

Deutsches Rheuma-Forschungszentrum

Genexpression Follikulärer Dendritischer Zellen und Analyse ihrer ontogenetischen Entwicklung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

GORDON WILKE

geboren in Wolmirstedt

Oktober 2008

1. Gutachter: PD Dr. Claudia Berek

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 15.12.2008

*Επίεσσα στο σπίτι της
βουρί βουρί τζ'εσφύρουν,
τζ'έπεσα ο σιηλόστραβος
μες το βουρνί του σιήρου.
(A.A. & F.A.)*

Inhaltsverzeichnis

1	<i>EINLEITUNG</i>	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene und adaptive Immunität	1
1.1.2	T- und B-Lymphozyten	2
1.1.3	B-Lymphozyten im Immunsystem	2
1.1.4	Genetik und Struktur von Antikörpern	3
1.1.5	Sekundäre lymphatische Organe und Gewebe	4
1.2	Das sekundäre Lymphorgan Milz	4
1.2.1	Struktur der murinen Milz	4
1.2.2	Migration der Lymphozyten	6
1.2.2.1	Chemokine und ihre Rezeptoren	6
1.2.2.2	Chemokine-vermittelte Migration und Positionierung	7
1.2.3	Die Keimzentrumsreaktion	8
1.3	Follikuläre Dendritische Zelle (FDC)	9
1.3.1	Funktion der FDC	10
1.3.1.1	Präsentation von nativen Antigen	10
1.3.1.2	Zytokine	11
1.3.2	Die Entwicklung der FDC	11
1.4	Entwicklung der Milz	12
1.4.1	Signalvermittlung durch Lymphotoxin und Tumor-Nekrose-Faktor	12
1.4.1.1	Das Lymphotoxin/Tumor-Nekrose-Faktor-System	13
1.4.1.2	Die Rolle in der Entwicklung	14
1.4.2	<i>Lymphoid Tissue Inducer Cells</i>	15
1.4.3	Die neonatale Entwicklung der Milz	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	16

2	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	17
2.1	Verwendete Materialien	17
2.1.1	Mausstämme.....	17
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	18
2.1.3	Verbrauch.....	19
2.1.4	Antikörper und Reagenzien.....	20
2.1.5	Primer.....	21
2.1.6	Geräte.....	22
2.1.7	Software.....	22
2.2	Präparation von Mäusen und Gewebe	23
2.2.1	Immunisierung.....	23
2.2.2	Präparation des Milzgewebes.....	23
2.2.3	Herstellung von Gefrierschnitten der Milz.....	23
2.2.4	Herstellung einer Zellsuspension der Milz.....	24
2.2.5	Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus der Calvaria.....	24
2.3	Immunhistologie	25
2.4	Molekularbiologie	25
2.4.1	RNA-Isolierung.....	25
2.4.2	Analyse der RNA-Integrität.....	26
2.4.3	Reverse Transkription.....	26
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.4.5	OneStep RT-PCR: Amplifikation von V _H -Genen.....	28
2.4.6	<i>Screening</i> -PCR.....	29
2.4.7	LightCycler: Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.4.8	Agarosegelelektrophorese.....	30
2.4.9	DNA-Geextraktion.....	31
2.4.10	TOPO TA-Klonierung.....	31
2.4.11	Transformation.....	31
2.4.12	Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.4.13	Sequenzierung.....	32

Inhaltsverzeichnis

2.4.14	Sequenzanalyse	32
2.4.15	Konservierung von Bakterienkulturen	33
2.5	Laser-unterstützte Mikrodissektion	34
2.5.1	Immunhistologie für Mikrodissektion.....	35
2.5.2	Isolierung der Zellen durch Mikrodissektion	35
2.6	Sortierung von Zellen aus Zellsuspensionen	36
2.6.1	Zellanreicherung mittels MACS	36
2.6.2	Zellsortierung mittels FACS	37
2.7	DNA-Microarray	38
2.7.1	Lineare Amplifikation und Markierung der RNA.....	38
2.7.2	Hybridisierung eines DNA-Microarrays	39
2.7.3	Datenanalyse	39
2.8	<i>in situ</i>-Hybridisierung	41
2.8.1	Klonierung.....	41
2.8.2	<i>in vitro</i> Transkription	42
2.8.3	Hybridisierungsreaktion	43
2.8.4	Detektion und Substratreaktion	44
2.8.5	Doppel- <i>in situ</i> -Hybridisierung	44
2.9	Zellkultur.....	45
2.9.1	Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen.....	45
2.9.2	<i>in vitro</i> Ausdifferenzierung von Osteoblasten	45
2.9.3	<i>in vitro</i> Ausdifferenzierung von Adipozyten	45
3	<i>ERGEBNISSE</i>.....	47
3.1	Genexpression der FDC	48
3.1.1	Etablierung der Methode der Laser-unterstützten Mikrodissektion.....	49
3.1.2	Isolierung von FDC und folliculären B-Zellen	50

3.1.3	Analyse der generierten Microarrays	51
3.1.3.1	Vergleichspräzision der Microarrays	51
3.1.3.2	Bestätigung der neue Methode zur Identifizierung FDC-spezifischer Gene.....	53
3.1.3.3	Bioinformatische Auswertung zur Ermittlung FDC-spezifischer Gene	53
3.1.3.4	Identifizierung von FDC-Interaktionspartnern auf Seiten der B-Zellen	55
3.1.4	Zusammenfassung.....	58
3.2	Analyse und Funktion neu identifizierter FDC-Gene	58
3.2.1	Vorauswahl von FDC-Kandidaten-Gene	58
3.2.2	Zellspezifische Zuordnung der FDC-Kandidaten-Gene	63
3.2.2.1	FDC-Kandidaten-Gene sind hauptsächlich mesenchymalen Ursprungs	63
3.2.2.2	<i>in situ</i> -Analyse der neu identifizierten FDC-Gene.....	64
3.2.3	Funktionelle Rolle neu identifizierter FDC-Gene	71
3.2.3.1	Der Rezeptor für das enzymatische Produkt von Enpp2.....	71
3.2.3.2	Lrat-defiziente Mäuse zeigten ein aktiviertes Immunsystem.....	73
3.2.3.3	Lrat-defiziente Mäuse zeigten eine gestörte Keimzentrumsreaktion.....	75
3.2.3.4	Analysen der Milz von Periostin- und Biglycan-defizienten Mäusen	76
3.2.4	Zusammenfassung.....	77
3.3	Entwicklung des FDC-Netzwerks	78
3.3.1	Die Rolle von Lymphozyten in der Differenzierung des stromalen Immunkompartiments.....	80
3.3.1.1	Entwicklung der Milz in Lymphozyten-defizienten Mäusen.....	81
3.3.1.2	Die Entwicklung der Milz in T- bzw. B-Zell-defizienten Mäusen	85
3.3.1.3	Expression von T- und B-Zell-Chemokinen in unvollständig differenzierten Stromazellen der B-Anlage.....	88
3.3.1.4	Zusammenfassung.....	89
3.3.2	Expressionsmuster von FDC und stromalen B-Anlagen in SCID	91
3.3.3	Die Entwicklung des Immunkompartiments der neonatalen Milz.....	94
3.3.3.1	Die neonatale Entwicklung der Milz im Wildtyp	94
3.3.3.2	Expression der neu identifizierten FDC-Gene in der neonatalen Milz	105
3.3.3.3	Zusammenfassung.....	107

