

4. Diskussion

Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF β Superfamilie sind in eine Vielzahl biologischer Prozesse sowohl während der Embryogenese als auch in der postnatalen Entwicklung involviert. Dazu zählen die Steuerung von Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Morphogenese sowie Pathogenese^{25,75}.

Einigen der über 30 beschriebenen TGF β Proteinen wurde eine regulatorische Wirkung im Immunsystem nachgewiesen. Die Rolle von TGF β -1 im Immunsystem wurde bisher am genauesten untersucht. Das Protein wird von verschiedenen Zellen synthetisiert und seine immuno-modulierende Wirkung kann sowohl positiv als auch negativ ausfallen. In geringen Konzentrationen wirkt TGF β -1 als Immunsuppressor und inhibiert B und T Zellproliferation⁷⁶⁻⁷⁷. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass TGF β -1 das Zellwachstum von T Lymphozyten sowie die B Zelldifferenzierung fördert^{58,78-79}. Ein weiterer TGF β Faktor, Activin A, wurde als Regulator in der Differenzierung von Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten beschrieben und ist darüber hinaus in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis in erhöhten Konzentrationen zu finden^{63,80-83}. Die Expression von GDF-15 (auch MIC-1, *macrophage inhibitory cytokine*) schließlich ist mit der Aktivierung von Makrophagen assoziiert^{56-57,84}.

Allen Mitgliedern dieser phylogenetisch sehr konservierten Proteinfamilie gemein ist ihre Funktion, in der unmittelbaren Umgebung der sezernierenden Zellen ein *microenvironment* (die 'Mikroumgebung') zu definieren, welches z.B. nicht ausdifferenzierten Stamm- oder Vorläuferzellen die notwendige Orientierung zur weiteren Differenzierung oder auch Dedifferenzierung liefert. Hierbei stehen die TGF β Moleküle in Wechselwirkung mit einer Reihe weiterer Wachstums- oder Differenzierungsproteine. Neben gewebsspezifischen Faktoren wie dem *nerve growth factor* (NGF), dem *hepatocyte growth factor* (HGF), dem *epidermal growth factor* (EGF) oder dem *stem cell factor* (SCF) sind dies besonders die Mitglieder der FGF (*fibroblast growth factor*) und Wnt (*wingless*) Proteinfamilien. In Genexpressionsanalysen und funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Signaltransduktionswege dieser Wachstumsfaktoren konvergieren und synergistische oder antagonistische Effekte haben⁸⁵. Die Diffusion der Proteine im Gewebe wird durch ihre hohe Affinität zur extrazellulären Matrix limitiert, von welcher sie nur sehr langsam freigesetzt werden. Für jeden Faktor lässt sich so ein morphogener Gradient in der Umgebung der sezernierenden Zelle beschreiben⁸⁶. Insgesamt sind ca. 400 Proteine als Zytokin,

Antagonist, Rezeptor, Signaltransduktionsmolekül oder zentralem Transkriptionsfaktor an dem Prozess des Gewebeaufbaus und der Geweberegeneration beteiligt. Die Tatsache, dass diese limitierte Zahl von Proteinen die Zelldifferenzierungsprozesse in sämtlichen Organen bei allen Säugern steuert, erklärt sich aus der unlimitierten Zahl von Kombinationsmöglichkeiten exprimierter Proteine und den daraus resultierenden *microenvironments*. Der einzelne Faktor ist dabei immer ein Element eines durch die Evolution aufeinander abgestimmten Ensembles. Er kann eine essentielle Funktion haben, was sich in einem ausgeprägten Phänotyp der entsprechenden 'Knockout' Maus widerspiegelt, oder aber eine synergistische Wirkung im Zusammenspiel mit ähnlichen Faktoren, was erst in der gezielten funktionellen Analyse defizienter Mäuse ersichtlich wird.

GDF-3 nimmt aufgrund seines Expressionsmusters eine besondere Stellung unter den TGF β Wachstumsfaktoren ein. In einer Vielzahl untersuchter Gewebe von adulten Mäusen konnte GDF-3 spezifische mRNA im Northern Blot lediglich in Milz, Thymus, Knochenmark und Fett nachgewiesen werden ³⁵ (s.1.3, Abb.4). GDF-3 wird also nahezu ausschließlich in lymphatischen Geweben exprimiert. Über die Funktion von GDF-3 im Immunsystem war bisher jedoch nichts bekannt.

