerythrin (PE) ist. Dieses hat ein Absorptionsmaximum von 488 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 570 und 576 nm.
- Fluoreszenzintensität 3 (FL 3), welche proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit Propidiumiodid (PI) oder Cy5 ist. PI hat ein Absorptionsmaximum von 536 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm. Cy5 hat ein Absorptionsmaximum zwischen 625 und 650 nm und ein Emissionsmaximum von 670 nm.

Bevor die Proben gemessen werden, muss ein Referenzwert vorgegeben werden, so dass relative Veränderungen der Fluoreszenzintensität bestimmt werden können. Dieser Referenzwert wurde mit Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper markiert waren, im *setup* Modus des Gerätes eingestellt. Im Modus *measure* (Datenaufnahme) wurden dann ca. 10000-30000 Zellen je Probe gezählt und analysiert. Die Auswertung erfolgte auf einem Macintosh-Computer mit Hilfe der „CELLQuest Research Software“ (Becton Dickinson) als zweiparametrisches Diagramm (*Dot-Plot*), in dem jede Zelle als ein Punkt dargestellt ist.

### 2.2.8 Quantitative LightCycler PCR

Das LightCycler System erlaubt es, eine PCR Reaktion in vergleichbar kurzer Zeit durchzuführen (45 Zyklen in ca. 30min), dabei die Amplifikation simultan auf einem Monitor zu verfolgen (*online* und in '*real-time*'), und die Ergebnisse anschließend zu quantifizieren.

Das **SYBR Green Format** basiert auf der Verwendung des Farbstoffes SYBR Green, welcher fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Dieses Format wurde verwendet, um die geeignete Primer Kombination für die GDF-3 spezifische LightCycler PCR auszuwählen. Da der Farbstoff an alle doppelsträngigen DNA Moleküle bindet, lassen sich neben dem Amplifikationsprodukt auch Primer-Dimere sichtbar machen. Man erkennt diese an ihrem charakteristisch niedrigen Schmelzpunkt in der im Anschluss an die Amplifikation durchgeführten Schmelzpunktanalyse. Für die weitere Verwendung wurde die Primer Kombination mit der geringsten Tendenz zur Bildung von Primer-Dimeren gewählt.

Da SYBR Green auch unspezifische Nebenprodukte färbt, welche während der PCR Reaktion auftreten können (u.a. Primer-Dimere), ist dieses Format zur Quantifizierung eines spezifischen Templates nicht geeignet.

Zur Quantifizierung des GDF-3 Templates in lymphatischen Gesamtgeweben bzw. in definierten Zellpopulationen lymphatischer Gewebe wurde das **Hybridisierungssonden Format** verwendet. Anders als das SYBR Green Format erlaubt es den Sequenz-spezifischen Nachweis eines Templates im Reaktionsgemisch. Die Sequenz-spezifische Detektion des PCR Produktes beruht auf der Verwendung sogenannter Hybridisierungssonden (*hybridisation probes*). Dies sind zwei modifizierte Oligonukleotide, welche komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des amplifizierten Produktes sind und die zusätzlich zu den normalen Primern eingesetzt werden (Abb.7). Eine der Sonden ist an ihrem 3'Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FL) markiert, die zweite Sonde trägt an ihrem 5'Ende

*LC red 640* als Fluorophor. Nur nach der Sequenz-spezifischen Hybridisierung gelangen beide Farbstoffe in unmittelbare räumliche Nähe, was den Transfer fluoreszenter Energie ermöglicht (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*). Während des FRET wird ein Teil der Anregungsenergie vom Donor-Fluorophor auf das Akzeptor-Fluorophor übertragen. Die vom Akzeptor-Fluorophor daraufhin emittierte Fluoreszenz bestimmter Wellenlänge wird schließlich vom LightCycler detektiert (Abb.7).

