

### 3. Ergebnisse

GDF-3 ist einzigartig unter den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF $\beta$  Superfamilie, da seine Expression fast ausnahmslos auf lymphatische Gewebe beschränkt ist. Dieses immunspezifische Expressionsmuster ist ein klarer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von GDF-3 an der Homöostase und / oder Regulation des Immunsystems.

Um die Funktion von GDF-3 in lymphatischen Geweben zu untersuchen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst versucht, die GDF-3 exprimierenden Zellen zu identifizieren. Da ein Antikörper gegen GDF-3 nicht erhältlich ist und alternative Methoden wie beispielsweise Immunhistochemie daher nicht in Frage kamen, wurde eine Kombination aus quantitativer RT-PCR, Zellsortierung und *in situ* Hybridisierung gewählt, um den GDF-3 produzierenden Zelltyp zu charakterisieren (s.2.2.1, Abb.5). Zunächst wurde für GDF-3 eine RT-PCR unter Verwendung sequenzspezifischer Hybridisierungssonden im LightCycler etabliert (s.2.2.8) und bereits bekannte Daten bezüglich der Expression von GDF-3 in lymphatischen Geweben mit dieser Methode reproduziert. Die LightCycler PCR wurde dann zur Analyse definierter Subpopulationen lymphatischer Zellen eingesetzt, um die GDF-3 exprimierende Zellfraktion zu ermitteln. Die Zellpopulationen wurden dazu mittels MACS Technologie (*magnetic cell sorting*) sortiert (s.2.2.5). Schließlich wurde mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung auch die Lokalisation des Transkriptes im zellulären Zusammenhang anhand von Gewebeschnitten geklärt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Mechanismen, welche die GDF-3 Expression regulieren, näher untersucht.

#### 3.1 Etablierung der LightCycler PCR

Die quantitative RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers erlaubt es, die exakte Menge eines Transkriptes in einer bestimmten Probe zu ermitteln. Betrachtet man also definierte Zellpopulationen eines Organs, so können diese auf Ebene der Genexpression im LightCycler direkt miteinander verglichen und die Herkunft des Transkriptes eindeutig ermittelt werden.

Zur Etablierung der LightCycler PCR wurde in Vorexperimenten mRNA als Template verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass diese *one step* RT-PCR, in welcher die reverse

Transkription der eigentlichen Amplifikation in demselben Reaktionsgefäß vorangeht, wesentlich weniger sensitiv ist als die zweistufige Variante (*two step* RT-PCR; Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde daher ausschließlich cDNA als Template eingesetzt.

Im SYBR Green Format wurden zunächst Primer-Kombination und Annealing-Temperatur ermittelt. Gewählt wurde das Primerpaar, welches die geringste Tendenz zur Bildung von Primer-Dimeren aufwies. Während sich die im SYBR Green Format als optimal ermittelte Annealing-Temperatur auf das Hybridisierungssonden Format übertragen lässt, muss die  $MgCl_2$  Konzentration erfahrungsgemäß bei Verwendung der Sonden neu bestimmt werden. In den weiteren Optimierungsprozess wurden auch alle anderen Komponenten des Reaktionsgemisches einbezogen, so dass der vom LightCycler Hersteller empfohlene Kit durch eigene Reagenzien erfolgreich ersetzt werden konnte. Die mit eigenen Reagenzien erreichte Sensitivität (Abb.9) lag schließlich sogar höher als die des kommerziellen Produktes.

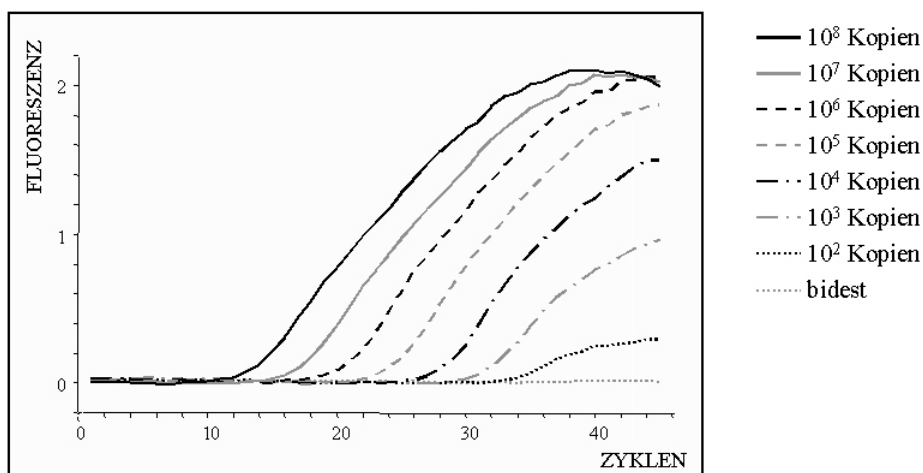


Abb.9: Sensitivität und Amplifikationseffizienz der GDF-3 LightCycler PCR. Als Template diente GDF-3 cDNA, welche zuvor in ein Plasmid kloniert wurde. Die photometrische Bestimmung der Konzentration des Plasmides und die Kenntnis seiner Größe ermöglichte die genaue Berechnung der Kopienzahl (s.2.2.16). Die Amplifikationseffizienz ergibt sich aus der Differenz der sog. *crossing points* ( $\Delta cp$ , s.2.2.8).

Unterschiede in der Konzentration des GDF-3 Transkripts in den einzelnen Proben stellen sich graphisch als Abstand zwischen den sogenannten *crossing points* dar ( $\Delta cp$ ). Der  $\Delta cp$  bildet die Grundlage zur relativen Quantifizierung, welche im weiteren Verlauf verwendet wurde, um die Herkunft des GDF-3 Templates zu klären. Dazu wurden die cDNA Proben auf

die Expression des Haushaltgens  $\beta$ Actin normalisiert, die GDF-3 Templatekonzentration in den unterschiedlichen Proben anhand des  $\Delta$ cp berechnet und direkt miteinander verglichen (s.2.2.8).

Zur Auswertung der Rohdaten muss in jedem Falle die Amplifikationseffizienz der Reaktion bekannt sein, d.h. wie viele Zyklen durchschnittlich notwendig sind, um das Template während der Reaktion zu verdoppeln. Für die GDF-3 spezifische LightCycler PCR beträgt die Amplifikationseffizienz 1,9, liegt also nur minimal unter dem theoretischen Maximum von 2 (s.2.2.8). Wie aus Abb.9 hervorgeht, ist die für den LightCycler optimierte GDF-3 PCR nicht nur effizient, sondern auch sehr sensitiv: Setzt man von einem Plasmid, welches die cDNA für GDF-3 enthält, in einer Titrationsreihe gerade 100 Kopien ein, ergibt sich noch ein deutliches Fluoreszenzsignal. Man spricht in diesem Fall, in dem die Templatekonzentration als exakte Kopienzahl ausgedrückt wird, von absoluter Quantifizierung.

Da eine Kontamination der mRNA (und damit auch der cDNA Proben) durch genomische DNA nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die Primer für die LightCycler PCR so gewählt, dass eine Diskriminierung zwischen cDNA und genomischer DNA während der PCR möglich ist. Die Primer liegen auf Sequenzabschnitten der beiden kodierenden Exons, die Amplifikation erfolgt also über zwei Intron-Exon-Grenzen hinweg. Eine Amplifikation ist damit nur von cDNA möglich, die sich von prozessierter mRNA ableitet und im Gegensatz zur genomischen DNA über keinerlei Introns mehr verfügt. In einem Kontrollexperiment, in dem sowohl cDNA als auch genomische DNA als Template eingesetzt wurde, konnte die cDNA Spezifität der Primer nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Mit der LightCycler PCR ist es gelungen, eine Methode zu etablieren, mit deren Hilfe GDF-3 cDNA spezifisch und äußerst sensitiv nachgewiesen werden kann. Sie wurde im Folgenden eingesetzt, um die GDF-3 Transkription in lymphatischen Gesamtgeweben bzw. einzelnen Zellpopulationen dieser Organe zu quantifizieren.

## **3.2 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben**

### **3.2.1 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben der Maus**

Zum Expressionsmuster von GDF-3 in Mäusen sind in der Literatur lediglich qualitative Angaben zu finden<sup>35</sup>. Anders als z.B ein Northern Blot erlaubt die LightCycler PCR, die

GDF-3 Expression auch zu quantifizieren. Die veröffentlichten Daten sollten zunächst verifiziert und gleichzeitig die GDF-3 Templatekonzentrationen in den einzelnen Organen relativ zueinander bestimmt werden. Zusätzlich zu den bereits untersuchten lymphatischen Geweben Milz, Knochenmark und Thymus wurden Lymphknoten analysiert. Dazu wurde aus den Geweben mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die GDF-3 Templatekonzentration anschließend im LightCycler bestimmt. Das Ergebnis ist in Form von LightCycler Kurven in Abb.10a dargestellt; die sich aus den Rohdaten ergebenden Unterschiede in der GDF-3 Templatekonzentration der einzelnen Organe sind in Abb.10b gezeigt. Um die Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die cDNA auf die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ Actin normalisiert (s. auch Abb.12).