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, die GDF-3 exprimierenden Zellen in primären und sekundären lymphatischen Geweben der Maus zu identifizieren. Außerdem konnten Regulationsmechanismen der GDF-3 Expression aufgedeckt werden.

4.1 Etablierung der LightCycler PCR

Mit der LightCycler PCR wurde zunächst eine Methode etabliert, mit deren Hilfe GDF-3 spezifisch und äußerst sensitiv nachgewiesen werden kann.

Die Primer wurden so gewählt, dass eine Diskriminierung zwischen cDNA und genomischer DNA möglich ist. Die cDNA Spezifität konnte in PCR Analysen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus sorgen Fluoreszenz-markierte Hybridisierungs sonden, welche komplementär zu einer internen Sequenz des amplifizierten Bereiches sind, dafür, dass lediglich GDF-3 spezifisches Transkript detektiert wird. Eine Titrationsreihe, in welcher bekannte Kopienzahlen einer klonierten GDF-3 cDNA eingesetzt wurden, brachte Aufschluss über die Sensitivität der Reaktion: 100 Kopien des GDF-3 Templates können zuverlässig nachgewiesen werden (s.3.1, Abb.9). Geht man für ein schwach exprimiertes Gen von 10 Kopien mRNA pro Zelle aus, entspricht dies gerade 10 Zellen. Während ein Northern Blot

oder auch die herkömmliche PCR im Thermocycler bestenfalls semi-quantitative Aussagen ermöglichen, erlaubt es die quantitative RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers, die exakte Menge eines Transkripts in einer bestimmten Probe zu ermitteln.

Die Normalisierung der cDNA Proben auf die Expression eines Haushaltsgens bietet den Vorteil, dass Varianzen in der Ausbeute und Qualität der mRNA bzw. der cDNA nicht zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen können. Wie der Vergleich mit HPRT zeigte, bietet die Normalisierung der cDNA auf β Actin eine verlässliche Grundlage zur relativen Quantifizierung (s. 3.2.1, Abb.12 und 3.4.1, Abb.22).

4.2 GDF-3 Expression in Gesamtgewebe

Zum Expressionsmuster von GDF-3 in Maus und Mensch sind in der Literatur lediglich qualitative Angaben zu finden^{35,55}. Die LightCycler PCR erlaubt nun erstmals, die GDF-3 Expression auch zu quantifizieren.

Die RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers ergab für lymphatische Gesamtgewebe der Maus, dass die GDF-3 Templatekonzentration in Knochenmark und Milz vergleichbar und am höchsten ist, gefolgt von Thymus. Die GDF-3 Expression in Lymphknoten ist vergleichsweise gering. Zwar konnte GDF-3 Template – anders als in früheren Studien – aufgrund der hohen Sensitivität der Methode auch in nicht-lymphatischen Organen nachgewiesen werden, die Konzentration war jedoch außerordentlich gering und lag etwa 100fach unter der in lymphatischen Geweben detektierten Menge (s.3.2.1, Abb.11).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig auch lymphatisches Gewebe des Menschen auf GDF-3 Expression untersucht. Während GDF-3 Transkript in den nicht-lymphatischen Organen nicht detektierbar war, konnte sowohl in humaner Milz als auch in Knochenmark GDF-3 Expression nachgewiesen werden (s.3.2.2, Abb.13). Zwar ermöglicht die zur Analyse eingesetzte Thermocycler PCR lediglich semi-quantitative Aussagen, der starke Unterschied in der Intensität der Banden für Milz und Knochenmark im Agarose Gel deutet jedoch auf eine wesentlich höhere GDF-3 Expression in Milz hin. Diese scheinbare Diskrepanz im Expressionsmuster zwischen Maus und Mensch lässt sich vermutlich durch die Art der Präparation des Materials erklären. Während das Knochenmark der Maus als komplettes Gewebe aus Oberschenkelknochen gewonnen wurde, handelt es sich bei dem humanen Knochenmark um ein Aspirat, welches vor allem in das Gewebe eingelagerte hämatopoetische Zellen enthält. Der Großteil der Stromazellen ist in diesem Fall jedoch im Gewebegerüst zurückgeblieben und damit verloren gegangen.