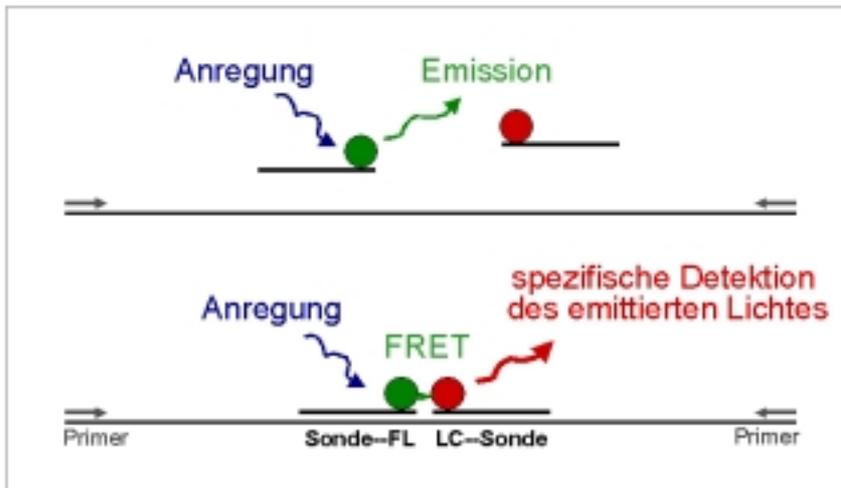


Abb.7: Schematische Darstellung des LightCycler Prinzips. Nach der Sequenz-spezifischen Hybridisierung gelangen die Fluoreszenzfarbstoffe der Hybridisierungs sonden in unmittelbare räumliche Nähe, was den Transfer fluoreszenter Energie ermöglicht (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*). Während des FRET wird ein Teil der Anregungsenergie vom Donor-Fluorophor (grün) auf das Akzeptor-Fluorophor (rot) übertragen. Die vom Akzeptor-Fluorophor emittierte Fluoreszenz bestimmter Wellenlänge wird vom LightCycler detektiert.

Die emittierte Fluoreszenz wird einmal pro Amplifikationszyklus, am Ende des Annealingschrittes, gemessen. Sie verhält sich proportional zu der Menge des spezifischen Templates, welches sich im Reaktionsgemisch befindet. Die LightCycler Software kalkuliert automatisch die fraktionelle Zykluszahl, nach der sich die gemessene Fluoreszenzintensität zum ersten Mal von der Hintergrundstrahlung abhebt. Diesen Punkt, an dem die PCR Reaktion in den gemessenen Proben die logarithmische Phase erreicht, nennt man *crossing point* (cp). Je weniger Template-Moleküle zu Beginn der Reaktion in einer Probe enthalten sind, desto mehr Amplifikationszyklen sind notwendig, bevor ein Fluoreszenzsignal messbar ist und der cp erreicht wird. Bei der relativen Quantifizierung ergeben sich die Unterschiede in der Templatekonzentration der einzelnen Proben entsprechend aus den Abständen ihrer cps

( $\Delta c_p$ s). Voraussetzung ist, dass die cDNA Proben zuvor normalisiert wurden, also direkt miteinander vergleichbar sind. Vor der Bestimmung der Templatekonzentration des Ziel-Gens, hier GDF-3, wurden die cDNA Proben daher auf die Expression des Haushaltgens  $\beta$ Actin **normalisiert** und in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Zur genauen Berechnung der Templatekonzentration eines Ziel-Gens muss außerdem die Amplifikations-effizienz der Reaktion bekannt sein. Letztere wurde für GDF-3 durch eine Titrationsreihe berechnet, in welcher bekannte Konzentrationen des GDF-3 'Standards' (pBlueSK/GDF3 Nde/Nsi) eingesetzt wurden (Abb.8).