3.3.4	Signale von Lymphozyten in der Entwicklung der Weißen Pulpa	108
3.3.5	Die Entwicklung der neonatalen Milz ist unabhängig von <i>Lymphoid Tissue Inducer Cells</i>	109
3.3.6	Zytokine und ihre Rezeptoren in der Milzentwicklung	111
3.3.6.1	Naive CXCR5-defiziente Milzen besitzen keine FDC	111
3.3.6.2	Lymphotoxin α -unabhängig Differenzierung der Stromazellen von B- und T-Zone	114
4	<i>DISKUSSION</i>	119
4.1	Isolierung und Genexpression von FDC	119
4.1.1	Laser-unterstützte Mikrodissektion als neuen Methode zur Isolierung von FDC	119
4.1.2	Analyse der Genexpression von FDC	121
4.2	Die Rolle neu identifizierter FDC-spezifischer Faktoren	124
4.2.1	Serpina1 und Periostin: Motilität und Differenzierung im Keimzentrum.....	125
4.2.2	Biglycan als follikulärer Speicher von Zytokinen.....	127
4.2.3	Lrat in B-Zell-Differenzierung und Keimzentrumsentwicklung	128
4.2.4	Enpp2, sein enzymatisches Produkt und dessen Rezeptor.....	129
4.2.5	Funktion der neu identifizierten FDC-Gene im Überblick	131
4.3	Die Entwicklung des FDC-Netzwerks	133
4.3.1	Lymphozyten und die Entwicklung von FDC.....	133
4.3.2	LTi und die Entwicklung von FDC	135
4.3.3	Zytokine und die Entwicklung von FDC	136
4.3.4	FDC differenzieren von residualen Stromazellen	139

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	143
5.1	<i>Summary</i>	144
6	ANHANG.....	145
	Referenzen.....	145
	Abkürzungen.....	154
	Abbildungen und Tabellen	155
	Lebenslauf	177
	Danksagung.....	179
	Erklärung	181

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem umfasst Komponenten und Mechanismen eines Organismus, die Krankheitserreger (Pathogenen), körperfremde Substanzen und entartete Zellveränderungen (Tumorzellen) erkennt und bekämpft. Bestandteile dieses komplexen Abwehrmechanismus sind Lymphgewebe und -organe, verschiedene Zellen des blutbildenden (hämatopoietischen) Systems und lösliche Substanzen, die im Zusammenspiel den Körper schützen.

1.1.1 Die angeborene und adaptive Immunität

Grundsätzlich werden zwei Arten der Immunität unterschieden: die angeborene und adaptive. Die angeborene Immunität basiert auf zellvermittelter Gegenwehr durch Phagozytose, sowie allgemein entzündlichen Reaktionen und dem Komplementsystem. Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind in der Lage Krankheitserreger zu erkennen und zu eliminieren.

Die erworbene Immunität hingegen zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und führt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die adaptive Immunabwehr wird im Wesentlichen von T- und B-Lymphozyten getragen. Diese Zellen sind in der Lage, über spezifische Oberflächenrezeptoren Fremdkörper (Antigene) zu erkennen und gezielt Abwehrmechanismen zu einzuleiten. Nach Aktivierung der Zellen durch die Bindung des entsprechenden Antigens kommt es zur Expansion und Ausdifferenzierung von Effektorzellen, die Krankheitserreger bekämpfen, und Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen rasch und effizient reagieren können.

1.1.2 T- und B-Lymphozyten

T- und B-Lymphozyten bilden die Grundlage der adaptiven Immunität höherer Wirbeltiere. Beide Zellarten sind in der Zirkulation und in lymphatischen Geweben und Organen anzutreffen. In primären Lymphorganen entwickeln sich Lymphozyten aus lymphatischen Vorläuferzellen, welche sich aus hämatopoietischen Stammzellen differenzieren. Differenzierte Lymphozyten treten dann in die Zirkulation ein und migrieren zu sekundären lymphatischen Organen und Geweben.

T- und B-Lymphozyten besitzen strukturell und funktionell sehr ähnlicher Rezeptoren, die hochspezifisch Antigen erkennen und auf diese reagieren. Die hohe Antigen-Spezifität beider Zellarten spiegelt sich in der extrem hohen Vielfältigkeit verschiedener Rezeptorspezifitäten wider. Sie entsteht durch die zufällige Zusammenlagerung verschiedener Gensegmente im Laufe der Lymphozyten-Entwicklung und der daran anschließenden Modifikationen.

T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, entstehen im Knochenmark aus Lymphoblasten und wandern in den Thymus, wo sie ausreifen. Die unterschiedlichen Typen von T-Zellen lassen sich grundlegend in T-Helferzellen, zytotoxische und regulatorische T-Zellen einteilen.

B-Lymphozyten, auch B-Zellen genannt, leisten letztlich durch die Produktion Antigen-spezifischer Antikörper einen essentiellen Beitrag zur adaptiven Immunität. Neben den klassischen B-Zellen, den sogenannten B2-Zellen, gibt es noch B1-Zellen. Letztere sind selbst-erneuernde Zellen, die vorwiegend in der Bauchhöhle vorkommen und hauptsächlich auf Kohlenhydratantigene reagieren. Den weit größeren Anteil der B-Zellen in der Peripherie bilden die B2-Zellen.

1.1.3 B-Lymphozyten im Immunsystem

B-Zellen spielen aufgrund ihrer einzigartigen Fähigkeit Antikörper zu produzieren eine Hauptrolle bei der Immunantwort. Die Bildung von Antikörpern ist die zentrale Funktion der humoralen Immunität (latein: *humor*, Flüssigkeit). Die humorale Immunität ist der Teil der adaptiven Immunantwort, der über Körperflüssigkeiten vermittelt wird.

Jede B-Zelle exprimiert Rezeptoren einer Spezifität, die für die Erkennung von Antigenen und folglich für die Spezifität des Lymphozyten verantwortlich sind. Durch die Herstellung einer enormen Diversität von Antikörperspezifitäten, ist das Immunsystem in der Lage, auf eine unbegrenzte Anzahl von Antigenen zu reagieren¹.

1.1.4 Genetik und Struktur von Antikörpern

Antikörper zählen zur Proteinfamilie der Immunglobuline (Ig) und werden Membran-gebunden als B-Zell-Rezeptoren bezeichnet. Die Grundeinheit eines Antikörpermoleküls besteht aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten. Jede der beiden Ketten setzt sich aus konstanten (C-) und variablen (V-) Regionen zusammen. Die V-Regionen sind die Orte der Diversität. Die beiden Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Da nahezu jede Substanz eine Antikörperreaktion hervorrufen kann, muss eine enorme Diversität von B-Zellen im primären Repertoire vorliegen. Diese Vielfalt wird durch Rearrangierung einer relativ kleinen Zahl von V(D)J-Genen und Kombination einer leichten und einer schweren Kette erreicht. Die Rearrangierung der Ig-Gene stellt aufgrund der nicht-homologen Gensegmente eine spezielle Form der DNA-Rekombination dar. Eine somatische Rekombination erfordert die koordinierte Beteiligung mehrerer Enzyme, deren Gesamtheit als V(D)J-Rekombinase-Komplex bezeichnet wird. Sowohl Lymphozyten-spezifische Enzyme wie Rag1 und Rag2 (Rekombination-aktivierende Gene 1 und 2) als auch DNA-Reparatur-Enzyme wie DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) sind Bestandteil dieses Komplexes².

Am Aufbau der Antigenbindungsstelle eines Antikörpers sind die variablen Regionen der schweren (engl.: *heavy*, V_H) und leichten Kette beteiligt. Abhängig vom Haplotyp verfügt der Genlocus der Maus über 300 V_H -Gene, die sich in 14 V_H -Genfamilien (V_{H1} - V_{H14}) einteilen lassen³.