4.3 Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen

Da ein funktionierender Antikörper gegen GDF-3 nicht erhältlich war, wurde als Strategie zur Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen eine Kombination aus GDF-3 spezifischer LightCycler PCR, Zellsortierung (MACS) und *in situ* Hybridisierung gewählt (s.2.2.1, Abb.5).

In der LightCycler RT-PCR wurde mRNA aus definierten Zellpopulationen von Milz und Knochenmark analysiert (s.3.3.1 und 3.3.2). Dazu wurden die Zellen zunächst aus ihrem Gewebeverband gelöst, anhand spezifischer Oberflächenmarker mit Hilfe der MACS Technologie separiert und anschließend aus den positiven bzw. negativen Zellfraktionen mRNA gewonnen. Begonnen wurde mit der Analyse der größten Population mononukleärer (MN) Zellen in lymphatischen Geweben, d.h. mit Lymphozyten. Als Marker für B Zellen wurde B220 und für T Zellen Th1.2 gewählt. B220 (CD45R) wird von B Lymphozyten in allen Stadien ihrer Entwicklung, von der Pro B Zelle bis zur reifen B Zelle, exprimiert⁸⁷. Thy1.2 (CD90) ist spezifisch für Thymozyten sowie sämtliche peripheren T Lymphozyten⁸⁸⁻⁸⁹. Als nächst größere Population von Zellen der Milz wurden Makrophagen und dendritische Zellen untersucht. CD11b wird v.a. von Makrophagen exprimiert, CD11c gilt als spezifischer Marker für dendritische Zellen der murinen Milz⁹⁰⁻⁹¹. Da für die weitere Fraktionierung kleinerer Populationen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung stehen, wurden schließlich sämtliche weißen Blutkörperchen (Leukozyten) von Nicht-Leukozyten getrennt. Leukozyten können anhand des spezifischen Antigens CD45 (LCA, *leukocyte common antigen*) getrennt werden. Mit Ausnahme von Erythrozyten wird CD45 von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert^{88,92}. Milzzellen wurden darüber hinaus aufgrund ihrer Fähigkeit zu adhärentem Wachstum getrennt. Die LightCycler Analyse der einzelnen Fraktionen ergab folgende Merkmale für GDF-3 exprimierende Zellen: Es handelt sich um B220/Thy1.2/CD11b/CD11c/CD45 negative, adhärent wachsende Zellen, also keine Zellen der hämatopoetischen Linie.

Zelltypen, die aufgrund der beschriebenen Sortierungen nicht ausgeschlossen werden konnten und auf welche die gefundenen Charakteristika passen, sind Endothelzellen, FDCs (*follicular dendritic cells*) und Stromazellen. Ein direkter Nachweis mittels der bisher verfolgten Strategie war nicht möglich, da für die genannten Zelltypen keine spezifischen Oberflächenmarker bekannt sind. Die *in situ* Hybridisierung lieferte den entscheidenden

Hinweis und gleichzeitig Erkenntnisse über die Lokalisation der GDF-3 exprimierenden Zellen im Gewebe (s.3.3.3, Abb.20). Wie aus der Hybridisierung von Gewebeschnitten der Milz hervorgeht, wird GDF-3 von Stromazellen exprimiert, die sich im gesamten Bereich der roten Pulpa befinden. Stromazellen sind Teil des retikulären Bindegewebes, welches das Grundgerüst lymphatischer Gewebe bildet.

Die LightCycler Analysen definierter Zellpopulationen des Knochenmarks deuten auf den gleichen GDF-3 exprimierenden Zelltyp wie in der Milz hin (Phänotyp: B220/Thy1.2/CD45 negativ). Im Gegensatz zur Milz lassen sich aus dem Knochenmark relativ leicht permanente Kulturen aus Stromazellen gewinnen. Es stehen daher eine Reihe osteomyelogener Stromazelllinien zur Verfügung⁹³⁻⁹⁷. Die Untersuchung der murinen Zelllinien MS-5, ST-2 und S17 zeigte, dass Transkript aufgrund der hohen Sensitivität der Methode ähnlich wie in nicht-lymphatischen Geweben zwar detektierbar ist, GDF-3 in allen drei Zelllinien jedoch nur sehr schwach exprimiert wird. Auch die Stimulation mit LPS bzw. PMA führte in ST-2 Zellen zu keiner Veränderung des Expressionsmusters (Daten nicht gezeigt).