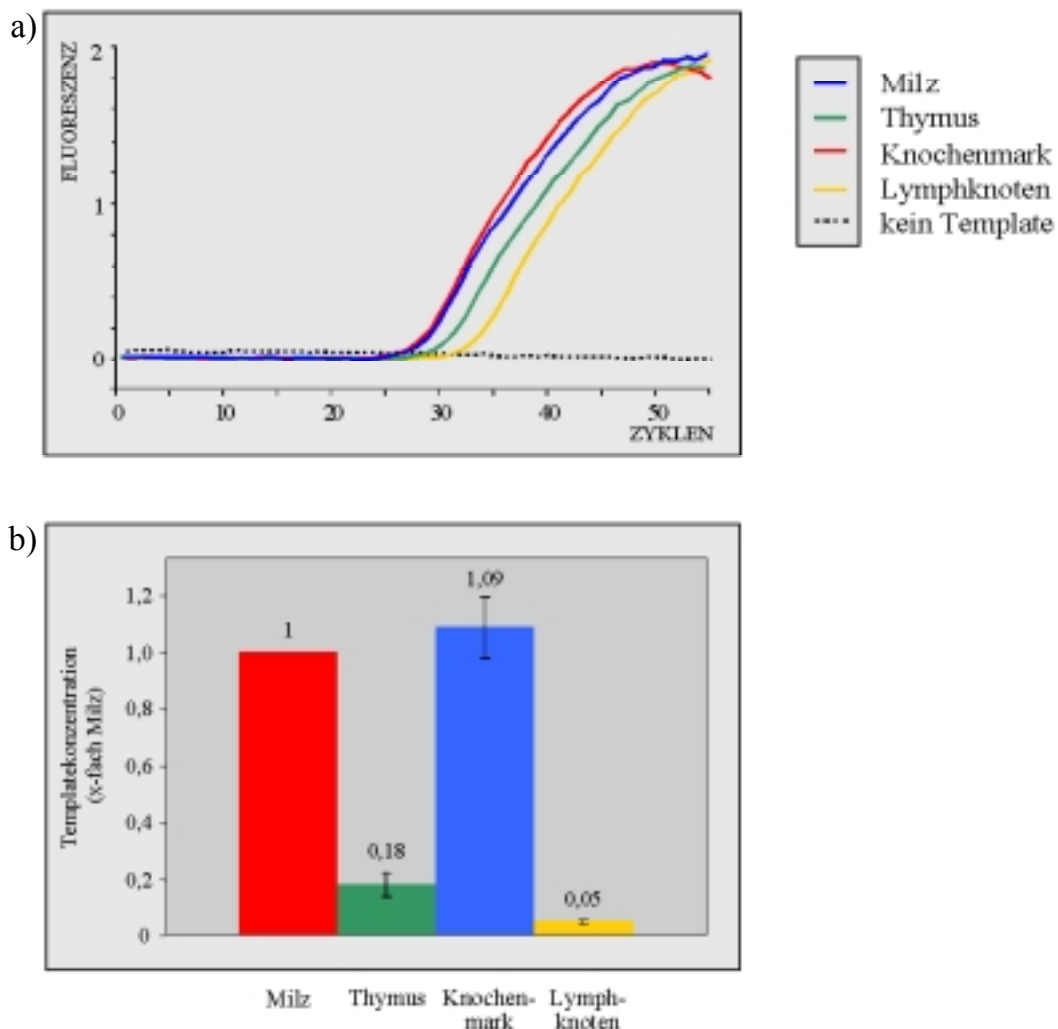


Abb.10: GDF-3 Expression in lymphatischen Gesamtgeweben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

(a) Darstellung der Rohdaten als LightCycler Graphik, (b) GDF-3 Templatekonzentration bezogen auf Milz (relative Quantifizierung).

Die Expression von GDF-3 in Milz und Knochenmark ist demnach am stärksten, wobei die Templatekonzentration im Knochenmark geringfügig über der in Milz liegt. Der Thymus weist eine 5fach geringere Expression als Milz auf, liegt aber noch deutlich über dem in Lymphknoten gemessenen Wert.

Vergleicht man die GDF-3 Expression in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben, werden die Relationen deutlicher. Keines der übrigen untersuchten Organe liegt auch nur annähernd im Bereich der Messwerte für lymphatische Organe. Zwar lässt sich auch in Niere, Leber, Lunge und Hirn GDF-3 Transkript nachweisen; die Konzentration ist aber etwa 100fach geringer als in der Milz und liegt auch noch deutlich unter der in Lymphknoten gemessenen Templatekonzentration (Abb.11).

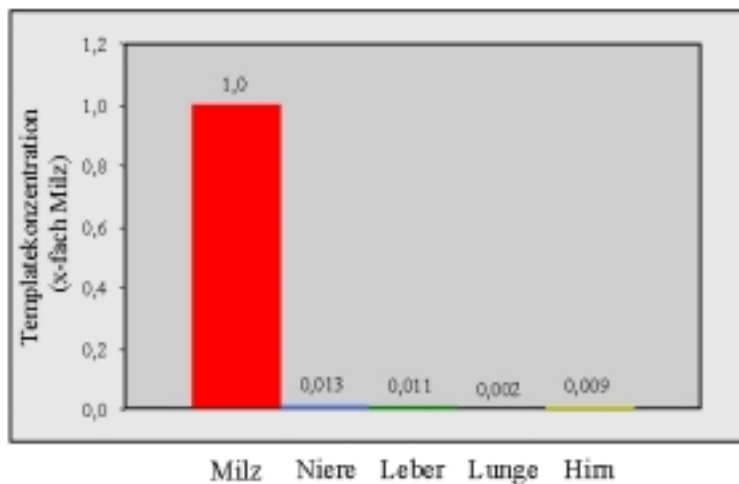


Abb.11: GDF-3 Expression in nicht-lymphatischen Geweben bezogen auf die Templatekonzentration in Milz. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Zusätzlich zu dem 'Haushaltsgen'  $\beta$ Actin, welches Bestandteil des Zytoskelettes ist, wurde HPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase*), ein Enzym welches in die Nukleotidsynthese involviert ist, zur Normalisierung der cDNA herangezogen. Da grundsätzlich nicht auszuschließen ist, dass auch Haushaltsgene – entgegen ihrer Definition, nach der sie in allen Zellen aktiv sind und gleichmäßig exprimiert sind – reguliert werden, wurde die  $\beta$ Actin Normalisierung anhand von HPRT überprüft. Es zeigte sich, dass für die GDF-3 Expression nahezu identische Werte ermittelt werden, unabhängig davon, auf welches Haushaltsgen zuvor normalisiert wurde (Abb.12).

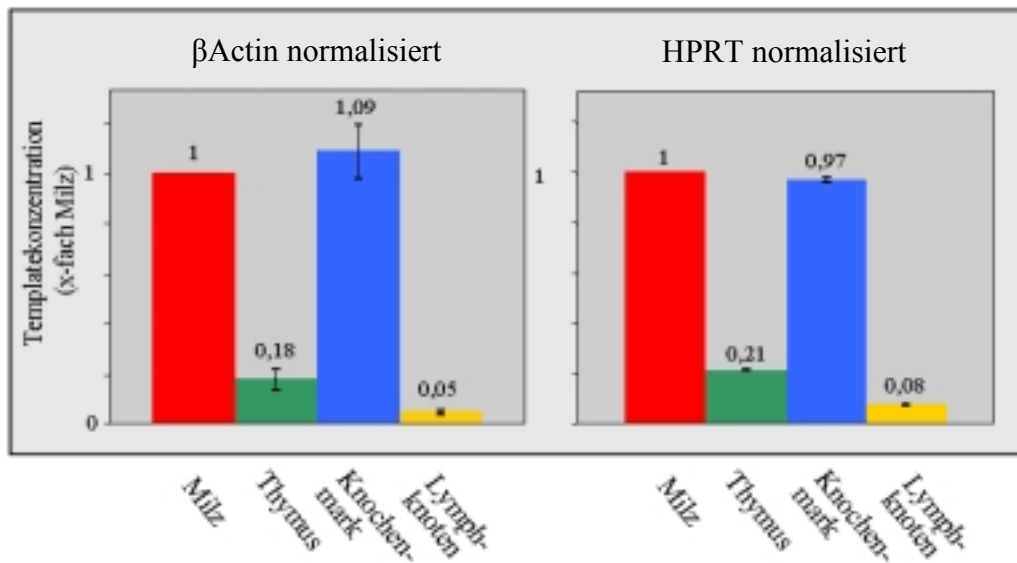


Abb.12: Vergleich der Expressionsanalyse für GDF-3 in lymphatischen Gesamtgeweben nach Normalisierung auf die Haushaltsgene  $\beta$ Actin (links) bzw. HPRT (rechts). Angegeben ist die GDF-3 Templatekonzentration bezogen auf Milz.

Im weiteren wurde  $\beta$ Actin zur Normalisierung gewählt.

### 3.2.2 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben des Menschen

Sofern menschliche Gewebe überhaupt auf die Expression von GDF-3 untersucht wurden, decken sich bisher veröffentlichte Ergebnisse mit den Daten für die Maus. Caricasole *et al.* klonierten humanes GDF-3 aus embryonalen Karzinomzelllinien, konnten jedoch kein GDF-3 Transkript in den von ihnen analysierten nicht-lymphatischen cDNA Banken detektieren<sup>55</sup>. Diese Ergebnisse sollten mittels einer einfachen Thermocycler PCR überprüft werden, wobei die Analyse auf lymphatische Gewebe ausgedehnt wurde. Dazu wurde mRNA aus frischem, gesunden Milzgewebe bzw. aus Knochenmarkbiopsien gesunder Spender präpariert, in cDNA umgeschrieben und analysiert. Als Vergleichswert dienten cDNA Banken verschiedener nicht-lymphatischer Gewebe (Abb.13).

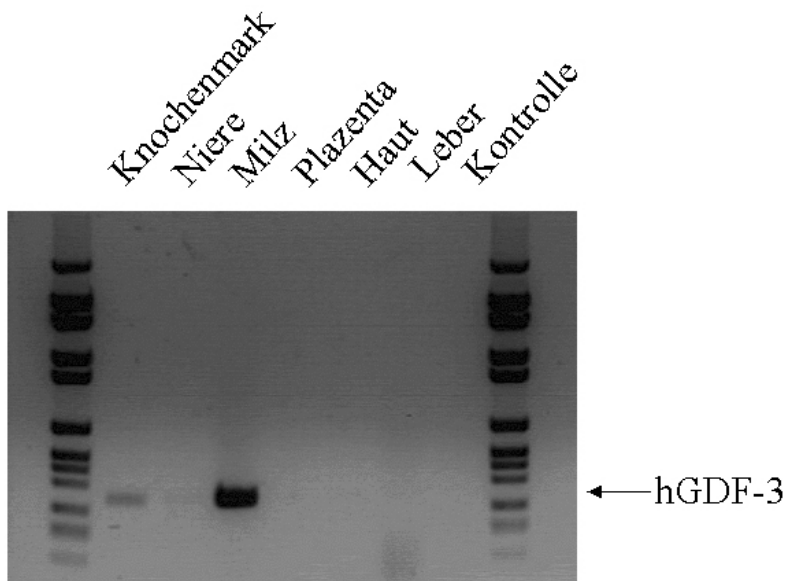


Abb.13: GDF-3 Expression in humanen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben. Das Agarose Gel zeigt das repräsentative Ergebnis einer Thermoblock PCR. In den äußeren Spuren ist als Molekulargewichtsstandard Marker VI (Roche) aufgetragen.