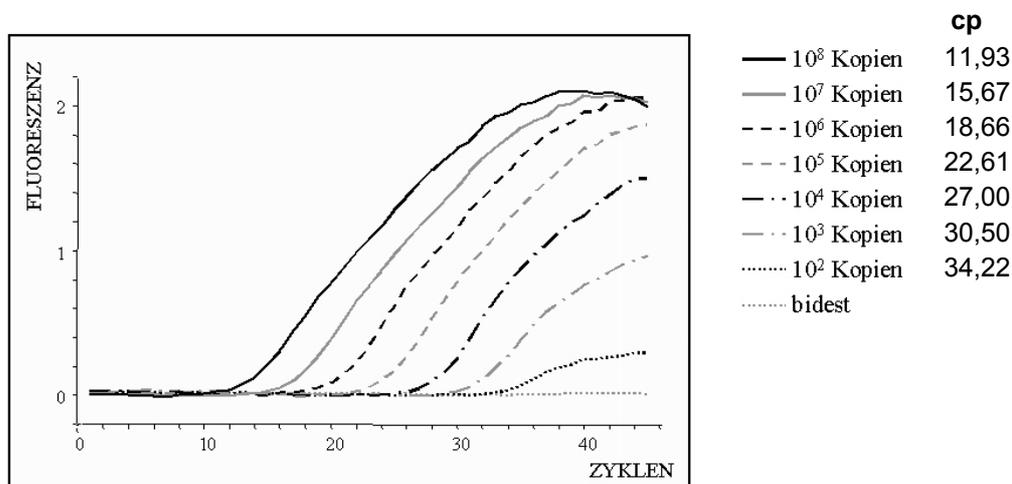


Abb.8: GDF-3 spezifische LightCycler PCR. Als Template diente GDF-3 cDNA, welche zuvor in ein Plasmid kloniert wurde (s.2.2.16). Rechts sind die für die einzelnen Proben von der LightCycler Software kalkulierten cps angegeben.

Theoretisch liegt die optimale Effizienz einer PCR Reaktion bei zwei – dies entspräche einer vollständigen Replikation des Templates pro Zyklus. Die **Amplifikationseffizienz** E lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$E = 10^{1/\Delta c_p}$$

Die Amplifikationseffizienz für die GDF-3 spezifische LightCycler PCR ergibt sich aus dem Mittelwert von  $\Delta c_p$  für die in Abb.8 gezeigte GDF-3 spezifische PCR Reaktion. Er ist 3,715. Entsprechend lässt sich Amplifikationseffizienz für GDF-3 ( $E_{\text{GDF3}}$ ) wie folgt berechnen:

$$\begin{aligned} E_{\text{GDF3}} &= 10^{1/3,715} \\ &= 1,86 \end{aligned}$$

Die spezifische Amplifikationseffizienz wurde bei der relativen **Quantifizierung der GDF-3 Templatekonzentrationen** (TK) in den untersuchten Proben berücksichtigt. Die Formel lautet:

$$TK_{GDF3} = E_{GDF3}^{\Delta cp}$$

Um Messfehler durch zufällig auftretende Schwankungen zu vermeiden, wurden pro Experiment in der Regel zwei LightCycler Läufe durchgeführt und das Ergebnis gemittelt.

Das Reaktionsgemisch für die **GDF-3 LightCycler PCR** hatte folgende Zusammensetzung:

- 2-5 µl cDNA (1:10 verdünnt)
- 2µl 10x PCR Puffer
- 2,8µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), Endkonz. 3,5mM
- 1µl dNTPs (10mM)
- 0,5µl Taq Polymerase (5U/µl)
- 0,4µl BSA (6mg/ml)
- 1µl GDF3LCup2x (10µM)
- 1µl GDF3LCdo2 (10µM)
- 1µl GDF3FL (4µM)
- 1µl GDF3LC (4µM)
- add 20µl bidest

Das GDF-3 Amplifikat hat eine Länge von 514bp. Die Elongationsrate im LightCycler beträgt 25bp/sec. Entsprechend wurden die Reaktionsbedingungen wie folgt gewählt:

95°C	2min	
95°C	1sec	} 45x
60°C	10sec	
72°C	22sec	
40°C	30sec	

Für die **βActin LightCycler PCR** ergaben sich Unterschiede in der MgCl<sub>2</sub> Konzentration (Optimum bei 4,5mM) sowie in der Elongationszeit aufgrund des kürzeren Amplifikates (12sec für 270bp). Die Programmierung für die **HPRT LightCycler PCR** sieht eine Elongationszeit von 15sec für 249bp vor. Die Endkonzentration für MgCl<sub>2</sub> ist 3,125mM.

### 2.2.9 Anfertigung histologischer Gewebeschnitte

Die Objektträger wurden zur besseren Aufnahme des Gewebes beschichtet. Dazu wurden sie zunächst 5min in Aceton entfettet und anschließend 5min in Beschichtungspuffer (2% APES) getaucht. Schließlich wurden sie 5min in H<sub>2</sub>O gewaschen, an der Luft getrocknet, in Aluminiumfolie gewickelt und 2 Std. bei 250°C gebacken.