4.4 Charakterisierung von Regulationsmechanismen der GDF-3 Expression

Um zu überprüfen, ob sich die Expression von GDF-3 durch Zellstimulation beeinflussen lässt, wurden Milzkulturen mit LPS (*Lipopolysaccharid*), SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) bzw. PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*)/ Ionomycin stimuliert. Lediglich LPS zeigte einen deutlichen regulatorischen Effekt auf die GDF-3 Expression: Während die GDF-3 Expression in den nicht-stimulierten Zellen fast konstant bleibt, reduziert sie sich nach Zugabe von LPS um Faktor 10 (s.3.4.1, Abb.13). Studien, die CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) zur Analyse der Zellteilung verwenden, zeigten, dass es erst etwa 30 Stunden nach LPS Stimulation zur Proliferation von Lymphozyten kommt⁹⁸⁻⁹⁹. Im Experiment konnten nach 48 Stunden, nicht jedoch nach 24 Stunden, erste Zellcluster beobachtet werden. Es ist also auszuschließen, dass die Änderung des Expressionsmusters nach 24stündiger Inkubation mit LPS allein durch Verschiebungen in der Zellzusammensetzung zustande kommt, die eine relative Verminderung der Stromazellen und damit des GDF-3 Transkripts mit sich bringen würde. Vielmehr zeigt das Experiment, dass die GDF-3 Expression nach Zugabe von LPS negativ reguliert wird. Der Mechanismus für diese negative Regulation konnte nicht vollständig geklärt werden. Grundsätzlich sind zwei Erklärungen möglich: Entweder es handelt sich um einen direkten Effekt auf die

Stromazellen, oder das LPS stimuliert zunächst Monozyten/Makrophagen bzw. B Zellen, die wiederum die GDF-3 Expression in Stromazellen beeinflussen. Wie bereits erwähnt, konnte die *in vitro* Stimulation der Stromazelllinie ST2 mit LPS keine GDF-3 Expression induzieren (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass LPS vermutlich keine direkte Wirkung auf die GDF-3 Expression in Stromazellen hat.

Die Depletion von CD11b positiven Zellen (v.a. Monozyten und Makrophagen) sowie von B220 positiven Zellen (B Zellen) brachte keinen Aufschluss über den Wirkmechanismus des LPS, förderte aber ein anderes interessantes Phänomen zu Tage: Die GDF-3 Expression in Stromazellen ist von CD11b positiven Zellen abhängig. Wie die Abb.23 (3.4.1) zeigt, nimmt die GDF-3 Templatekonzentration in Milzzellen, aus denen zum Zeitpunkt Null die CD11b positiven Zellen depletiert wurden, nach 24stündiger Inkubation stark ab. Die Expression verändert sich 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 (s. 3.4.2, Abb.24).

Bei dem CD Antigen CD11b (auch Mac-1) handelt es sich um die α Untereinheit des Integrins CR3 (*complement receptor 3*). Ursprünglich als Monozyten- und Makrophagen-spezifischer Oberflächenmarker beschrieben, wird CD11b auch von Granulozyten, dendritischen Zellen, natürliche Killerzellen (NK Zellen) sowie von unreifen B Zellen und Subpopulationen von T Zellen exprimiert¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. B Zellen und T Zellen konnten in Depletionsexperimenten als Regulatoren ausgeschlossen werden (s.3.4.2, Abb.24 und 25). Die an entzündlichen Reaktionen beteiligten Granulozyten sind in erster Linie im Blut zu finden. Dendritische Zellen und NK Zellen dagegen kommen auch in der Milz vor und als Modulatoren der GDF-3 Expression in Frage. Sie wurden daher gezielt mit Hilfe der Antikörper anti-CD11c (hauptsächlich von dendritischen Zellen exprimiert) bzw. anti-DX5 (hauptsächlich von NK Zellen exprimiert) aus der Zellsuspension depletiert. In den restlichen Zellen wurde im Anschluss an eine 24stündige Kultivierung die GDF-3 Templatekonzentration bestimmt. Die LightCycler Analyse ergab, dass CD11c und DX5 positive Zellen genau wie die CD11b positive Population zur Aufrechterhaltung der GDF-3 Expression unentbehrlich sind (s.3.4.2, Abb.25).