Wie die Abb.13 zeigt, ist die GDF-3 Expression in den untersuchten cDNA Proben – im Menschen wie in der Maus – auf lymphatische Gewebe beschränkt. Die Integrität der verwendeten cDNAs wurde anhand einer  $\beta$ Actin PCR nachgewiesen und die eingesetzten Mengen entsprechend der  $\beta$ Actin Expression aufeinander abgestimmt. Anders als die LightCycler PCR erlaubt die herkömmliche PCR im Thermocycler keine exakte Quantifizierung; der deutliche (und reproduzierbare) Unterschied in der Intensität der Banden lässt jedoch den Schluss zu, dass die GDF-3 Expression in Milz stärker ist als die im Knochenmark. Damit unterscheidet sich das Expressionsmuster im Menschen leicht von dem in der Maus.

### 3.3 Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen

Die Strategie zur Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen beruht auf der Betrachtung definierter Zellpopulationen, die durch sogenanntes *magnetic cell sorting* (MACS) aus den lymphatischen Geweben Milz und Knochenmark gewonnen wurden (s.2.2.5).

Da es sich bei der Milz um das am besten zugängliche lymphatische Gewebe handelt, welches die größte Menge an Zellen liefert, experimentell leicht zu handhaben ist und darüber hinaus neben dem Knochenmark die höchste Konzentration an GDF-3 Transkript aufweist, stützen

sich die nachfolgend beschriebenen Experimente zur Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen im wesentlichen auf Zellen der Milz.

### 3.3.1 GDF-3 Expression in definierten Zellpopulationen der Milz

Die ersten Zellpopulationen, die untersucht wurden, sind Lymphozyten. B und T Lymphozyten repräsentieren die größten Populationen mononukleärer Zellen in der Milz. Für die Analyse wurden B und T Zellen mit Hilfe der MACS Technologie aufgereinigt und die GDF-3 Expression in diesen Zellen mit der in der negativen Fraktion verglichen – der Zellfraktion also, aus der Lymphozyten zuvor depletiert wurden (Abb.14). Als Oberflächenmarker zur Separierung wurden B220 (B Zell-spezifisch) und Thy1.2 (T Zell-spezifisch) verwendet. Die Qualität der Zellseparierung wurde im FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorting*) überprüft (s.2.2.7). Vor der Separierung wurde – wie auch in allen folgenden Experimenten – ein Aliquot des Gesamtgewebes abgenommen, welches später als Bezugswert bei der relativen Quantifizierung diene.

Wie in Abb.14a deutlich zu erkennen ist, ist das GDF-3 Transkript in den Nicht-Lymphozyten (negative Fraktion) im Vergleich zur Gesamtmilz angereichert. In B bzw. T Zellen dagegen ist quasi kein GDF-3 Transkript vorhanden. GDF-3 wird demzufolge nicht von Lymphozyten exprimiert. Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der einzelnen Fraktionen von 96% für B Lymphozyten, 94% für T Lymphozyten und 99% für die negative Fraktion (Nicht-Lymphozyten; Abb.14b).



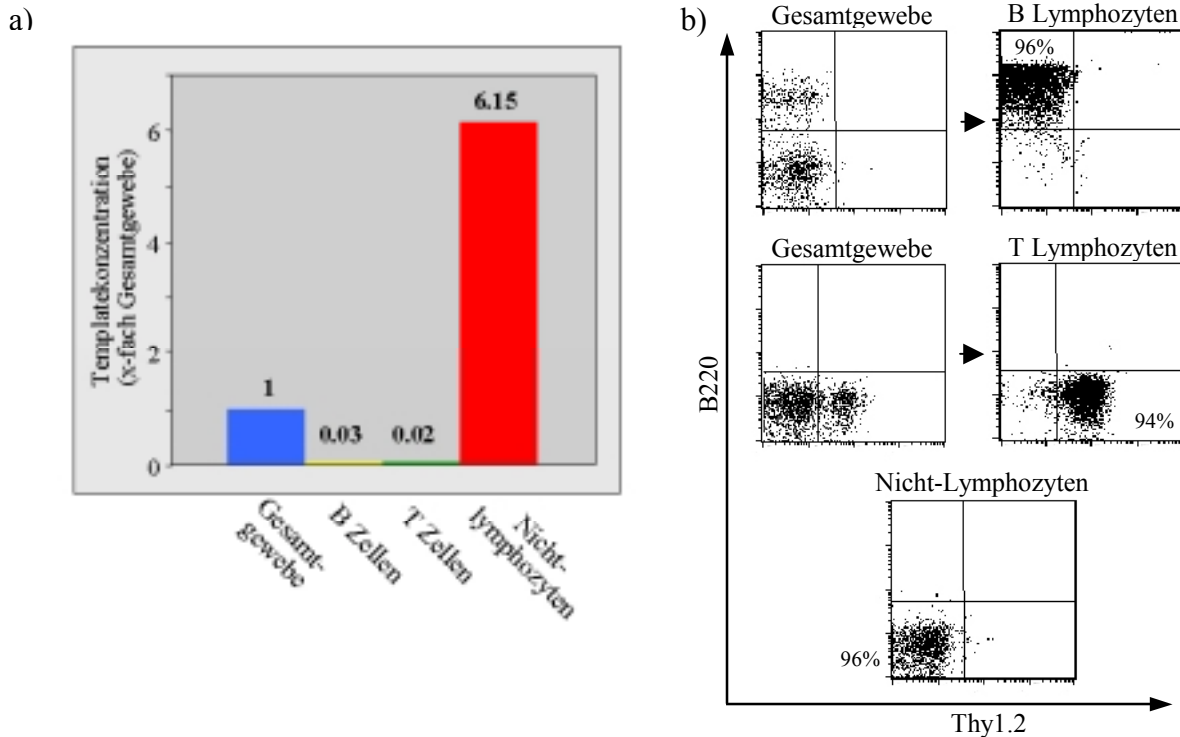


Abb.14: Analyse der GDF-3 Expression in Lymphozyten aus Milzgewebe. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (a) Die angegebenen Werte beziehen sich auf die GDF-3 Templatekonzentration in Milz vor der Sortierung (Gesamtgewebe). (b) Dazugehörige FACS Analyse. Dargestellt sind B220 bzw. Thy1.2 markierte Zellen einer Zellsuspension von Milz vor der MACS Sortierung sowie nach Separierung der positiven bzw. negativen Fraktion.

Als nächstes wurden solche Zellen untersucht, die an ihrer Zelloberfläche CD11b und CD11c präsentieren. Es handelt sich dabei in erster Linie um Makrophagen und dendritische Zellen. Auch hier sind die Daten eindeutig (Abb.15): Während die angereicherten CD11b und CD11c positiven Zellen nur verschwindend geringe Templatekonzentrationen aufweisen, ist das Transkript in der negativen Fraktion akkumuliert. Auch diese Zellen müssen demnach als GDF-3 Produzenten ausgeschlossen werden. Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der einzelnen Fraktionen von 82% für CD11b und CD11c positive Zellen und 97% für die negative Fraktion.

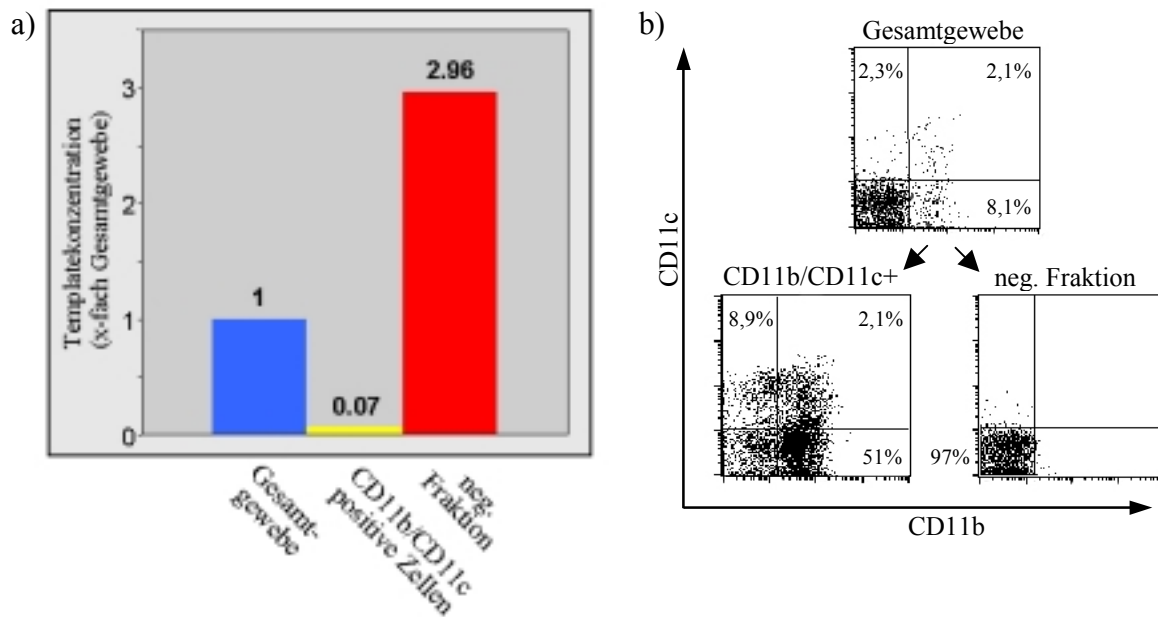


Abb.15: Analyse der GDF-3 Expression in CD11b und CD11c positiven Zellen aus Milzgewebe. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (a) Die angegebenen Werte beziehen sich auf die GDF-3 Templatekonzentration in Milz vor der Sortierung (Gesamtgewebe). (b) Dazugehörige FACS Analyse. Dargestellt sind CD11b bzw. CD11c markierte Zellen einer Zellsuspension von Milz vor der MACS Sortierung sowie nach Separierung der positiven bzw. negativen Fraktion.

Neben Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen gibt es noch eine Reihe weiterer, kleinerer Populationen von nukleären Zellen in lymphatischen Geweben, wie z.B. verschiedene Formen von Granulozyten (Basophile, Eosinophile und Neutrophile). Wie alle weißen Blutkörperchen (Leukozyten) exprimieren Granulozyten auf ihrer Zelloberfläche CD45 (auch LCA, *leucocyte common antigen*). Um zu untersuchen, ob es sich bei dem GDF-3 exprimierenden Zelltyp um eine Population von Leukozyten handelt, wurden diese im folgenden Experiment anhand des Oberflächenmarkers CD45 separiert (Abb.16).

Die PCR Analyse im LightCycler ergab, dass das GDF-3 Transkript in der CD45 positiven Fraktion kaum detektierbar ist, in der negativen Fraktion dagegen ist es stark angereichert. GDF-3 wird also von CD45 negativen Zellen (Nicht-Leukozyten) exprimiert. Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der einzelnen Fraktionen von 90% für Leukozyten und 99% für die negative Fraktion (Nicht-Leukozyten).