Durch den sogenannten Isotypen- oder Klassenwechsel kann eine V_H -Region mit einer C-Region verschiedener Ig-Klassen verknüpft werden und somit gleiche Spezifität, aber eine andere Funktion aufweisen. Es gibt fünf Hauptklassen von schweren Ketten, bezeichnet mit μ , δ , γ , α , und ϵ . Sie teilen biochemisch und funktionell die Antikörper in Isotyp IgM, IgD, IgG, IgA und IgE ein.

1.1.5 Sekundäre lymphatische Organe und Gewebe

Nach der Reifung migrieren Lymphozyten über die Zirkulation in sekundäre lymphatische Gewebe und Organe, wo die adaptive Immunantwort organisiert wird. Diese komplexen Systeme sind aus morphologisch abgrenzbaren Bereichen aufgebaut, die bevorzugt von B- oder T-Zellen aufgesucht werden. Hier werden Antigene aus dem Körper präsentiert, von rezirkulierenden Lymphozyten erkannt und in mehreren Schritten eine Immunantwort ausgelöst. Zu den sekundären lymphatischen Organen und Geweben zählen z.B. Lymphknoten, Tonsillen, Peyer'sche Plaques und die Milz.

1.2 Das sekundäre Lymphorgan Milz

Die Milz, als größtes Lymphorgan, ist ein im Blutkreislauf eingeschaltetes Organ des lymphatischen Systems und liegt im Abdomen nahe dem Magen. Die Milz hat zwei grundlegende Aufgaben. Zum einen ist sie Ort der Homöostase, Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten und zum anderen dient sie dem Abbau überalterter Erythrozyten und anderer Blutzellen, sowie der Speicherung von Thrombozyten. In der späten fetalen und neonatalen Entwicklung spielt die Milz darüber hinaus auch eine Rolle bei der Hämatopoese.

1.2.1 Struktur der murinen Milz

Die Milz ist von einer festen Bindegewebskapsel, durchsetzt mit glatten Muskelfasern, umgeben. Bindegewebe durchzieht in zahlreichen Strängen (Trabekel) das ganze Organ. Die Trabekel umschließen ein feinmaschiges Parenchym, die Pulpa (lateinisch, Fleisch, auch „weiches Inneres“).

Die Milz lässt sich in die vorwiegend von Leukozyten besiedelte Weiße Pulpa (auch Lymphfollikel) und von Blut durchströmten Roten Pulpa unterteilen. Die Blutversorgung erfolgt über die *Arteria lienalis*. Sie verzweigt sich in Trabekelarterien, aus denen die im Zentrum der Weißen Pulpa mündenden Zentralarterien hervorgehen. Die Milz verfügt

über ein offenes Gefäßsystem, wobei das Blut über die *Vena splenica* dann abgeführt wird.

Innerhalb der Weißen Pulpa akkumulieren B- und T-Zellen in separaten Kompartimenten. T-Zellen lokalisieren in periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS), auch T-Zone genannt, der Zentralarteriole und sind umgeben von B-Zellen, organisiert in Follikeln (latein: *folliculus*, Bläschen), auch B-Zonen genannt. Die B-Zellen im Follikel werden Follikuläre B-Zellen genannt. Umschlossen ist die Weiße Pulpa von einer sogenannten Marginalzone, die auch in einigen Definitionen zur Weißen Pulpa gezählt wird. In der Marginalzone befinden sich Makrophagen, Dendritische Zellen und ein besondere Subpopulation von B-Zellen (Marginalzonen-B-Zellen). Zwischen Marginalzone und Weißer Pulpa verzweigt sich die terminale Arteriole in offene Sinuses, die zusammen mit Stromazellen (engl.: *marginal sinus lining layer*) und Metallophilen Makrophagen den Marginalsinus bilden (Abb. 1).

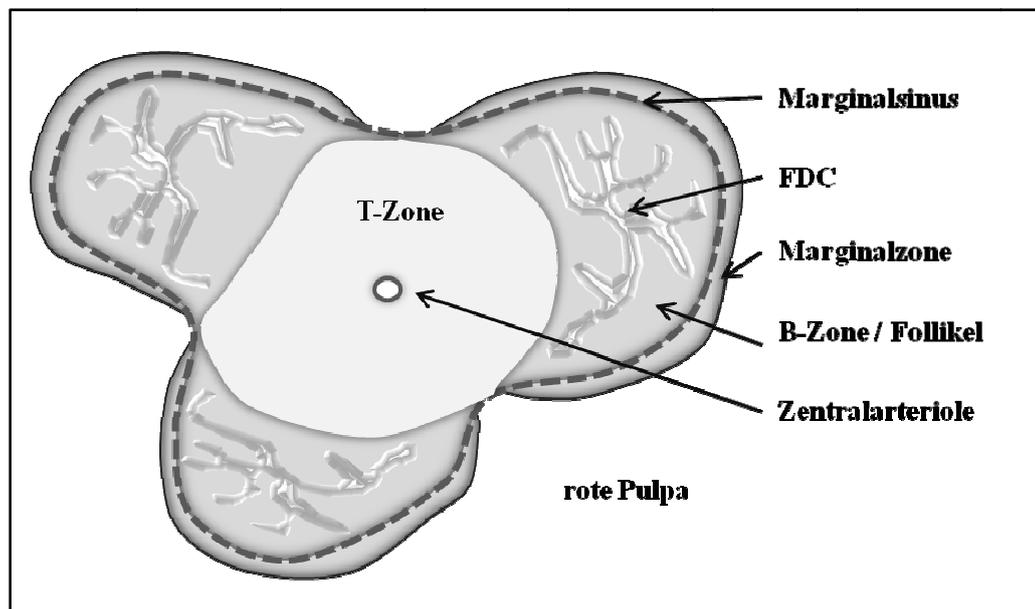


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Weißen Pulpa. Einzelheiten sind im Text erläutert.

1.2.2 Migration der Lymphozyten

Trotz der etablierten Kompartimente der Milz gibt es eine rege Bewegung der Lymphozyten, sowohl zwischen Milz und Blutstrom als auch zwischen den Kompartimenten der Milz. Der Eintritt der Lymphozyten in die Milz geschieht über den Marginalsinus. Der Transit wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelt⁴.

1.2.2.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

Die Positionierung der B- und T-Zellen in der Weißen Pulpa erfolgt durch die Chemokine CXCL13 (Bhc, Bca-1), CCL21 (Slc) und CCL19 (Elc) und ihre Chemokinrezeptoren CXCR5 (Blr1) und CCR7 (Ebi-1, Blr2).

Chemokine gehören zu den sekretierten Zytokinen. Sie sind kleine Polypeptide mit einer Länge von 60 bis 70 Aminosäuren. Chemokine wirken chemotaktisch und vermitteln die Migration und Retention u.a. von Lymphozyten in und zwischen Lymphorganen und wirken bei normalen und pathophysiologischen Prozessen, wie Zell- und Gewebsentwicklung, Tumorstadium und Infektionen.

Chemokine haben meist vier konservierte Cysteinreste (C1 bis C4), die zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Chemokine werden nach Lage der beiden ersten Cysteinreste eingeteilt: CXCL13 gehört zu der Gruppe der CXC- (oder α -) bzw. CCL19 und CCL21 zu der CC- (oder β -) Chemokinen. Bei der CXC-Subfamilie ist eine Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinresten lokalisiert. Die Cysteinreste der CC-Subfamilie sind nicht durch zusätzliche Aminosäuren voneinander getrennt^{5,6}.