Zum Schneiden wurden die Gewebe mit Einbettmedium in Kunststoffschälchen eingebettet und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. In dieser Form lassen sich die Gewebe dauerhaft bei -20°C lagern. Um einzelne Zellschichten zu gewinnen, wurden von dem Gewebe mit Hilfe eines Mikrotoms bei -20°C 6µm dicke Schnitte gefertigt und diese auf APES-beschichteten Objektträgern aufgenommen. Anschließend wurden die Schnitte etwa 1min bei 50°C auf einem Heizblock getrocknet und 10min in Aceton fixiert. Nach dem vollständigen Trocken an der Luft wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung zusammen mit etwas CaCl<sub>2</sub>, welches entstehende Feuchtigkeit aufnimmt, bei -20°C gelagert.

### 2.2.10 *In situ* Hybridisierung

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) am Gewebeschnitt und birgt - im Unterschied etwa zur PCR-Technik - den Vorteil, dass eine positive Reaktion in Bezug zur Morphologie gesetzt werden kann. Sie wurde eingesetzt, um die GDF-3 exprimierenden Zellen mit Hilfe radioaktiv markierter RNA-Sonden in der Milz darzustellen.

Nachfolgend beschriebene Arbeiten, welche die Verwendung radioaktiver Nukleotide oder Puffer erforderten, wurden im Radioaktivlabor des MPI für Molekulare Genetik, Berlin, durchgeführt.

Die **Anfertigung von Gewebeschnitte** für die ISH erfolgte wie unter 2.2.9 beschrieben und – genau wie alle folgenden Schritte bis einschließlich der Hybridisierung – unter Einhaltung der Vorsichtsmaßnahmen zum RNase-freien Arbeiten (s.2.2.3).

Zur Vorbehandlung des Gewebes (**Prähybridisierung**) wurden die Objektträger für die angegebenen Zeiten mit folgenden Lösungen inkubiert:

1	100% EtOH	2min	12	4% PFA/ PBS pH 7	20min
2	100% EtOH	2min	13	PBS	5min
3	95% EtOH	2min	14	0,1M TEA/ 0,2% AAh	10min
4	85% EtOH	2min	15	PBS	5min
5	70% EtOH	2min	16	30% EtOH	2min
6	50% EtOH	2min	17	50% EtOH	2min
7	30% EtOH	2min	18	70% EtOH	2min
8	0,2N HCl	15min	19	85% EtOH	2min
9	DEPC-H <sub>2</sub> O	5min	20	95% EtOH	2min
10	Proteinase K/ TE	4min	21	100% EtOH	2min
11	PBS	5min	22	100% EtOH	2min

Zur **Synthese der RNA Sonden** wurde zunächst ein 237bp großes Fragment von GDF-3 unter Verwendung der Schnittstellen *NdeI* und *NsiI* in den Vektor pBlueSK kloniert. Das Fragment entspricht einem Sequenzabschnitt des zweiten Exons und deckt überwiegend Teile der zwischen den TGF $\beta$  Molekülen weniger konservierten Proregion ab (Position 692-907; s.1.3., Abb.3). Die Sequenzierung des Plasmides ergab für Klon 3.1 eine 100%ige Übereinstimmung mit der Sequenz aus der Datenbank.

Die Herstellung der RNA-Sonden erfordert die Linearisierung des Plasmides, welches in der *in vitro* Transkription eingesetzt wird. Entsprechend der Orientierung des Inserts wurde der Vektor mit *NdeI* linearisiert, um mit Hilfe der T7 RNA Polymerase die *antisense* Sonde herzustellen und mit *NsiI* linearisiert, um mit der T3 Polymerase die *sense* Sonde zu generieren. Während die *antisense* Sonde komplementär zur GDF-3 spezifischen mRNA ist, dient die *sense* Sonde lediglich als Negativkontrolle für die ISH.