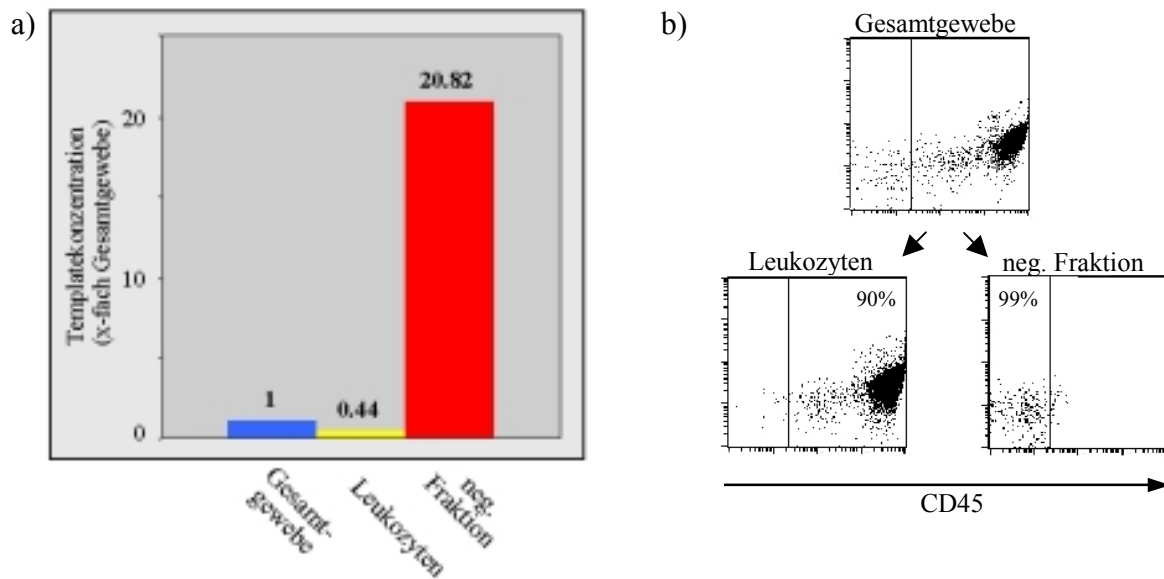


Abb.16: Analyse der GDF-3 Expression in Leukozyten aus Milzgewebe. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (a) Die angegebenen Werte beziehen sich auf die GDF-3 Templatekonzentration in Milz vor der Sortierung (Gesamtgewebe). (b) Dazugehörige FACS Analyse. Dargestellt sind CD45 markierte Zellen einer Zellsuspension von Milz vor der MACS Sortierung sowie nach Separierung der positiven bzw. negativen Fraktion.

Zusammengenommen zeigte die Analyse definierter Zellpopulationen der Milz, dass GDF-3 nicht von Leukozyten exprimiert wird. Vielmehr handelt es sich bei der gesuchten Population um Zellen, die negativ sind für B220, Thy1.2, CD11b, CD11c und CD45, also keinen der verwendeten hämatopoetischen Oberflächenmarker aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung von Zellen bildet die Adhärenz. Das heißt, bestimmte Zellen der Milz lassen sich aufgrund ihrer Fähigkeit, sich an die Plastikoberfläche von Zellkulturgefäßen anzuheften, von den übrigen Zellen des Gewebes trennen<sup>97</sup>. Stromazellen, Endothelzellen und Makrophagen z.B. besitzen die Fähigkeit zu adhärentem Wachstum. Makrophagen können dabei als GDF-3 Produzenten ausgeschlossen werden, wie vorangegangene Experimente zeigten (Vgl. Abb.15). Um die GDF-3 Expression in adhärennten bzw. nicht-adhärennten Zellen der Milz zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst vereinzelt, in Medium resuspendiert und in Kultur genommen. Nach 3 Stunden Inkubation wurden die nicht-adhärennten Zellen von den adhärennt wachsenden Zellen getrennt (s.2.2.6).

Die LightCycler Analyse zeigte, dass die adhärennt wachsende Population im Gegensatz zu nicht-adhärennten Milzzellen große Mengen an GDF-3 Template aufweist (Abb.17). Dieses

Resultat bestätigt die bisherigen Ergebnisse, nach denen es sich bei den GDF-3 exprimierenden Zellen nicht um Lymphozyten handelt. Als mögliche Kandidaten kommen nunmehr lediglich adhären wachsende, CD45 negative Zellen (Nicht-Leukozyten) in Frage.

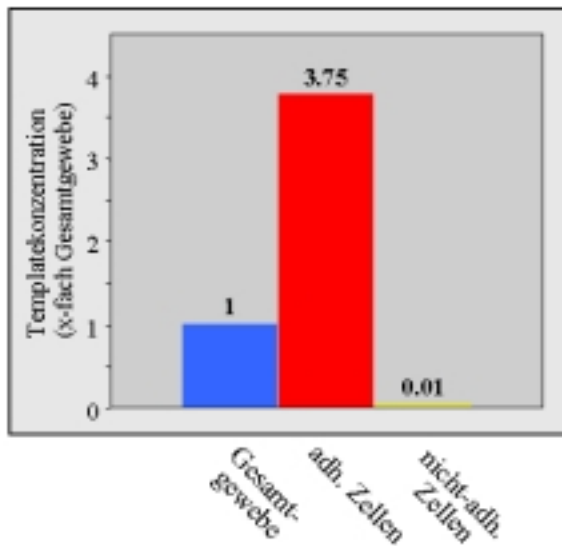


Abb.17: Analyse der GDF-3 Expression in adhären bzw. nicht-adhären Milzzellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Zellen der Milz wurden einzeln, in RPMI plus Medium resuspendiert und in Kultur genommen. Nach 3 Std. Inkubation wurden die nicht-adhären Zellen von den adhären wachsenden Zellen getrennt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die GDF-3 Templatekonzentration in Milz vor der Kultivierung (Gesamtgewebe).

### 3.3.2 GDF-3 Expression in definierten Zellpopulationen des Knochenmarks

Neben der Milz ist das Knochenmark das Gewebe mit der höchsten GDF-3 Expression. Anders als bei der Milz handelt es sich beim Knochenmark um ein primäres Immunorgan, in dem die frühe Differenzierung der Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen erfolgt. Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben unterscheidet sich die Zellzusammensetzung im Knochenmark von der in der Milz. Gemeinsam ist beiden jedoch das typische bindegewebige Grundgerüst lymphatischer Gewebe (s.1.1.2). Die Untersuchung definierter, aus dem Knochenmark isolierter Zellpopulationen sollte Aufschluss darüber geben, in wie weit das Expressionsmuster von GDF-3 in beiden Immunorganen miteinander vergleichbar ist. Zu diesem Zweck wurde die Sortierung und Analyse von Lymphozyten und Leukozyten aus Knochenmark wiederholt (Abb.18 und 19).

Wie aus den Abb.18 und 19 hervorgeht, lassen sich die bisherigen Ergebnisse für Milz auf die Situation im Knochenmark übertragen. GDF-3 wird von Nicht-Leukozyten exprimiert; B und T Lymphozyten können, genau wie alle anderen Subpopulationen von weißen Blutkörperchen, ausgeschlossen werden.

Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der einzelnen Fraktionen von 97% für B Lymphozyten und 98% für die negative Fraktion (Nicht-Lymphozyten). T Lymphozyten aus dem Knochenmark lassen sich aufgrund ihrer geringen Zahl lediglich anreichern (70%ige Reinheit). Für die CD45 Sortierung liegt die Reinheit bei 99% für Leukozyten und 99% für die negative Fraktion (Nicht-Leukozyten).

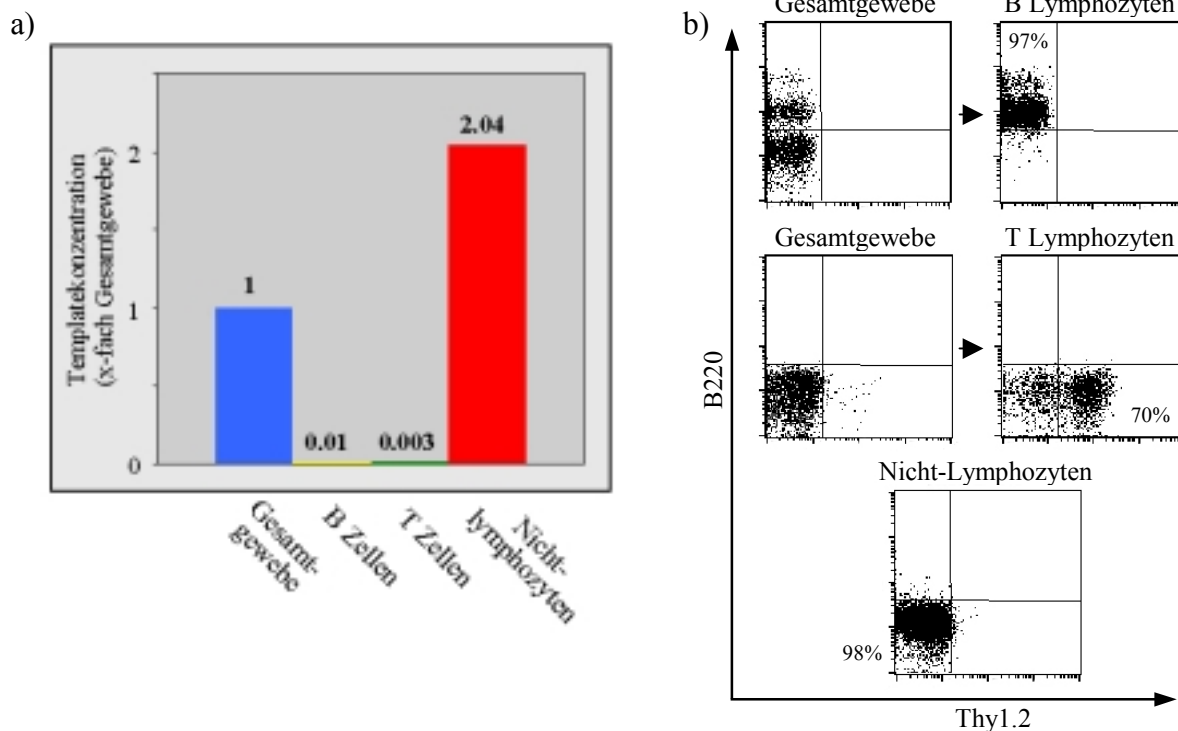


Abb.18: Analyse der GDF-3 Expression in Lymphozyten aus Knochenmark. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (a) Die angegebenen Werte beziehen sich auf die GDF-3 Templatekonzentration in Knochenmark vor der Sortierung (Gesamtgewebe). (b) Dazugehörige FACS Analyse. Dargestellt sind B220 bzw. Thy1.2 markierte Zellen einer Zellsuspension von Knochenmark vor der MACS Sortierung sowie nach Separierung der positiven bzw. negativen Fraktion.