Die Interaktionspartner der Chemokine sind die Chemokinrezeptoren, die von einer großen Zahl verschiedener Zelltypen exprimiert werden. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit sieben Transmembran- α -Helices die Zellmembran durchspannen. Die kurzlebigen intrazellulären Signale werden über Pertussis-Toxin-sensitive G α i-heterodimere G-Proteine vermittelt. Ungewöhnlich für Mitglieder der 7-Transmembran-Rezeptor-Superfamilie ist, dass nahezu alle Chemokinrezeptoren mehrere Chemokine als Liganden mit hoher Affinität binden können. Die Chemokinrezeptoren

werden in Familien eingeteilt, die nach den Chemokin-Subfamilien benannt sind, die sie binden. CXCL13 wird von CXCR5 gebunden, CCL19 und CCL21 von CCR7⁷.

1.2.2.2 Chemokine-vermittelte Migration und Positionierung

Während die Mechanismen zum Eintritt von Lymphozyten in Lymphknoten und Peyer'sche Plaques ausführlich beschrieben sind, ist weniger über den Eintritt in die Milz bekannt.

Da die Milz kein aktiviertes Endothel (HEV, engl.: *high endothelial venuels*) besitzt, gelangen einwandernde Zellen nur über den Marginalsinus in die weiße Pulpa. Die Wanderung vom Blutstrom ins Lymphgewebe über das Marginalsinus ist ein streng regulierter mehrstufiger Prozess, welcher durch Interaktionen von Selektinen und Integrinen auf Lymphozyten und deren Rezeptoren auf Endothelzellen des Marginalsinus initiiert wird. Durch Bindung von Chemokinen regulieren Lymphozyten Adhäsionsmoleküle hoch, die zur festen Bindung ans Endothel führen⁸.

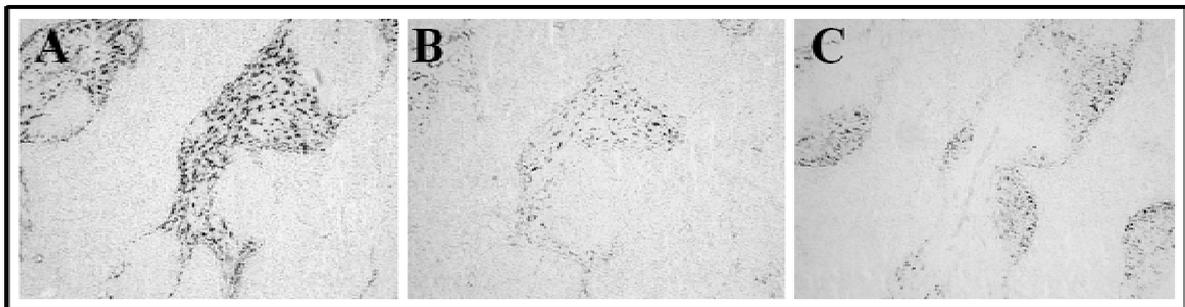


Abb. 2: Expression der Chemokine CCL19, CCL21 und CXCL13 in der Milz, gezeigt durch *in situ* Hybridisierung von Gewebsschnitten. Stromazellen der T-Zone exprimieren CCL21 (A) und CCL19 (B), Follikuläre Stromazellen und FDC umgeben die T-Zone und exprimieren CXCL13. 100-fache Vergrößerung.

Das Einwandern der Lymphozyten in die T-Zone und dortige Positionierung wird entscheidend durch die Interaktion von stromal exprimierten CCL19 und CCL21 (Abb. 2) und deren Rezeptor CCR7 auf Lymphozyten dirigiert. Durch Hochregulation des Chemokinrezeptors CXCR5 auf B-Zellen, migrieren diese entlang der äußeren T-Zone dem Chemokingradienten von CXCL13 (Abb. 2) entgegen und lokalisieren im Follikel

mit CXCL13-exprimierenden retikulären (latein: *rete*, Netz) Zellen, den Follikulären Dendritischen Zellen (engl.: *follicular dendritic cells*, FDC)⁸⁻¹⁰.

Als Antwort auf Antigen regulieren B-Zellen CXCR5 herunter und CCR7 hoch. Dies ermöglicht die Migration entgegen der B-Zell/T-Zell-Grenze, wo B-Zellen durch T-Zellen aktiviert werden¹¹. Aktivierte B-Zellen regulieren CXCR5 hoch und wandern wieder in den Follikel ein. Gleichzeitig exprimiert eine Subpopulation von T-Zellen CXCR5, die zur Lokalisation im Follikel führt¹². Es kommt zur Bildung von Keimzentren.

1.2.3 Die Keimzentrumsreaktion

Der Begriff Keimzentrum wurde vor etwa 120 Jahren von dem Begründer der Zytogenetik Walther Flemming geprägt. Bei dem Studium der Zellteilung im Lymphknoten beobachtete Flemming starke Proliferation von Leukozyten und nahm fälschlicherweise an, dass es sich um Orte der Keimung, der Lymphozytopoiese handelte. Erst 100 Jahre später wurde bekannt, dass die sogenannten Keimzentren wichtige Strukturen für die Entwicklung von hochaffinen Antikörpern während einer T-Zell-abhängigen Immunantwort sind^{13,14}.

Nach Induktion einer Immunantwort werden Antigen-spezifische B-Zellen in der T-Zone von T-Helferzellen aktiviert und wandern daraufhin in den Follikel ein. Der sogenannte Primärfollikel differenziert zum Sekundärfollikel durch Bildung eines Keimzentrums. Signale von FDC und follikulären T-Helferzellen führen zu B-Zell-Proliferation, Somatischen Hypermutationen (SHM), Isotypen-Wechsel, Affinitätsreifung und schließlich zur Bildung von Antikörper-sekretierenden Plasmazellen und eines immunologischen Gedächtnisses (Gedächtnis-B-Zellen). Ein weiterer zellulärer Bestandteil eines Keimzentrums sind *tingible body*-Makrophagen (engl., Makrophagen mit anfärbbarem Körper). Diese Makrophagen nehmen apoptotische B-Zellen auf, die den Selektionsprozess nicht bestehen¹⁵.

Dass ein Keimzentrum keine statische, sondern eine dynamische Struktur ist, wurde von Camacho *et al.* beschrieben¹⁶. Hier wurde die Milzstruktur immunohistologisch nach induzierter Immunantwort analysiert und die Entwicklung von Keimzentren in vier Stufen zusammengefasst (Abb. 3). B-Zellen wurden mit dem Markerreagenz für Keimzentrums-

B-Zellen Peanut-Agglutinin (PNA) und dem Proliferationsmarker Ki67 charakterisiert: Stadium I: Zwischen Tag 4 und 6 wandern proliferierende Keimzentrums-B-Zellen ($\text{PNA}^+ \text{Ki67}^+$) in das FDC-Netzwerk ein. Stadium II: Zwischen Tag 7 und 9 ist das FDC-Netzwerk vollständig mit proliferierenden PNA^+ B-Zellen (Zentroblasten) gefüllt. Naive B-Zellen wurden in die umgebene Mantelzone gedrängt. Stadium III: Ab Tag 10 entwickelt sich eine mit Zentroblasten gefüllte Dunkle Zone ($\text{PNA}^+ \text{Ki67}^+$) und mit nicht-proliferierenden Zentrozyten gefüllte Helle Zone ($\text{PNA}^+ \text{Ki67}^-$). Stadium IV: Ab Tag 15 verschwindet die dunkle Zone und wenige Zentroblasten mischen sich mit Zentrozyten.