Für die *in vitro* Transkription wurden die RNase-freien Komponenten wie folgt eingesetzt:

- 1 $\mu$ l (300ng) linearisiertes Template
- 2 $\mu$ l 10x Transkriptionspuffer
- 1 $\mu$ l (40U) RNAsin (RNase-Inhibitor)
- 2 $\mu$ l 5mM NTP-Mix (je 10nM CTP, GTP und ATP)
- 4 $\mu$ l UTP<sup>33</sup>
- 2 $\mu$ l (20U) Polymerase (T7 bzw. T3)
- 8 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O

Die Inkubation erfolgte 90min bei 40°C im Heizblock. Nach der Inkubation wurde die DNA durch Zugabe von 2 $\mu$ l DNase (10U/ $\mu$ l) und weiteren 20min Inkubation bei 37°C entfernt,

bevor die RNA-Sonden aus der Lösung präzipitiert wurden. Dazu wurden folgende Reagenzien beigefügt:

- 1µl Glycogen
- 4µl 4M LiCl
- 80µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 250µl EtOH

Die Fällung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Anschließend wurde die radioaktiv markierte RNA durch Zentrifugation (30min, 14000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) präzipitiert, das Pellet einmal mit EtOH (80%) gewaschen und dann in 50µl TES resuspendiert. Der Hybridisierungspuffer wurde bei  $65^{\circ}\text{C}$  erwärmt und jeweils 1ml zu den Proben gegeben. Zur Denaturierung möglicher RNA Doppelstrangstrukturen wurde der Hybridisierungsmix für 5min auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend direkt auf Eis gestellt.

Zur **Hybridisierung** wurden 50-70µl des Hybridisierungsmixes auf dem vorbehandelten Gewebe verteilt und mit Plastikfolie bedeckt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unter der Folie befinden. Anschließend wurden die Objektträger horizontal in Hybridisierungskammern platziert, etwas Formamid-getränkter Zellstoff (50% Formamid/ 5x SSC) dazugegeben und die Kammern luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei  $60^{\circ}\text{C}$  über Nacht.

Es wurden mindestens 2x2 Objektträger mit der gleichen UTP<sup>33</sup>-*antisense* Sonde und 1x2 Objektträger mit der dazugehörigen UTP<sup>33</sup>-*sense* Sonde angesetzt, so dass mindestens zwei unterschiedliche Expositionszeiten möglich waren. Die *sense* Hybridisierung wird parallel zur als optimal erachteten *antisense* Hybridisierung entwickelt.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in Einsätze sortiert und diese in mit 5x SSC ( $55^{\circ}\text{C}$ ) gefüllte Küvetten gestellt. Die Plastikfolien können durch leichtes Rütteln gelöst werden und lassen sich dann leichter entfernen. Folgende **Waschschritte** wurden für jeweils 30min bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt:

5x SSC	$55^{\circ}\text{C}$
2x SSC	$55^{\circ}\text{C}$
20µl/ml RNase A/ Puffer	$37^{\circ}\text{C}$
2x SSC, 50% Formamid	$55^{\circ}\text{C}$
2x SSC	$55^{\circ}\text{C}$

Der letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigender Alkoholreihe (30,50,70,85,95,100% EtOH) wie zuvor dehydriert.

Die **Beschichtung der Objektträger** erfolgte im Dunkelraum. Es wurde Kodak NTB-2 Photoemulsion verwendet, welche zuvor in einem 37°C Wasserbad etwa 30min erwärmt wurde. Zum Trocknen wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend in einer Photobox lichtdicht bei 4°C gelagert.

Die **Entwicklung** wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen, um die optimale Expositionszeit zu ermitteln. Die Objektträger wurden dazu nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

Entwickler	15°C	5min
H <sub>2</sub> O	RT	20sec
Fixierer	20°C	20min

Bevor die Photoemulsion mit Hilfe einer Rasierklinge von der Rückseite des Objektträgers entfernt werden konnte, wurden die Schnitte in einer Küvette unter laufendem Leitungswasser mindestens 30min gespült.

Die Gewebeschnitte wurden schließlich mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt. Das Eindeckelmedium wurde dazu im Wasserbad erwärmt, auf den Schnitt aufgebracht und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt.