Erklärungen für dieses Phänomen sind zunächst vielfältig. So könnte es sich bei den für die konstitutive GDF-3 Expression verantwortlichen Zellen um eine einzige Population handeln, die alle drei erwähnten Marker auf ihrer Zelloberfläche trägt. Oder aber um zwei

Populationen, von denen mindestens eine doppelt positiv ist. Schließlich könnte die GDF-3 Expression von drei verschiedenen Zellpopulationen reguliert werden, die sich möglicherweise untereinander beeinflussen.

Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und NK Zellen sind myeloiden Ursprungs. Sie stammen also von einem gemeinsamen Vorläufer ab und ähneln sich in der Expression bestimmter Oberflächenmarker. CD11b/CD11c/DX5 dreifach positive Zellen wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben, eigene FACS Analysen zeigten jedoch, dass solche Zellen in geringer Frequenz (weniger als 0,1% aller mononukleären (MN) Zellen) existieren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund ihrer sehr geringen Zahl ist es allerdings eher unwahrscheinlich, dass dreifach positive Zellen für den beschriebenen regulatorischen Effekt verantwortlich sind. Dagegen ist bekannt, dass CD11c – ähnlich wie CD11b – sowohl von Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, als auch von NK Zellen exprimiert wird¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Der Anteil CD11b/CD11c doppelt-positiver MN Zellen in der Milz beträgt 2,1% (s.3.3.1, Abb.15). Eigene FACS Analysen bestätigten außerdem die Existenz zahlreicher CD11b und DX5 doppelt-positiver Zellen (2% aller MN Zellen; Daten nicht gezeigt). Die Frequenz CD11b/CD11c bzw. CD11b/DX5 doppelt-positiver Zellen lässt eine Beteiligung an der Regulation der GDF-3 Expression möglich erscheinen – vorausgesetzt, sie befinden sich im gleichen Kompartiment wie die GDF-3 exprimierenden Zellen.

Der immunohistochemische Nachweis von CD11b positiven Zellen in Gefrierschnitten der Milz ergab, dass CD11b positive und GDF-3 exprimierende Zellen in vergleichbarer Zahl und in dem gleichen Kompartiment der Milz, nämlich in der roten Pulpa, vorkommen (s.3.4.3, Abb.26). Diese Ko-Lokalisation spricht dafür, dass CD11b positive Zellen einen unmittelbaren Effekt auf die Regulation der GDF-3 Expression ausüben. Wie aus Abb.27 (3.4.4) hervorgeht, erfolgt die Wirkung dabei vermutlich über einen direkten Kontakt der beteiligten Zellen. Da die GDF-3 Expression in CD11b depletierten Zellen lediglich durch die Wiederaufführung der CD11b positiven Zellen, nicht aber durch den Kulturüberstand von Gesamtmilz wiederhergestellt werden konnte, handelt es sich offenbar nicht um sezernierte Faktoren, welche für die konstitutive Expression verantwortlich sind.

Dendritische Zellen halten sich im Gegensatz zu den GDF-3 exprimierenden Stromazellen präferenziell in der weißen Pulpa der Milz auf^{13,108}. Über den Aufenthaltsort von NK Zellen in lymphatischen Geweben ist wenig bekannt, da eine Detektion DX5 positiver Zellen in Gewebeschnitten aufgrund fehlender Antikörper bisher nicht möglich war. Der für MACS

und FACS verwendete anti-DX5 Antikörper ist für immunohistochemische Analysen ebenfalls ungeeignet. Wie CD11c und DX5 positive Zellen die Regulation der GDF-3 Expression beeinflussen, bleibt unklar. Möglicherweise erfolgt die Kommunikation der CD11c und DX5 positiven Zellen mit den Stromazellen der roten Pulpa über sezernierte Faktoren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die GDF-3 Expression von Zellen des angeborenen Immunsystems reguliert wird, bei denen es sich um Makrophagen, dendritische Zellen oder NK Zellen bzw. einer entsprechenden Subpopulation handelt.