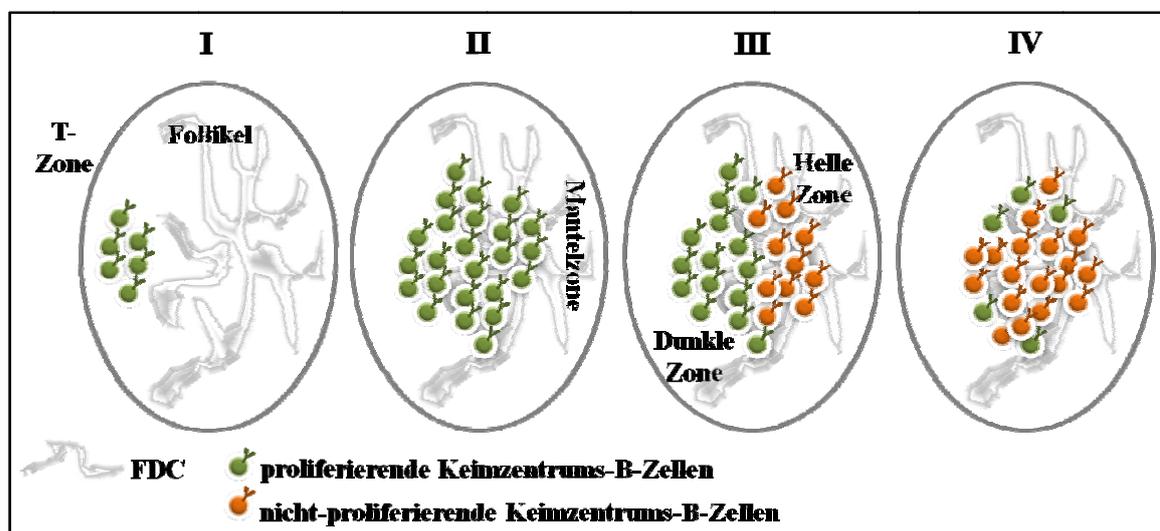


Abb. 3: Die dynamische Struktur eines Keimzentrums. Tag 4-6 nach Immunisierung wandern Keimzentrums-B-Zellen in das FDC-Netzwerk ein (Stadium I), Tag 7-9 ist das FDC-Netzwerk mit proliferierenden B-Zellen gefüllt (Stadium II), Tag 10-14 entwickelt sich eine typische Struktur aus Heller und Dunkler Zone (Stadium III), ab Tag 15 verschwindet die dunkle Zone und proliferierende und nicht-proliferierende B-Zellen mischen sich (Stadium IV).

1.3 Follikuläre Dendritische Zelle (FDC)

Ein Merkmal lymphoider Strukturen ist die Organisation von B- und T-Zellen in separaten Zonen. In frühen Studien wurde eine weitere Differenzierung beider Kompartimente nach Verabreichung von Antigen gezeigt. Im Gegensatz zur T-Zone, wo nur wenig intrazelluläres Antigen in Dendritischen Zellen nachzuweisen war, erfolgte eine schnelle

und weitläufige Verteilung im Follikel. Die Deposition von Antigen wurde schnell mit einem dendritischen Zelltyp assoziiert^{17,18}. Dieser Zelltyp wurde aufgrund seiner Lokalisation und Morphologie als Follikuläre Dendritische Zelle (FDC) bezeichnet¹⁹.

Die Fähigkeit unprozessiertes Antigen in Form von Immunkomplexen über Komplement- und Fc-Rezeptoren zu binden und über einen langen Zeitraum zu präsentieren definiert FDC und macht sie zu einzigartige Zellen des Immunsystems.

1.3.1 Funktion der FDC

1.3.1.1 Präsentation von nativen Antigen

Eine wichtige Aufgabe von FDC im Primär- und Sekundärfollikel ist B-Zellen Antigen zu präsentieren. Die Positionierung von Antigen auf FDC wird jedoch seit vielen Jahren diskutiert^{20,21}. Erst kürzlich wurden Marginal-B-Zellen als einziger Lieferant vom Blut übertragenden Antigen im Follikel definiert²².

Die Rolle von Immunkomplexen auf FDC im Primärfollikel wurde noch nicht untersucht. Es wird jedoch angenommen, dass hier die Präsentation von Antigen eine Rolle bei der Homöostase und Reifung von B-Zellen spielt. Dabei spielt die Affinität des B-Zell-Rezeptors unreifer B-Zellen eine tragende Rolle im Überleben und der Reifung zu Follikulären B-Zellen oder Marginalzonen-B-Zellen²³.

Im Sekundärfollikel wird angenommen, dass die Präsentation von Immunkomplexen auf FDC ein Antigendepot für hypermutierte Keimzentrums-B-Zellen im Prozess der Affinitätsreifung ist. Hierbei wird vorgeschlagen, dass B-Zellen, deren Rezeptor mit höherer Affinität an Immunkomplexen binden, stimulatorische Signale für Überleben und Differenzierung erhalten. Wie wichtig FDC-präsentierte Immunkomplexe während der Keimzentrum-Reaktion im Einzelnen sind, ist immer noch unter Debatte^{24,25}. Auch der Einfluss der langzeitigen Präsentation von unprozessiertem Antigen auf FDC zu Unterstützung des immunologischen Gedächtnisses ist noch kontrovers^{26,27}.

1.3.1.2 Zytokine

Das wohl prominenteste Zytokin der B-Zone, welches von FDC wird, ist das chemotaktische Zytokin CXCL13 (Abschnitt 1.2.2.2); ein kritischer Faktor für die Migration von Zellen in den Follikel²⁸.

Ein weiteres Zytokin, involviert in B-Zell-Homöostase, ist der zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie gehörende B-Zell-aktivierender Faktor (BAFF, auch TNFSF13B). Mäuse die eine Defizienz für BAFF oder seinen Rezeptor haben, zeigen zwar eine normale frühe Phase der Keimzentrumsreaktion, jedoch zerfallen die Keimzentren vorzeitig. Es scheint, dass BAFF eine Rolle in der Aufrechterhaltung von Keimzentren besitzt²⁹. Im welchem Maße FDC an der Produktion von BAFF im Follikel beteiligt sind, ist noch unklar. Jedoch gilt als sicher, dass hauptsächlich bestrahlungsrestistente Zellen und weniger hämatopoietische Zellen die Quelle von BAFF sind³⁰.

1.3.2 Die Entwicklung der FDC

Die Entwicklung von Immunkomplex-tragenden FDC in Lymphorganen beginnt etwa 2 Wochen postnatal³¹. Da es bisher noch nicht möglich war, eindeutig FDC-Vorläuferzellen zu identifizieren, sind Untersuchungen der frühen FDC-Entwicklung schwierig. Obwohl FDC als Zellen mesenchymalen Ursprungs weitgehend akzeptiert werden, gibt es unterschiedliche Modelle über die Entwicklung von FDC: entweder FDC entwickeln sich (1) durch Differenzierung von residualen Stromazellen oder (2) aus einwandernden Vorläuferzellen⁹.

Der Ursprung von FDC ist zwar immer noch nicht eindeutig nachgewiesen, dafür sind aber eine Reihe von Faktoren, die essentiell für die Entwicklung von FDC sind, bereits klar definiert. So wurde Anfang der 1990er gezeigt, dass die FDC-Entwicklung entscheidend von der Gegenwart von B-Zellen, nicht aber von T-Zellen abhängt³². Die Zytokine TNF und Lymphotoxin (LT) spielen dabei eine essentielle Rolle. Mäuse, die defizient für diese Zytokine, ihre Rezeptoren oder assoziierte Signalmoleküle sind, besitzen keine FDC und haben eine gestörte Organisation der sekundären Lymphorgane^{9,33}.