### 2.2.11 Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Bei der Zucht von Zellen in Kultur müssen verschieden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden. Zum einen, um eine Kontamination der Kulturen mit Pilzen, Bakterien, Viren, Mykoplasmen, usw. zu vermeiden, aber auch zum Schutz des Experimentators beim Umgang mit Zelllinien, die diesen gesundheitlich gefährden könnten. Alle Arbeiten müssen unter sterilen Bedingungen ausgeführt werden; sämtliche Geräte, Medien und Puffer, die mit den Zellen in direkte Berührung kommen, wurden daher bei 180°C hitzesterilisiert, autoklaviert oder sterilfiltriert. Spezielle Kulturgefäße mit Kunststoffbeschichtung sind in sterilem Zustand im Handel erhältlich. Die Handhabung der Zellen (Ausplattieren, Ernährung, Passagieren) erfolgte ausschließlich in sterilen Werkbänken (auch *hood* oder *clean bench*), deren

Keimfreiheit durch regelmäßige UV-Bestrahlung und Reinigung mit 70% EtOH gewährleistet war.

Zur Bestimmung der **Zellzahl** wurden die Zellen mit Trypanblau eins zu eins gemischt. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv ausschließen, abgestorbene Zellen dagegen erscheinen blau. Auf diese Weise können tote Zellen bei der Zählung ausgeschlossen werden. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besteht aus 4 großen Quadraten, die in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilt sind, um dem Experimentator das Zählen zu erleichtern. Unter dem Mikroskop wurden 2 große Quadrate ausgezählt, der Gesamtwert gemittelt und die Zahl der lebenden Zellen nach folgender Formel bestimmt:  $\text{Zellzahl/ml} = n \times 2 \times 10^4$ , wobei  $n$  die Anzahl der Zellen in einem großen Quadrat bildet und 2 den Verdünnungsfaktor darstellt.

#### 2.2.12 *In vitro* Stimulation

In *in vitro* Experimenten wurde überprüft, ob sich die Expression von GDF-3 durch Zellstimulation regulieren lässt. Dazu wurden Milzzellen mit LPS (*Lipopolysaccharid*), SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) und PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*) / Ionomycin stimuliert.

Wie unter 2.2.5 beschrieben, wurde zunächst eine Einzelzellsuspension des Gewebes hergestellt, die Zellzahl bestimmt (s.2.2.11), und die Zellen mit einer Dichte von  $2-5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI plus Medium resuspendiert. Die Stimulation mit LPS erfolgte für 24, 48 und 72 Std. mit  $40 \mu\text{g/ml}$ , mit SEB für 12, 24, 48 und 72 Std. ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) und für PMA/Ionomycin für 6 und 24 Std. ( $10 \text{ng/ml}$  bzw.  $1 \mu\text{g/ml}$ ). Als Kontrolle dienten Zellen, die parallel ohne den Zusatz von Stimulantien kultiviert wurden.

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten aus dem Kulturgefäß entnommen, ihre mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und schließlich im LightCycler analysiert.

#### 2.2.13 *In vitro* Depletionen

Zur Identifizierung von Zellpopulationen, welche an der Regulation der GDF-3 Expression beteiligt sind, wurden bestimmte Zellfraktionen aus Zellsuspensionen der Milz depletiert. Die übrigen Zellen wurden für 24 Std. in Kultur genommen, und die Auswirkung auf die GDF-3 Expression im Anschluss im LightCycler analysiert.

Die betroffenen Zellen wurden mit Hilfe der MACS Technologie anhand definierter Oberflächenmarker aus dem Gesamtgewebe depletiert (s.2.2.5). Für die Sortierung wurden an den MACS Säulen 26G Kanülen befestigt, was eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit der aufgetragenen Zellsuspension zur Folge hat. Dies erhöht die Reinheit der depletierten (negativen) Fraktion.

#### 2.2.14 Immunohistochemie

Zur spezifischen Lokalisation einzelner Zelltypen in Gewebeschnitten der Milz wurden immunohistochemische Färbungen mittels der Avidin-Biotin Methode durchgeführt. Sie beruht auf der starken Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin. Freie Bindungsstellen am enzymgekoppelten Streptavidin binden dabei an das Biotin des Primärantikörpers. Als Enzym diente Alkalische Phosphatase (AP), welche das farblose Chromogen Neufuchsin in ein unlösliches Farbprodukt umwandelt.

Wie unter 2.2.9 beschrieben, wurden zunächst 6µm dicke Gefrierschnitte der Milz von BALB/c Mäusen hergestellt. In trockenem Zustand wurden die Gewebe mit einem Fettstift (DAKO) umrahmt, welcher einem Verlaufen der später aufgebracht Flüssigkeit vorbeugt. Für das weitere Prozedere wurden die Objektträger horizontal in einer mit befeuchtetem Zellstoff ausgelegten flachen Plastikkammer platziert, um ein Austrocknen des Gewebes während der Inkubationszeiten zu verhindern.