4.5 GDF-3 Expression in Rag-2^{-/-} Mäusen

Erkenntnisse zur Charakterisierung der GDF-3 Expression in lymphatischen Geweben gesunder (Wildtyp) Mäuse wurden an immundefizienten Rag-2 'Knockout' Mäusen überprüft. Dazu wurden die GDF-3 exprimierenden Zellen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung in Gefrierschnitten von Rag-2 defizienten (Rag-2^{-/-}) Milzen sichtbar gemacht und die GDF-3 Expression in lymphatischen Gesamtgeweben von Wildtyp bzw. Rag-2 defizienten Tieren verglichen.

Rag-2^{-/-} Mäusen fehlt ein rekombinationsaktivierendes Gen (Rag, *recombination activating gene*), welches ein für den somatischen Rekombinationsprozess in der frühen Entwicklung von Lymphozyten essentielles Enzym kodiert. Rag-2 defiziente Mäuse weisen daher keine reifen Lymphozyten auf⁷⁴. Obwohl Lymphozyten in sekundären lymphatischen Geweben Rag-2 defizienter Mäuse fehlen, wird GDF-3 in der Rag-2^{-/-} Milz exprimiert (s.3.5, Abb.28 und 29). Da GDF-3 von Stromazellen exprimiert wird, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Gleichzeitig bestätigt die Untersuchung, dass Lymphozyten auch nicht an der Regulation der GDF-3 Expression beteiligt sind.

Wie die *in situ* Hybridisierung zeigte, wird GDF-3 in Rag-2^{-/-} Milzen in vergleichbarem Maße von den Stromazellen der roten Pulpa exprimiert. Während man in der Wildtyp Maus deutlich die Lymphfollikel als dunkle, kugelförmige Bereiche erkennen kann, fehlen Rag-2 'Knockouts' die typischen Lymphozyten-Regionen der weißen Pulpa. Entsprechend ist das Signal gleichmäßiger über das gesamte Gewebe verteilt.

Die LightCycler Analyse der GDF-3 Expression in Immunorganen von Wildtyp bzw. Rag-2 defizienten Tieren zeigte, dass sich die GDF-3 Expression in den primären lymphatischen

Gewebe beider Mausstämme (Thymus und Knochenmark) nur unwesentlich unterscheidet (s. 3.5, Abb.29). Eine leichte Erhöhung der GDF-3 Templatekonzentration war dagegen in der Rag-2^{-/-} Milz (Faktor 3,4) und in stärkerem Maße auch in Rag-2^{-/-} Lymphknoten zu erkennen (Faktor 13,2). Da die entsprechenden cDNAs zuvor auf die Expression von β Actin normalisiert wurden, ist diese Beobachtung durch die artifizielle Anreicherung der GDF-3 exprimierenden Stromazellen in Rag-2 Knockouts aufgrund der fehlenden reifen Lymphozyten zu erklären. Die sekundären lymphatischen Gewebe (Milz und Lymphknoten) weisen in Rag-2^{-/-} Mäusen keinerlei Lymphozyten mehr auf. Entsprechend dem 'normalen' Anteil der Lymphozyten in der Wildtyp Maus machen sich hier die Verschiebungen in der Zellzusammensetzung bemerkbar: In Lymphknoten, in denen der Lymphozytenanteil größer ist als in der Milz, sind die Stromazellen und damit das GDF-3 Transkript entsprechend stärker angereichert.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

4.6.1 Schlussfolgerung

Mit der Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen sowie von Mechanismen, welche die GDF-3 Expression *in vitro* regulieren, konnte ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung der Funktion von GDF-3 in primären und sekundären lymphatischen Geweben der Maus geleistet werden. Zusammenfassend bekräftigen die Experimente die Hypothese, nach der GDF-3 einen Teil des Ensembles von Wachstums- und Differenzierungsproteinen darstellt, welches die Prozesse der Immunabwehr steuert. Das Expressionsmuster von GDF-3, welches eine räumliche Trennung des sezernierten Faktors von den in der weißen Pulpa lokalisierten Lymphozyten zeigt, aber eine Ko-Lokalisation mit CD11b positiven Zellen, welche die GDF-3 Expression unmittelbar regulieren, deuten auf eine Funktion von GDF-3 in der angeborenen Immunabwehr hin.