FDC-Vorläuferzellen wurden im Zusammenhang mit der histologischen Analyse von Mäusen, defizient für entweder CXCR5, TNFR1 oder TNF beschrieben. Diese Mausstämmen sind weder in der Lage Follikel zu formen, noch ein typisches FDC-Netzwerk zu entwickeln. Jedoch zeigten Färbungen mit dem FDC-spezifischen Antikörper M2 einen breiten Ring schwach positiver Zellen. Diese M2⁺ Zellen sitzen außerhalb des Marginalsinus und koloalisieren mit B-Zellen. Daraufhin wurde diskutiert, dass FDC nicht im Follikel entstehen, sondern den Marginalsinus überqueren müssen, um sich im Follikel zu positionieren^{34,35}.

Die Analyse von FDC steckt auch in der heutigen Zeit voller Herausforderungen. Ursache ist die Schwierigkeit diesen bestrahlungsresistenten Zelltyp³⁶ in reiner Form zu isolieren und das Fehlen gut entwickelter Werkzeuge für eine selektive Manipulierung ihrer Genexpression. Aufgrund der Erkenntnis, dass FDC eine wichtige Rolle in der B-Zell-Homöostase und -Differenzierung übernehmen, gibt es eine wachsende Anzahl von Studien, die sich mit der Untersuchung von FDC-Phänotyp, -Funktion und -Entwicklung befassen.

1.4 Entwicklung der Milz

Die Milz entwickelt sich wie die Mehrzahl der sekundäre Lymphorgane während der Embryonalphase. In Mäusen ist die erste Milzanlage als kondensiertes Mesenchym ab Embryonaltag (E) 10,5 zu beobachten. Obwohl mittlerweile ein paar Regulatoren der Milz-Organogenese, wie beispielsweise Signalmoleküle der TNF-Superfamilie, bekannt sind, ist der genaue Mechanismus der molekularen und zellulären Abläufe noch weitgehend unbekannt³⁷.

1.4.1 Signalvermittlung durch Lymphotoxin und Tumor-Nekrose-Faktor

Wie schon in Abschnitt 1.3.2 erwähnt, sind LT und TNF, sowie ihre Rezeptoren tragende Moleküle in der Entwicklung von sekundären Lymphorganen. Störungen in ihrer

Signalvermittlung führen zu einer anormalen Lympharchitektur und dem Fehlen von FDC^{9,33}.

1.4.1.1 Das Lymphotoxin/Tumor-Nekrose-Faktor-System

Eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Lymphorganen übernehmen vier sehr eng verwandte Liganden der TNF-Superfamilie, $LT\alpha$ (TNF β , TNFSF1), $LT\beta$ (TNFSF3), TNF (TNF α , TNFSF2) und LIGHT (TNFSF14) und ihre unmittelbaren Rezeptoren $LT\beta R$ (TNFR3, TNFRSF3), TNFR1 (TNFR55, TNFRSF1A), TNFR2 (TNFR75, TNFRSF1B) und HVEM (TNFRSF14). Das überlappende Muster der Ligand-Rezeptor-Bindung ist eine entscheidende Eigenschaft dieser Familie. $LT\alpha$ und $LT\beta$ formen grundsätzlich zwei unterschiedliche Liganden: (1) das sekretierte Homotrimer $LT\alpha_3$ und (2) das Membran-gebundene Heterodimer $LT\alpha_1\beta_2$. $LT\alpha_3$ und TNF binden zwei der Rezeptoren: TNFR1 und TNFR2. $LT\alpha_1\beta_2$ und LIGHT hingegen vermitteln Signale via $LT\beta R$. Der Rezeptor HEVM (engl.: *herpes virus entry mediator*) interagiert mit LIGHT und $LT\alpha_3$ (Abb. 4).

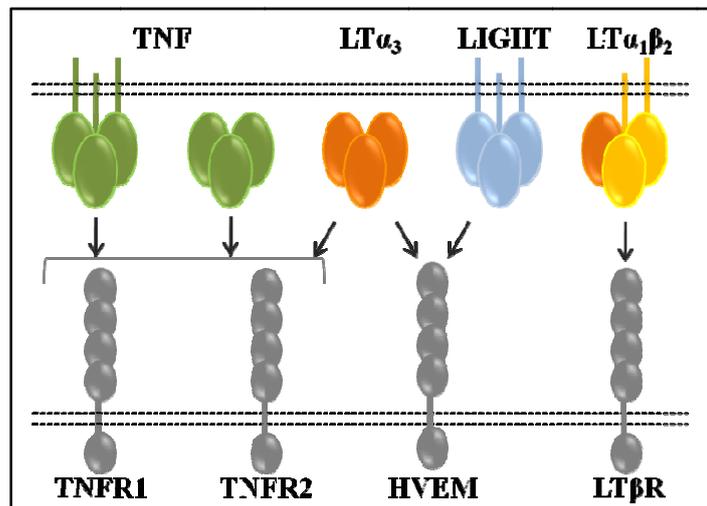


Abb. 4: Die Liganden Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Lymphotoxin (LT) und LIGHT und ihre Rezeptoren. Membran-gebundenes sowie lösliches TNF und $LT\alpha_3$ binden TNFR1 und TNFR2. $LT\alpha_3$ bindet außerdem an HVEM. Membran-gebundenes $LT\alpha_1\beta_2$ bindet nur $LT\beta R$. LIGHT (TNF *superfamily member* 14) bindet an $LT\beta R$ und HVEM.

1.4.1.2 Die Rolle in der Entwicklung

Mäuse, defizient für $LT\alpha$, $LT\beta$ oder $LT\beta R$, zeigen schwere Störungen in der T- und B-Zell-Segregation und einen ungeordneten Marginalsinus. Darüberhinaus fehlen Follikel und FDC. Ein vergleichbarer Phänotyp kann auch durch Administration von löslichem $LT\beta R$ erreicht werden. Dies zeigt, dass die Integrität der Milzarchitektur nicht nur während der Entwicklung, sondern an stetige Signale über $LT\beta R$ gebunden ist^{8,38}.

Mäuse mit einer Defizienz für TNF, TNFR1 oder TNFR2 weisen eine segregierte T- und B-Zone auf. Jedoch ist die Ausbildung von Follikeln mit FDC in TNF^{-/-} und TNFR1^{-/-}, nicht aber in TNFR2^{-/-} defekt. Hierbei verdeutlicht sich die Rolle von TNF-Signalen via TNFR1 in der Ausbildung reifer Follikel^{8,38}.

Immunohistologisch konnte die Expression von $LT\beta R$ und TNFR1 auf Stromazellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde mit verschiedenen Transferexperimenten demonstriert, dass die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Follikeln mit FDC von stromaler $LT\beta R$ - und TNFR1- und hämatopoietischer $LT\alpha_1\beta_2$ - und TNF-Expression abhängt. Für die Expression von $LT\alpha_1\beta_2$ werden B-Zellen als Hauptquelle genannt^{9,39}.

Nichtsdestotrotz ist aufgrund der Komplexität der Signalvermittlung und der Notwendigkeit einzelner LT/TNF-Signale in festdefinierten Zeitfenstern das LT/TNF-System zwischen hämatopoietischen und stromalen Zellen weitgehend noch unverstanden. LIGHT scheint für die Integrität und Entwicklung der Milz eine untergeordnete Rolle zu spielen. Mäuse mit einer LIGHT-Defizienz zeigen keine erkennbaren Defekte in der Milz. Jedoch konnte gezeigt werden, dass fehlende $LT\alpha$ - Signale durch Überexpression (LIGHT-transgen) kompensiert werden können^{38,40}.