Für die spezifische Färbung CD11b positiver Zellen wurde ein biotinylierter anti-Maus CD11b Antikörper als Primärantikörper verwendet, als Sekundärreagenz diente AP-gekoppeltes Streptavidin (SA-AP) und als Substrat Neufuchsin. Der Primärantikörper wurde 1:100 in TBS Puffer verdünnt (Endkonzentration 1,1mg/ml) und etwa 80µl pro Schnitt aufgetragen. Die Inkubation erfolgte 60min bei RT. Die Objektträger wurden anschließend gründlich in TBS gespült, bevor das Sekundärreagenz aufgetragen wurde. SA-AP wurde ebenfalls 1:100 eingesetzt (Endkonz. 10U/ml TBS) und 60min bei RT inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut in TBS gespült und 10min in TBS stehen gelassen. Die Fuchsin-Färbelösung wurde wie folgt hergestellt:

- 3,5ml Entwicklungspuffer, 1,25ml Propandiol (21g/l bidest.) und 50µl Levamisol (20mg/500µl bidest) vermischen,
- 10µl Neufuchsin (50mg/ml 2N HCl) in 25µl NaNO<sub>2</sub> (12mg/250µl bidest) dazugeben
- und 30µl Naphtol (6mg/74µl Dimethyl-formamid) in 100µl 2N HCl hinzufügen.

Nach Zugabe der Färbelösung färben sich CD11b positive Zellen rot. Die Reaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Farbintensität, welche im Lichtmikroskop überprüft wurde, (nach ca. 10min) mit TBS gestoppt. Zur Herstellung des Kontrastes wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeschnitte 3min mit Hämatoxylin gefärbt und etwa 5min in Leitungswasser gespült.

Anschließend wurden die Objektträger kurz in bidest getaucht und mit Kaiser's Glycerin-gelatine eingedeckelt. Das Eindeckelmedium wurde dazu im Wasserbad erwärmt, auf den Schnitt aufgebracht und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt.

### 2.2.15 Mechanismus der Regulation der GDF-3 Expression

Im Zellkulturexperiment sollte untersucht werden, wie CD11b positive Zellen die GDF-3 Expression regulieren.

Für die Untersuchung wurden zunächst die CD11b positiven Zellen aus der Gesamtmilz depletiert. Bei der anschließenden Kultivierung wurde das normale Medium durch den gefilterten Überstand einer Gesamtmilz-Kultur (*cultured medium*, Kulturmedium), ersetzt. Als Negativkontrolle dienten CD11b depletierte Zellen, die in RPMI plus Medium inkubiert wurden; als Positivkontrolle eine CD11b depletierte Fraktion, denen die CD11b positiven Zellen wieder zugesetzt wurden.

### 2.2.16 Das GDF-3 'Standard'-Plasmid

Als Standard für die LightCycler PCR wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NsiI* ein 807bp Fragment des 3'Bereiches der GDF-3 Sequenz in pBlueSK kloniert und durch eine Sequenzierung verifiziert. Es diente als Template zur Bestimmung der Sensitivität sowie der Amplifikationseffizienz der LightCycler PCR.

Um die Kopienzahl des GDF-3 Inserts im Vektor pBlueSK/GDF3 (GDF-3 'Standard') zu berechnen, wurde die Konzentration der DNA zunächst photometrisch bestimmt und die Plasmidpräparation auf 1µg/µl verdünnt. Geht man von einer 1000bp DNA aus, entsprechen 1µg etwa  $9,1 \times 10^{11}$  Molekülen; d.h. bei einer Größe von 3726bp (2920bp pBlueSK Nde/Nsi Vektor + 806bp GDF-3 Insert) enthalten 1µg bzw. 1µl etwa  $2,4 \times 10^{11}$  Kopien. Entsprechend verdünnt, konnten in einer Titrationsreihe so exakt kalkulierte Kopienzahlen eingesetzt werden.

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Mini bzw. Midi Kits nach Angaben des Herstellers präpariert.