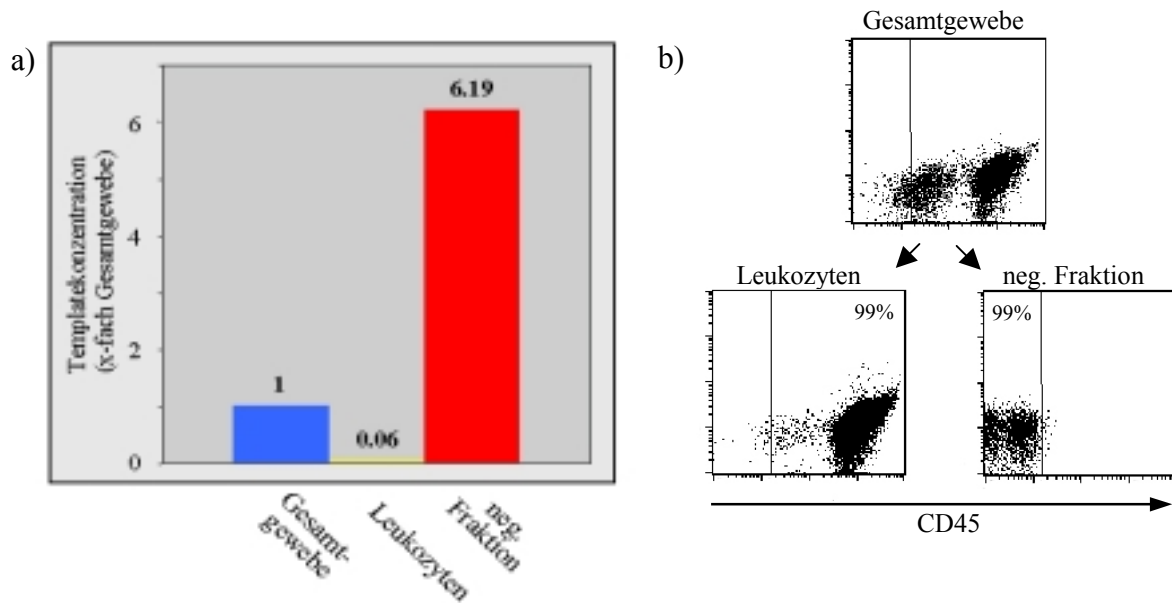


Abb.19: Analyse der GDF-3 Expression in Leukozyten aus Knochenmark. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (a) Die angegebenen Werte beziehen sich auf die GDF-3 Templatekonzentration in Knochenmark vor der Sortierung (Gesamtgewebe). (b) Dazugehörige FACS Analyse. Dargestellt sind CD45 markierte Zellen einer Zellsuspension von Knochenmark vor der MACS Sortierung sowie nach Separierung der positiven bzw. negativen Fraktion.

### 3.3.3 Lokalisation der GDF-3 mRNA in histologischen Schnitten der Milz

Die Analyse sortierter Zellpopulation aus Milz und Knochenmark erlaubte, die GDF-3 exprimierenden Zellen als adhärent wachsende Nicht-Leukozyten (Phänotyp: B220/Thy1.2/CD11b/CD11c/CD45 negativ) zu definieren. Im Unterschied zur PCR Technik birgt die *in situ* Hybridisierung (ISH) den Vorteil, dass eine positive Reaktion in Bezug zur Morphologie gesetzt werden kann. Mit Hilfe der ISH sollten daher die GDF-3 exprimierenden Zellen genauer charakterisiert und die Frage nach ihrer Lokalisation im Gewebe geklärt werden. Dazu wurden Gefrierschnitte der Milz mit radioaktiv markierten RNA Sonden für GDF-3 hybridisiert (s.2.2.10). Das Ergebnis ist in Abb.20 gezeigt.

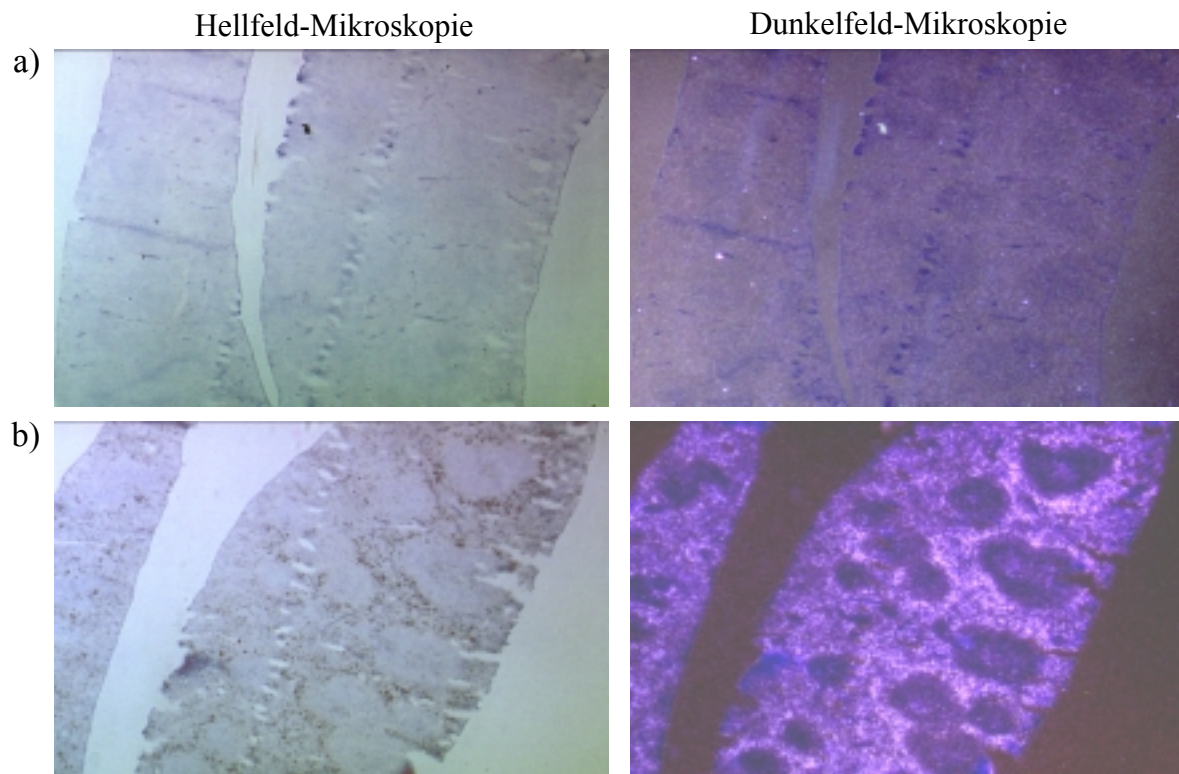


Abb.20: *In situ* Hybridisierung des GDF-3 Transkripts unter Verwendung radioaktiv markierter GDF-3 RNA-Sonden in *sense* (a) und *antisense* Orientierung (b) in Gefrierschnitten der Milz. Die GDF-3 exprimierenden Zellen werden durch die *antisense* Sonde sichtbar. Im Hellfeld (links) sind sie an den schwarzen, aus der Photoemulsion präzipitierten Silberkörnern erkennbar, die im Dunkelfeld (rechts) hell erscheinen.

Das Muster der GDF-3 exprimierenden Zellen ist in Abb.20b (rechtes Bild) deutlich zu erkennen. Im Dunkelfeld sind sie als helle, leuchtende Strukturen sichtbar. Sie befinden sich im gesamten Bereich der roten Pulpa, während die Lymphfollikel ausgespart sind. Dem eindeutigen Expressionsmuster zufolge handelt es sich bei den hellen, GDF-3 exprimierenden Zellen um Stromazellen. Eine leichte perifollikuläre Akzentuierung des Signals ist zu beobachten.

Als GDF-3 'Quelle' konnten somit Stromazellen der roten Pulpa identifiziert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollten mögliche Regulationsmechanismen für GDF-3 aufgeklärt werden.

### 3.4 Regulation der GDF-3 Expression

Erste Experimente ergaben, dass die GDF-3 Expression nicht von Faktoren wie dem Geschlecht oder dem Alter der Mäuse beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). Um mögliche Varianzen auszuschließen, wurden für die im Folgenden beschriebenen Versuche dennoch ausschließlich Tiere vom Stamm BALB/c verwendet, die gleichen Geschlechts (männlich) und gleichen Alters (6-8 Wochen) waren.

#### 3.4.1 *In vitro* Stimulationen

Es gibt verschiedene Substanzen, mit denen Immunzellen *in vitro* stimuliert werden können. Meist aktivieren sie unterschiedliche Zellpopulationen. Nach Stimulation dieser Zellen verändert sich in der Regel das Expressionsmuster bestimmter Gene. Zu den häufig verwendeten Stimulantien zählen LPS (*Lipopolysaccharid*), SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) und PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*). Letzteres wird meist in Verbindung mit Ionomycin verwendet. Bei LPS handelt es sich um einen Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Es wirkt als polyklonales Mitogen und stimuliert B Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und Stromazellen<sup>64-67</sup>. SEB ist ein bakterielles Superantigen. Superantigene sind Proteine, die den Antigen-Rezeptor einer großen Zahl von T Zellen binden und diese z.B. zur Produktion von Zytokinen anregen<sup>68-70</sup>. PMA ist ein direkter Agonist der Proteinkinase C (PKC) und wird häufig als Stimulator für T Lymphozyten und als polyklonaler B Lymphozyten Aktivator eingesetzt<sup>71-72</sup>. Die Stimulation mit Ionomycin führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche ebenfalls die PKC aktiviert<sup>73</sup>.

Ob sich die Expression von GDF-3 durch Zellstimulation regulieren lässt, wurde *in vitro* an Milzzellen überprüft. Dazu wurden Milzzellen vereinzelt, in Medium resuspendiert und mit oder ohne Zugabe von LPS, SEB bzw. PMA/ Ionomycin in Kultur genommen (s.2.2.12). Die Dauer der Stimulation richtete sich nach der verwendeten Substanz. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen aus dem Kulturgefäß entnommen, mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese im LightCycler analysiert.