Ob die Ursache für die Entwicklung lymphatischer Strukturen von der initialen Expression von Chemokinen abhängt, deren Folge die Migration von LT-exprimierenden Zellen ist; oder ob die Interaktion zwischen LT und seinen Rezeptoren zur Expression von Chemokinen in residualen Stromazellen führt, ist noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass sowohl eine induzierte ektopische Expression der Chemokine als auch von LT zur Entwicklung von organisierten lymphatischen Strukturen führt^{41,42}.

1.4.2 Lymphoid Tissue Inducer Cells

Dass die Entwicklung von Lymphorganen nicht nur von Lymphozyten abhängt, wurde durch die Identifizierung und Charakterisierung einer hämatopoietischen Zellpopulation ($CD3^- CD4^+ CD45^+$) gezeigt. Die Rolle dieser sogenannten Induktorzellen des Lymphgewebes (engl.: *Lymphoid Tissue Inducer Cells*, LTi) ist für die Entwicklung von Lymphorganen wie Peyer'sche Plaques und Lymphknoten essentiell und deshalb gut definiert⁴³. Obwohl LTi die ersten hämatopoietischen Zellen sind, die die embryonale Milzanlage besiedeln (Tag E12,5 - E13,5)^{44,45}, gibt es bisher nur wenige Hinweise über die Rolle dieser Zellen in der Milz und deren Entwicklung⁴⁵. Die Generation von LTi ist abhängig von der Expression eines Mitglieds der Retinsäure-Rezeptor-Familie, dem *acid-related orphan*-Rezeptor (Ror) γ . In *Rory γ -/-* sind keine LTi detektierbar und es fehlen Lymphknoten und Peyer'sche Plaques. Die Struktur der Milz dieser Tiere ist jedoch normal und durch Akkumulation von B-Zellen leicht vergrößert⁴⁶. Das murine *Rory γ* -Gen kodiert zwei Isoformen: *Rory γ* und *Rory γ t*. Obwohl mRNA von *Rory γ* in einigen Geweben exprimiert wird, gibt es *Rory γ t*-mRNA nur in $CD4^+ CD8^+$ T-Zellen und LTi⁴⁷.

1.4.3 Die neonatale Entwicklung der Milz

1973 wurde erstmalig die prä- und neonatale Besiedlung der murinen Milz von B-Zellen beschrieben. Mittels histologischer Untersuchungen fanden Nossal *et al.* heraus, dass die ersten B-Zellen am Embryonaltag E16 die Milz besiedeln, wobei die Anzahl der B-Zellen bis kurz nach der Geburt rapide zunahm⁴⁸.

Im gleichen Jahr untersuchten Spear *et al.* die Besiedelung der Milz durch B- und T-Zellen quantitativ. Zur Definition von B-Zellen wurde ein Antiserum gegen aufgereinigte Antikörper und von T-Zellen ein Antiserum gegen isolierte T-Zellen (θ -Antiserum) generiert. Analysiert wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen einer Milzzellsuspension im Mikroskop. Eine Einwanderung von Ig^+ und θ^+ Zellen wurde ab Tag E16 gezählt und ein rasanter Anstieg von Ig^+ und θ^+ Zellen wurde bis Tag 7 postnatal beobachtet⁴⁹.

Friedberg *et al.* beschrieben zwei Jahre später eine perivaskuläre Akkumulation von B-Zellen am Tag der Geburt. Für die Definition von T-Zellen benutzten sie ein neues

Antiserum (Thy 1.2). Hiermit stellten sie fest, dass T-Zellen erst am Tag 4 postnatal die Milz besiedeln⁵⁰. Erst wieder in den 1980er werden neue Daten in der neonatalen Milzentwicklung gesammelt. Sasaki *et al.* definierten Megakaryozyten, granuläre Zellen und Lymphozyten in der Roten Pulpa. Erst von Tag 4 an beobachteten sie einem signifikanten Anstieg von Lymphozyten und in diesem Zusammenhang erste Weiße Pulpa-Strukturen in perivaskulären Arealen⁵¹.

Obwohl viele für eine normale Milzentwicklung essentielle Faktoren, wie Lymphozyten, Chemokine und das LT/TNF-System, definiert sind, ist die Chronologie der neonatalen Entwicklung sehr lückenhaft. Auch neuere Untersuchungen über die Migration von Lymphozyten und die Differenzierung des stromalen Kompartiments nach der Geburt geben nur unzureichend Auskunft über die neonatale Entwicklung der Milz^{45,52}.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Überleben, Reifung und Proliferation der B-Zellen im Follikel ist abhängig von Signalen ihrer Mikroumgebung. Dabei spielen FDC aufgrund der Ausbildung eines dichten Netzwerkes, in dem B-Zellen eingebettet sind, der Präsentation von unprozessiertem Antigen und Expression verschiedener Zytokine eine wichtige Rolle. Obwohl FDC in der humoralen Immunantwort von besonderer Bedeutung sind, ist die Charakterisierung dieses Zelltyps noch immer sehr lückenhaft. Ursachen dafür liegen vor allem in der Schwierigkeit, FDC für eine Analyse *ex vivo* zu isolieren. Aufgrund ihrer Fragilität und ihrer engen Interaktion mit B-Zellen ist es problematisch intakte FDC aus vitalem Gewebe mit einer signifikanten Homogenität anzureichern.

Für die Identifizierung neuer FDC-spezifischer Gene wird die neuartige Methode der Laser-unterstützter Mikrodisektion zur schonenden Isolierung von FDC etabliert. Dabei sind Gene, die eine Rolle in der B-Zell-Differenzierung und -Homöostase übernehmen, sowie Gene, die über die Entwicklung der FDC Auskunft geben, von besonderem Interesse. Mit Hilfe der neu definierten FDC-spezifischen Gene konnte die Entwicklung des stromalen Immunkompartiments bis zu differenzierten FDC und der Einfluss verschiedener hämatopoietischer Zellen und ihrer Signale analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Mausstämme

Alle verwendeten Mausstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alter der adulten Tiere war zwischen sechs und zehn Wochen.

Mausstamm	Genetische Veränderung	Herkunft
BALB/c	wildtyp (wt)	BfR, Berlin
SCID	Mutation im Gen der DNA-abhängigen Proteine Kinase DDPK; Ausschaltung der V(D)J-Rekombination resultiert im Fehlen von reifen B- und T-Zellen ⁵³ .	BfR, Berlin
Rag1 ^{-/-}	Deletion im Rekombinase-aktivierten Gen Rag1; Ausschaltung der V(D)J-Rekombination resultiert im Fehlen von reifen B- und T-Zellen ⁵⁴ .	BfR, Berlin
Tcr β / δ ^{-/-}	Deletion im Gen der T-Zell-Rezeptoren β und δ ; Ausschaltung führt zu Fehlen von reifen $\alpha\beta$ - and $\gamma\delta$ -T-Zellen ⁵⁵ .	BfR, Berlin
JHT	Deletion des JH-Segmentes und des Intron-Enhancers im IgH-Lokus; Ausschaltung der Rearrangierung resultiert im Fehlen von reifen B-Zellen ⁵⁶ .	BfR, Berlin
Lt α ^{-/-}	Deletion im Gen für das Zytokin Lymphotoxin (LT) α ⁵⁷ .	BfR, Berlin
CXCR5 ^{-/-}	Deletion im Gen für das Chemokine CXCR5 ⁵⁸ .	MDC, Berlin

Rory ^{-/-}	Deletion im Gen für den Transkriptionsfaktor RAR-Related Orphan Receptor γ (Rory) ⁵⁹ .	MDC, Berlin
Lrat ^{-/-}	Deletion im Gen für die Lecithin Retinol Acyltransferase (Lrat) ⁶⁰ .	K. Palczewski, USA
Postn ^{-/-}	Deletion im Gen für Periostin (Postn) ⁶¹ .	S.J. Conway, USA
Bgn ^{-/-}	Deletion im Gen für Biglycan (Bgn) ⁶² .	J.W.Fischer, Düsseldorf

2.1.2 Puffer und Lösungen

Chemikalien wurden von Roth bezogen. Abweichungen sind ausgewiesen.