4.6.2 Ausblick

Eine Reihe von weiteren Experimenten wird dazu beitragen, die Rolle von GDF-3 im Immunsystem weiter zu bestimmen. Im Vordergrund stehen dabei:

- die Charakterisierung von GDF-3 defizienten 'Knockout' Mäusen,

- *in vivo* Stimulationen mit LPS,
- die Identifizierung des GDF-3 'Targets', also der Zielzellen.

GDF-3 defiziente Mäuse wurden ursprünglich durch Matzuk *et al.* generiert (nicht publiziert). Sie zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Es ist allerdings nicht ungewöhnlich, dass das Fehlen immunregulatorischer Faktoren funktionell zunächst kompensiert werden kann und die Funktion des Moleküls erst in gezielter funktioneller Analyse defizienter Mäuse deutlich wird. Für Vorexperimente wurden mir freundlicherweise einige Tiere durch AJ Celeste (Genetic Institute, Boston) zur Verfügung gestellt. Erste Daten lassen keinen apparenten Phänotyp im Immunsystem erkennen. Aufgrund der limitierten Anzahl von Mäusen konnten bisher lediglich histologische Untersuchungen sowie FACS Analysen und ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt werden. Weder in der Struktur der Milz, noch in der Zusammensetzung hämatopoetischer Zellen oder der Antikörperbildung nach Immunisierung mit Ovalbumin lassen sich danach Unterschiede zum GDF-3 Wildtyp erkennen. Weitere Experimente mit einer größeren Zahl GDF-3 defizienter Mäuse sind jedoch notwendig. Mögliche Immundefizienzen lassen sich vermutlich erst durch die gezielte Analyse der GDF-3 Expression in Infektionsmodellen aufklären.

In vitro Stimulationen von Milzzellen mit dem bakteriellen Antigen LPS zeigten einen klaren negativen Effekt von LPS auf die GDF-3 Expression in Stromazellen. Erste *in vivo* Versuche, in denen Mäuse systemisch mit Ovalbumin immunisiert wurden, verliefen jedoch ohne erkennbare Veränderung in der GDF-3 Expression. Bestimmt wurde die GDF-3 Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der primären und sekundären Immunisierung in der Milz. Möglicherweise liegen die Veränderungen unter der Nachweisgrenze; vielleicht handelt es sich bei Ovalbumin auch nicht um das geeignete Antigen. Die Immunisierung sollte daher mit LPS wiederholt werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel weiterführender Experimente stellt die Identifizierung des GDF-3 'Targets' dar. Um als Empfänger des Signals in Frage zu kommen, müssen die Zielzellen als Voraussetzung die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Zwar sind vermutlich alle existierenden TGF β Typ I und Typ II Rezeptoren beschrieben, die Rezeptorkombination aus Typ I und Typ II, über die GDF-3 wirkt, ist allerdings noch nicht bekannt. Eine weitere Schwierigkeit bildet die Tatsache, dass bis dato kein rekombinantes GDF-3 zur Verfügung steht. Versuche zur Überexpression von murinem GDF-3 in *E.coli* waren bisher erfolglos. Die

korrekte Faltung und Dimerisierung der Proteine erfordert die Ausbildung von Disulfidbrücken. Da dieses in dem stark reduzierenden Milieu des Zytoplasmas nicht gewährleistet ist, wurde als alternativer Weg die periplasmatische Expression gewählt. Allerdings ist die Ausbeute bei der zuletzt genannten Methode nur sehr gering. Entsprechend kann die Expression des rekombinanten Proteins nur mit Hilfe eines Antikörpers zuverlässig nachgewiesen werden. Ein Antikörper gegen GDF-3 steht, wie bereits erwähnt, zur Zeit nicht zur Verfügung. Als weitere Möglichkeit zur Herstellung des rekombinanten Proteins soll die Transfektion eukaryontischer Zellen versucht werden.