Wie dieses erste Screening ergab, führt die Inkubation mit LPS zu einer deutlichen Reduktion der Templatekonzentration nach 24, 48 und 72 Stunden (Abb.21), während es nach



Stimulation mit SEB und PMA nur zu marginalen Unterschieden in der GDF-3 Expression kommt (Daten nicht gezeigt). LPS hat also einen negativ regulatorischen Effekt.

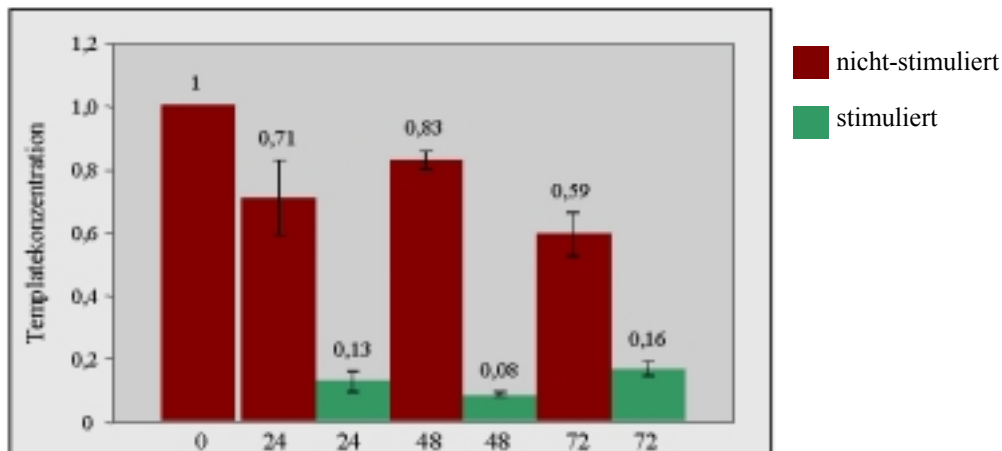


Abb.21: Analyse der GDF-3 Expression in Gesamtmilz-Kulturen nach *in vitro* Stimulation mit LPS. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die GDF-3 Templatekonzentration bezogen auf den Zeitpunkt Null bestimmt.

In einem System, in welchem Zellen durch einen äußeren Stimulus zur Proliferation angeregt werden, stellt sich erneut die Frage nach dem geeigneten Bezugswert zur Normalisierung der cDNA (s. auch Abb.12). Daher wurden die cDNA Proben des LPS-Stimulationsexperimentes zusätzlich auf die Expression von HPRT normalisiert und die GDF-3 Expression anschließend verglichen analysiert. Es zeigte sich wiederum, dass für die GDF-3 Expression übereinstimmende Werte ermittelt werden – unabhängig davon, auf die Expression welches Haushaltsgens zuvor normalisiert wurde (Abb.22).

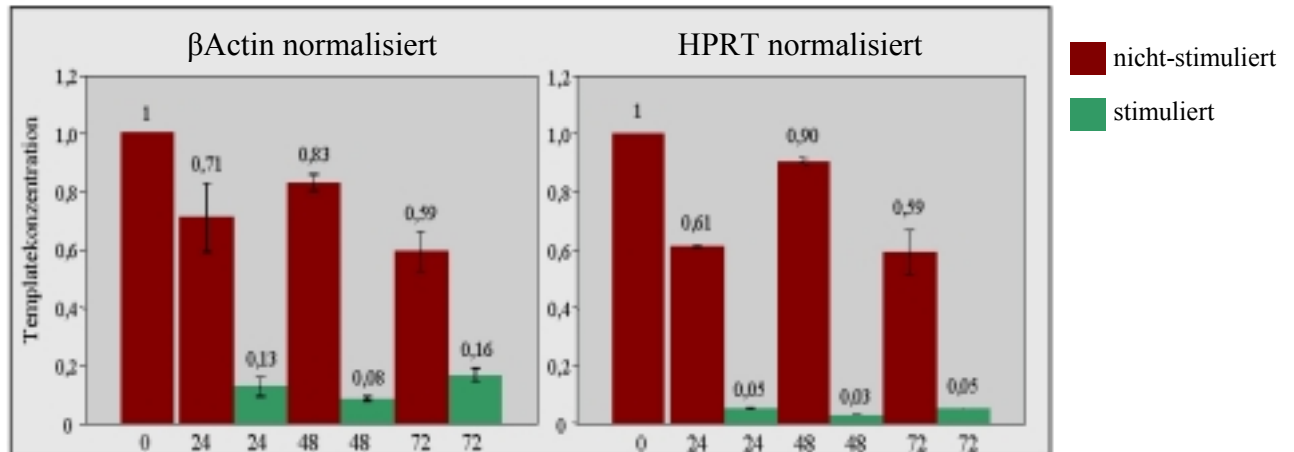


Abb.22: Vergleich der Expressionsanalyse für GDF-3 in LPS stimulierten Milzkulturen nach Normalisierung auf die Haushaltsgene  $\beta$ Actin (links) bzw. HPRT (rechts). Angegeben ist die GDF-3 Templatekonzentration bezogen auf den Zeitpunkt Null.

Die *in vitro* Stimulationen von Milzzellen zeigten, dass LPS einen deutlich negativen Effekt auf die GDF-3 Expression hat. Ob es sich hierbei um eine direkte Wirkung der Substanz auf die Stromazellen oder um einen indirekten Effekt, z.B. über die Stimulation von Monozyten/Makrophagen oder B Zellen handelt, sollte durch ein weiterführendes Experiment geklärt werden. Dabei wurden die als Mediatoren in Frage kommenden Zellpopulationen vor der LPS Stimulation depletiert. Sollten Monozyten/Makrophagen oder B Zellen die Wirkung vermitteln, müsste der Effekt durch Depletion dieser Zellen aus der Gesamtmilz aufgehoben werden können. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb.23 gezeigt.

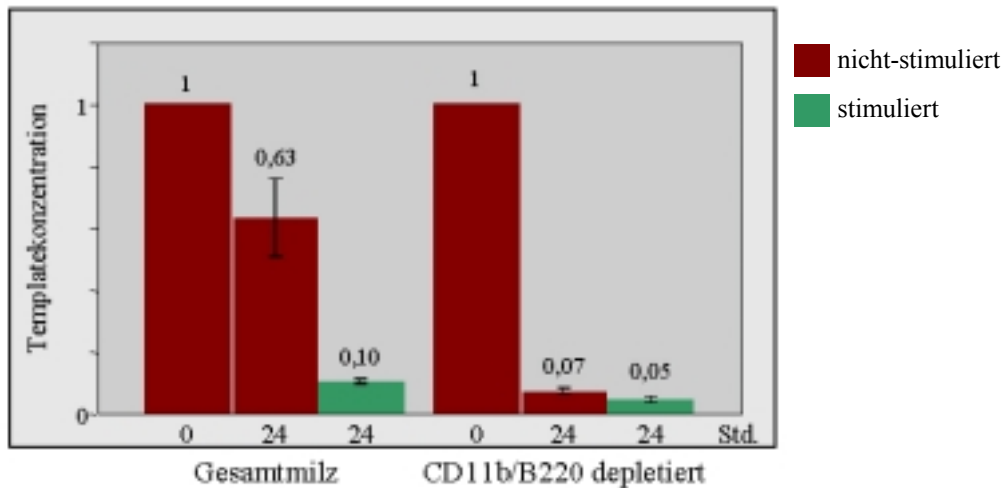


Abb.23: Analyse der GDF-3 Expression in LPS stimulierter Gesamtmilz im Vergleich zu CD11b/B220 depletierten Milzzellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. CD11b und B220 positive Zellen wurden durch MACS aus der Zellsuspension depletiert und die restlichen Milzzellen 24 Std. in RPMI plus Medium mit und ohne LPS kultiviert.

Die Güte der Depletion wurde im FACS Gerät überprüft. Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der CD11b/B220 depletierten Fraktion von 98% (Daten nicht gezeigt).

Wie aus den Abb.22 und 23 hervorgeht, nimmt die GDF-3 Expression in Gesamtmilz nach 24stündiger Inkubation mit LPS rapide ab, während sie in den nicht-stimulierten Zellen relativ konstant bleibt. Erstgenanntes gilt auch für Milzzellen, aus denen zum Zeitpunkt Null die CD11b und B220 positiven Zellen depletiert wurden, wie der rechte Teil der Abb.23 zeigt. Allerdings verringert sich die Templatekonzentration in der depletierten Fraktion unabhängig davon, ob LPS dem Medium zugesetzt wurde oder nicht; auch in den nicht-stimulierten Zellen sinkt die GDF-3 Expression nach 24 Stunden deutlich.

Die Frage nach der Wirkungsweise von LPS konnte damit nicht eindeutig geklärt werden, jedoch wurde ein anderes interessantes Phänomen erkennbar: Die GDF-3 Expression ist von der Anwesenheit CD11b bzw. B220 positiver Zellen abhängig. Den Zelltyp, der die Expression beeinflusst, genauer zu charakterisieren, war Ziel der nächsten Experimente.

### 3.4.2 *In vitro* Depletionen

Um die Bedeutung von CD11b bzw. B220 positiven Zellen für die GDF-3 Expression genauer zu untersuchen, wurden die entsprechenden Zellpopulationen im Folgenden einzeln depletiert. Monozyten und Makrophagen tragen neben CD11b auch den Marker CD11c auf

ihrer Zelloberfläche. Der Vollständigkeit halber wurden beide Marker kombiniert. Zur Depletion von B Zellen wurde wie zuvor ein Antikörper gegen B220 verwendet. Die GDF-3 Expression in den depletierten Milzzellen nach 24stündiger Kultivierung ist in Abb.24 dargestellt. Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der einzelnen Fraktionen von 99% für CD11b/CD11c/B220 depletierte Milzzellen, 99% für die CD11b/c und 100% für die B220 depletierte Fraktion (Daten nicht gezeigt).

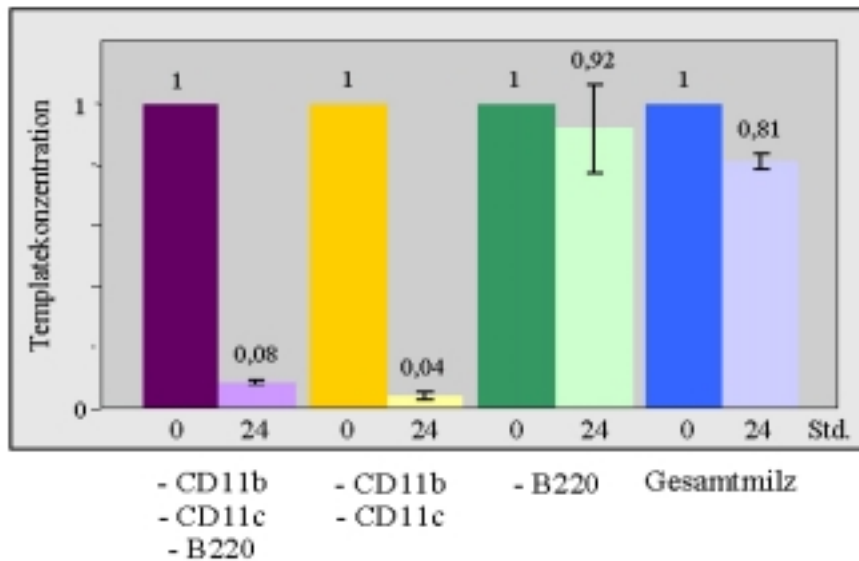


Abb.24: Analyse der Rolle von CD11b bzw. B220 positiven Zellen in der Regulation der GDF-3 Expression. Dargestellt ist die GDF-3 Templatekonzentration in CD11b/CD11c/B220, CD11b/c und B220 depletierten Milzzellen sowie in Gesamtmilz zum Zeitpunkt Null (direkt nach der Separierung) sowie nach 24stündiger Kultivierung. Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden durch MACS aus der Zellsuspension depletiert und sind durch ein Minuszeichen gekennzeichnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Die GDF-3 Expression nimmt danach in der Fraktion, welche sowohl von CD11b, CD11c und B220 depletiert wurde, stark ab. Gleiches gilt, wenn zum Zeitpunkt Null nur CD11b und CD11c positive Zellen entfernt wurden. Depletiert man dagegen allein die B Zellen, bleibt die GDF-3 Expression – genau wie in der kompletten Milz – nach 24 Stunden konstant. Während B Zellen also keine Rolle in der Regulation der GDF-3 Expression spielen, ist die Präsenz der CD11b positiven Zellen zur Aufrechterhaltung der Expression unbedingt erforderlich.

Obwohl in der Literatur ursprünglich als Monozyten/Makrophagen Marker beschrieben, zeigen neuere Untersuchungen, dass CD11b auch von anderen Zellpopulationen auf ihrer Zelloberfläche präsentiert wird. Zu ihnen zählen Subpopulationen von T Zellen, dendritischen

Zellen und natürlichen Killerzellen<sup>100-104</sup> (NK Zellen; Vgl. 4.4). CD11b positive Subpopulationen aller genannten Zelltypen kommen als mögliche Regulatoren für GDF-3 in Frage. Durch gezielte Depletion der einzelnen Zellarten sollte der GDF-3 regulierende Zelltyp näher charakterisiert werden. Als Marker wurde für T Zellen Thy1.2, für dendritische Zellen CD11c und für NK Zellen DX5 verwendet. Das Ergebnis ist in Abb.25 dargestellt.

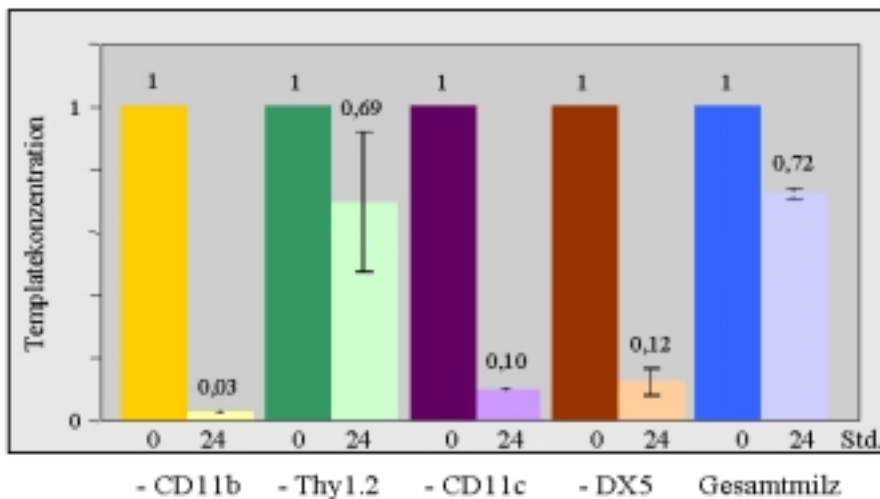


Abb.25: Analyse der Rolle von CD11b positiven Subpopulationen in der Regulation der GDF-3 Expression. GDF-3 Expression in CD11b, Thy1.2, CD11c und DX5 depletierten Milzzellen sowie in Gesamtmilz zum Zeitpunkt Null und nach 24stündiger Kultivierung in RPMI plus Medium. Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden durch MACS aus der Zellsuspension depletiert und sind durch ein Minuszeichen gekennzeichnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der einzelnen Fraktionen von 99% für CD11b depletierte Milzzellen, 98% für die Thy1.2 und nahezu 100% für die CD11c und DX5 depletierte Fraktion (Daten nicht gezeigt).

Wie aus Abb.25 hervorgeht, haben T Zellen keinen Einfluss auf die GDF-3 Expression. Fehlen sie in der Milzkultur, bleibt die GDF-3 Templatekonzentration ebenso wie in der Gesamtmilz-Kontrolle im Verlauf des Experimentes nahezu konstant. Die Depletion von CD11c positiven Zellen (v.a. dendritische Zellen) und DX5 positiven Zellen (v.a. NK Zellen) dagegen führt zu einer deutlichen Reduktion der GDF-3 Templatekonzentration. Die Depletion von CD11b, CD11c oder DX5 positiven Zellpopulationen hat damit einen ähnlichen Effekt: Sie führt in allen drei Fällen zu einer starken Abnahme der GDF-3 Expression.

### 3.4.3 Immunohistochemischer Nachweis CD11b positiver Zellen

Die unter 3.4.2 beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass die Regulation der GDF-3 Expression sehr komplex ist (Vgl. Abb.24 und 25). Die GDF-3 Expression ist von lymphatischen Zellen abhängig, welche positiv sind für die Oberflächenmarker CD11b, CD11c und/oder DX5. Anzahl und Verteilung der GDF-3 exprimierenden Stromazellen im Gewebe geben einen indirekten Hinweis auf die GDF-3 regulierenden Zellen. Es ist anzunehmen, dass sich die gesuchten Regulatoren in ähnlichen Kompartimenten der Milz aufhalten wie die GDF-3 exprimierenden Stromazellen.

Anders als CD11c und DX5 positive Zellen lassen sich CD11b positive Zellen durch Enzymgekoppelte Antikörper immunohistochemisch nachweisen. Um eine mögliche Ko-Lokalisation der CD11b positiven und GDF-3 exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurde eine immunohistochemische Analyse von Milzgewebe durchgeführt (s.2.2.14). Dabei wurden konsekutive Schnitte der gleichen Milz wie zuvor für die *in situ* Hybridisierung verwendet. CD11b positive Zellen erkennt man in Milzschnitten an ihrer roten Färbung (Abb.26).

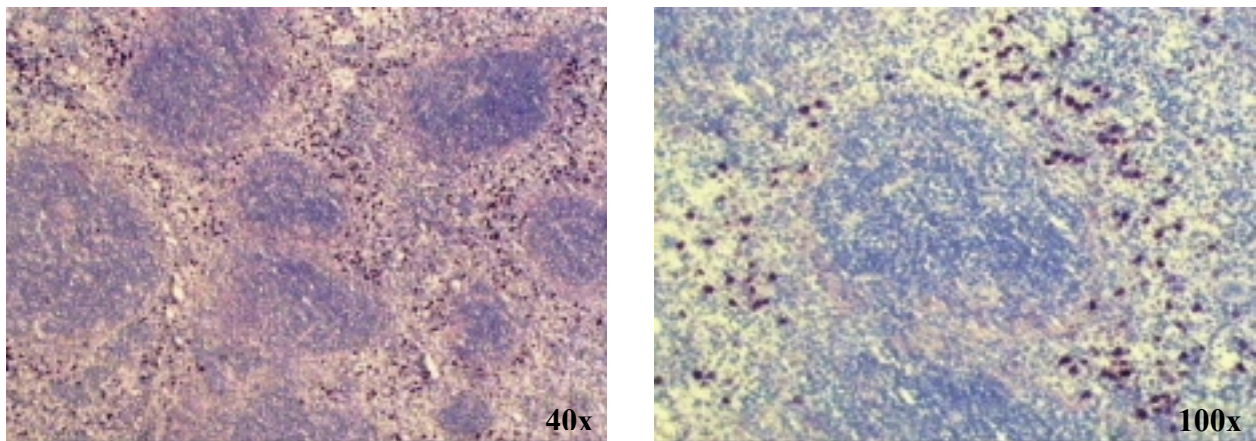


Abb.26: Immunohistochemische Färbung der CD11b positiven Zellen in 6 $\mu$ m Gefrierschnitten der Milz. Als Primärantikörper wurde ein biotinylierter anti-Maus CD11b Antikörper verwendet, als Sekundärreagenz diente Alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin und als Substrat Neufuchsin. Die CD11b positiven Zellen sind an ihrer roten Färbung zu erkennen.

Wie in Abb.26 klar zu erkennen ist, sind CD11b positive Zellen in großer Zahl in der roten Pulpa der Milz zu finden. Ihr Verteilungsmuster ähnelt damit stark der Anordnung der GDF-3 exprimierenden Stromazellen (Vgl. Abb.20).

### 3.4.4 Regulationsmechanismus der GDF-3 Expression durch CD11b positive Zellen

Im folgenden Zellkultorexperiment sollte einer weiteren in diesem Zusammenhang interessanten Frage nachgegangen werden: Regulieren CD11b positive Zellen die GDF-3 Expression über einen sezernierten Faktor oder durch direkten Zellkontakt?

Um diese Frage zu beantworten, wurde die CD11b Depletion mit anschließender Kultivierung wiederholt. Dabei wurde das RPMI plus Medium durch den gefilterten Überstand einer Gesamtmilz-Kultur (*cultured medium*, Kulturmedium) ersetzt (Abb.27). Dieses Kulturmedium enthält alle löslichen Faktoren, die von Zellpopulationen der Milz während 24stündiger Inkubation gebildet wurden. Sezernieren CD11b positive Zellen also einen entsprechenden Faktor, müsste der negative Effekt auf die GDF-3 Expression in CD11b depletierten Fraktionen nach Substitution des RPMI Mediums durch Kulturmedium (Überstand) reversibel sein.

Die FACS Analyse ergab eine Reinheit der CD11b depletierten Fraktion von 98% (Daten nicht gezeigt).

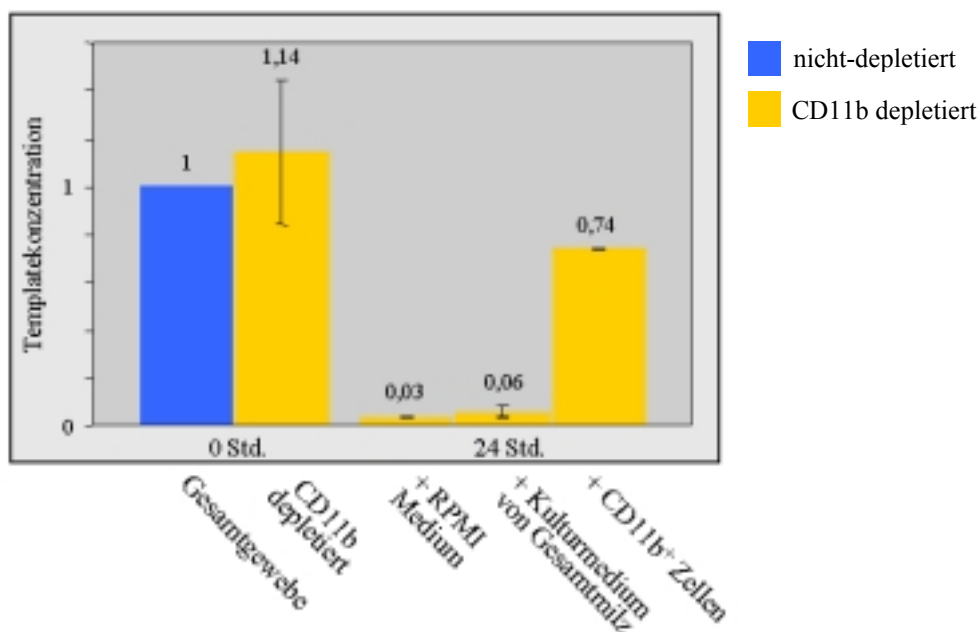


Abb.27: Analyse des Regulationsmechanismus der GDF-3 Expression durch CD11b positive Zellen. Gezeigt ist die GDF-3 Templatekonzentration in CD11b depletierten Milzzellen zum Zeitpunkt Null sowie nach 24stündiger Kultivierung bezogen auf Gesamtmilz. CD11b positive Zellen wurden durch MACS aus dem Gesamtgewebe depletiert. Die depletierte Fraktion wurde in 'normalem' RPMI plus Medium (+RPMI), in Überstand von Gesamtmilz (+Kulturmedium) oder zusammen mit den zuvor entfernten CD11b positiven Zellen (+CD11b<sup>+</sup>) kultiviert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die GDF-3 Templatekonzentration in der CD11b depletierten Zellsuspension ist bezogen auf das Gesamtgewebe aufgrund der leichten Anreicherung von Stromazellen etwas höher.

Wie das Ergebnis in Abb.27 zeigt, führt die Zugabe von Kulturmedium nicht zu einer Veränderung der GDF-3 Templatekonzentration. Es gilt wie für die Verwendung des gewöhnlichen RPMI Mediums, dass die GDF-3 Expression nach Depletion der CD11b positiven Zellen drastisch nachlässt. Lediglich die Wiederaufnahme der CD11b positiven Zellen zur depletierten Fraktion führt zu einer Wiederherstellung eines konstanten GDF-3 Expressionslevels (+CD11b<sup>+</sup> Zellen). Das Ergebnis deutet somit auf die Notwendigkeit eines direkten Zellkontaktes zwischen Stromazellen und CD11b positiven Zellen hin, welcher die GDF-3 Expression aufrecht erhält.

### 3.5 GDF-3 Expression in Rag<sup>-/-</sup> Mäusen

Rag-1 und Rag-2 sind rekombinationsaktivierende Gene (*recombination activating genes*), die für den somatischen Rekombinationsprozess in den frühen Vorläufern von B und T Lymphozyten essentielle Enzyme kodieren. Bei Mäusen, denen eines dieser Gene fehlt, ist die Umordnung der Gene für die Immunglobulin- und T Lymphozyten Rezeptoren vollständig blockiert. Rag-1 bzw. Rag-2 defiziente Mäuse (Rag-1<sup>-/-</sup>, Rag-2<sup>-/-</sup>) besitzen daher keine funktionsfähigen B und T Zellen. Ihre Immunabwehr ist sehr eingeschränkt<sup>74</sup>.

Bisherige Erkenntnisse zur Charakterisierung der GDF-3 Expression in lymphatischen Geweben sollten in den nachfolgend beschriebenen Experimenten an immundefizienten Rag-2 'Knockout' Mäusen überprüft werden. Dazu wurden die GDF-3 exprimierenden Zellen zunächst mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung in Gefrierschnitten von Rag 2<sup>-/-</sup> Milzen sichtbar gemacht. Das Ergebnis ist in Abb.28 gezeigt.



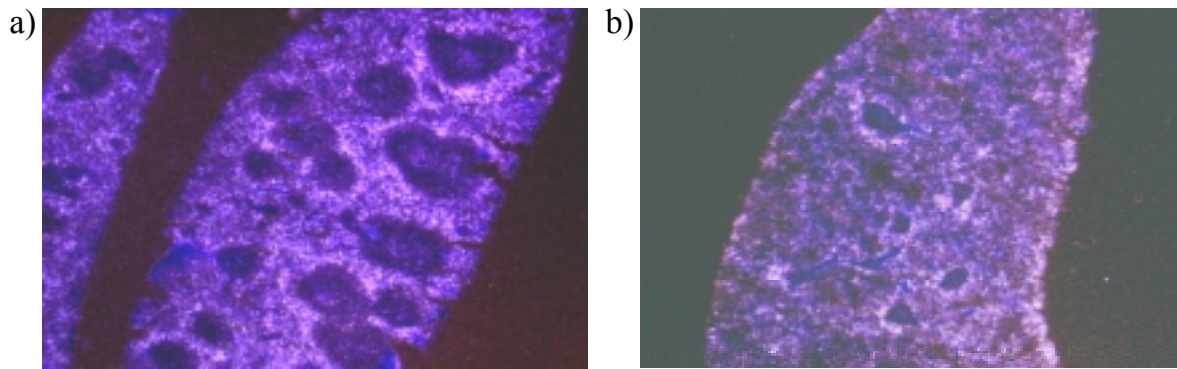


Abb.28: *In situ* Hybridisierung des GDF-3 Transkripts unter Verwendung radioaktiv markierter GDF-3 antisense RNA-Sonden auf 6µm Gefrierschnitten der Milz von (a) Wildtyp Mäusen und (b) Rag-2<sup>-/-</sup> Mäusen. Die GDF-3 exprimierenden Stromazellen sind im Dunkelfeld als hell leuchtende Strukturen zu erkennen.

Genau wie in der Wildtyp Maus (Abb.28a) befinden sich die GDF-3 exprimierenden Zellen in Milzen von Rag-2 defizienten Tieren (Abb.28b) im gesamten Bereich der roten Pulpa. Jedoch erscheint das Signal im Gewebe der Rag-2 Knockout erheblich gleichförmiger.

Weiterhin wurde analysiert, in wieweit sich die GDF-3 Expression in Rag-2 defizienten Mäusen quantitativ von der in normalen Mäusen unterscheidet. Dazu wurde aus den lymphatischen Geweben von Rag-2 Knockouts mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben, auf die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ Actin normalisiert, und die GDF-3 Templatekonzentration anschließend im LightCycler mit der GDF-3 Expression in Wildtyp Mäusen verglichen. Die verwendeten Mäuse hatten alle gleichen Hintergrund (BALB/c), das gleiche Geschlecht (männlich) sowie ein vergleichbares Alter (6-8 Wochen). Das Ergebnis ist in Abb.29 dargestellt.

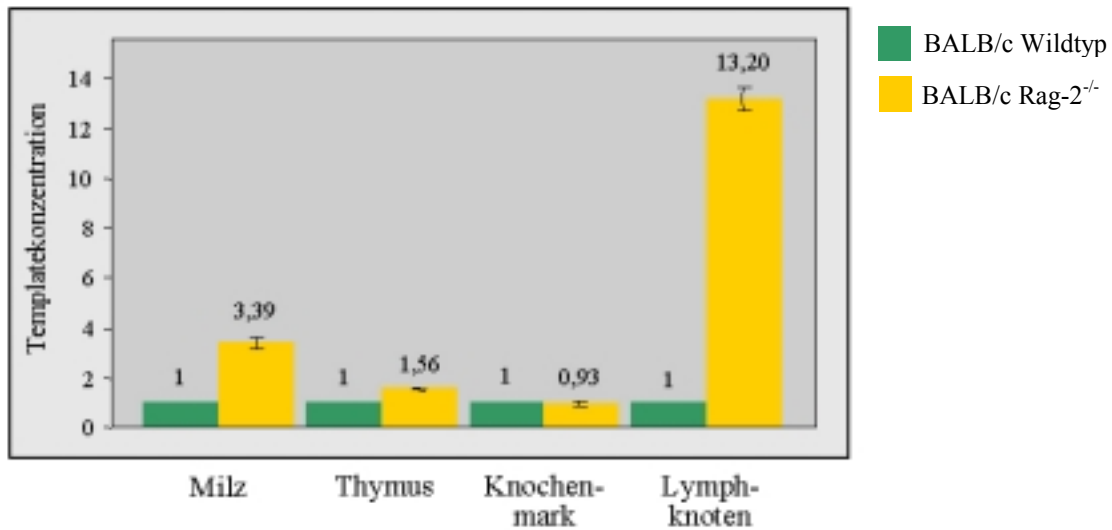


Abb.29: Analyse der GDF-3 Expression in lymphatischen Gesamtgeweben Rag-2 defizienter Mäuse. Die GDF-3 Templatekonzentration in den Rag-2<sup>-/-</sup> Geweben ist bezogen auf das korrespondierende Gesamtgewebe aus BALB/c Wildtyp Tieren. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Wie aus Abb.29 hervorgeht, unterscheidet sich die GDF-3 Expression in Thymus und Knochenmark von Rag-2 defizienten bzw. Wildtyp Mäusen nur unwesentlich. Eine leichte Erhöhung der GDF-3 Templatekonzentration ist dagegen in der Rag-2<sup>-/-</sup> Milz und in stärkerem Masse für Rag-2<sup>-/-</sup> Lymphknoten zu beobachten.