STE-Puffer	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE-Puffer	100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 3 mM EDTA, pH 8,0
PBS-Puffer	130 mM NaCl, 1 M Na ₂ HPO ₄ , 1 M NaH ₂ PO ₄
FACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 5 mM EDTA
Erythrozyten-Lysis-Puffer	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.1 mM EDTA, pH 7,5
DNA-Probenpuffer	25 mM Bromphenolblau (Sigma), 15% Ficoll (Amersham)
Nährlösung	2xYT Broth (Bio 101, Inc.), 50 μ g/ml Ampicillin (Sigma)
Nähragar	YT Broth (Bio 101 Inc.), 15% Agar Selekt (Sigma), 50 μ g/ml Ampicillin (Sigma)
Kulturmedium	α -MEM (PAA Laboratories), 10% FCS (PAN), 1% Penicillin/Steptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco)
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ pH 9,0
SSC (20x)	3M NaCl, 0.3M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ pH 7.0
RNase-Puffer	10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH8,0
Hybridisierungslösung	5x SSC, 50% Formamide (Chemicon), 10% Dextran Sulphate (Fluka), 200 μ g/ml Salmon Sperm (Fluka)
TS-Puffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.5

2.1.3 Verbrauch

Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems
PicoPure RNA Isolation Kit	Arcturus
HindIII	New England Biolabs
EcoRI	Amersham Pharmacia Biotech
RNase Inhibitor, RiboLock	Bioline
LightCycler-Kapillare	Roche
DNA-Marker, GeneRuler 100 bp	Fermentas
DNase Set	Qiagen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf
Reaktionröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning
Pipettenspitzen	Grainer
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym
PCR-Gefäße, 0,2 ml 8ter Streifen	Roth
PCR-Gefäße, 0,5	Biometra
Parafilm	American National Can
Kryostatmesser	Microm
Deckgläser für Objektträger	Roth
RNase AWAY	Molecular Bio Products
DEPC	Sigma
Kaiser's Gelatine	Merck
Fettstift, DAKO Pen	DAKO
Levamisol	Sigma
CSA	Sigma
BSA	Sigma
2-Phenyloxozalon	Sigma
Zellsieb, 70 µm cell strainer	BD Falcon
Plastiküvetten	Roth
Minilanzetten	Braun
Skalpel	Roth
Zellkulturschalen, Ø10 cm	Grainer

2.1.4 Antikörper und Reagenzien

Die verwendeten Primärantikörper sind Maus-spezifisch und wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, in Ratten generiert.

Primärantikörper/-reagenzien	Klon	Herkunft
anti-B220: BIO/FITC/PE/Alexa405	RA3.6B2	DRFZ
anti-BP3: BIO/Alexa488 (Maus)	WP-1	M. Cooper
anti-Biglycan LF-159 (Kaninchen)	Polyklonal	L. Fisher
anti-CD11b: FITC	MI/70.15.11	DRFZ
anti-CD11c: Cy5 (armenischer Hamster)	N418	DRFZ
anti-CD3: PE (armenischer Hamster)	145-2C11	DRFZ
anti-CD3: Alexa488	KT3	Serotec
anti-CD4: Alexa546/Cy5	YTS	DRFZ
anti-CD21: Alexa488/Alexa546/Cy5	7G6	DRFZ
anti-CD23: PE	B3B4	BP Pharmingen
anti-FcγRIIb	2.4G2	BP Pharmingen/ DRFZ
anti-IgD: Alexa546/Cy5	11.26c	DRFZ
anti-IgM: Alexa546/Cy5	M41	DRFZ
anti-Icam-1	KAT-1	DRFZ
anti-Madcam-1	MECA-367	BD Pharmingen
anti-Vcam-1	429	BD Pharmingen
FDC-M2: BIO	M2	Immunokontakt
FDC-M2: Alexa546	M2	M. Kosco-Vilbois
MOMA-1: BIO (anti-CD169)	MOMA-1	BMA Biomedicals AG
PNA: FITC/Rhodamin/BIO	-	Vector
9F1: DIG (anti-CD147)	9F1	DRFZ
Ratten-IgG	-	Sigma

Sekundärantikörper/-reagenz	Klon	Herkunft
Streptavidin: Alexa488/Rhodamin/Alexa647	-	Molecular Probes
Streptavidin: POD/AP	-	Sigma

anti-DIG:POD/AP	polyklonal	Roche
anti-DIG:Alexa488/Alexa546/Cy5	polyklonal	Roche
anti-FITC:POD	polyklonal	Roche
anti-Ratte:Alexa647	polyklonal	Invitrogen
anti-Kaninchen:Rhodamin	polyklonal	Invitrogen

2.1.5 Primer

Alle verwendeten Primer waren Auftrags-synthesen bei TIB Molbiol (Berlin). Die angegebenen Primersequenzen sind in 5' → 3' -Richtung aufgelistet.

Primer für *in situ*-Sonden (1) und semi-quantitativer PCR (2)

Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
Cilp ⁽¹⁾⁽²⁾	gAgCAAgCTTgTgCTgAggAACCTg	ggTCTTCACCAATCACCTCTCCC
Coch ⁽²⁾	TgCAgCTgCCCATgATgCAgg	ATgCCTCTgATgACgTCAGAgAC
Coch ⁽¹⁾	TTgTCTCTgACgTCATCAgAggC	TAgTCCTCggAgTACATgCCTgTC
CXCL13 ⁽¹⁾⁽²⁾	gAgggAATTCTCAAgCTCCgTTgC	CCTCAgCTTAAAgTCCAggCTC
Enpp2 ⁽²⁾	Enpp2 ⁽¹⁾ 5'-Primer	CCAggCCCAGgAAgTTAAATCTCg
Enpp2 ⁽¹⁾	ggAAggCAgCTCTATTCTgTCCC	ACAggACTACACgTggTgACTggg
Htra1 ⁽¹⁾⁽²⁾	ggATCCgAATgATgTCgCTCAC	ggAACAgCCCAAgCTTgTAAgg
LPa1 ⁽²⁾	TAggCggAgATCCAgTTAgCAgg	gAACAgTTgTTgggCTgCCTCAg
Lrat ⁽²⁾	gCgTCCTgACCCACAggTCgAg	CATgTCCTTAgAAAggAgCACACC
Lrat II ⁽¹⁾	Lrat ⁽²⁾ 5'-Primer	TCTCTgCCCATAA <u>gCTTCTT</u> ATCC
Lrat ⁽¹⁾	CAACA <u>AgCTTCTCCT</u> CCTgggAgTC	TggCTTACATggCAAgCACgTgg
Ltbp3 ⁽¹⁾⁽²⁾	ggggAAgCTTCCgCgAgACgAAgAC	TTTACATCCTgggTCCCAgCTCAg
No69 ⁽²⁾	CTgCCCTTCgTCTTgCTTgCAAgg	TAAgAACAAACCCAgTggCCTggg
No69 ⁽¹⁾	ggACCACAgAggATgTCTCCCTC	No69 ⁽²⁾ 3'-Primer
No69II ⁽¹⁾	GAGAAGAAGCTTTCACCAGCCACC	GTGATGGCGGCGATGCTGCCTG
No77 ⁽²⁾	TgTATggAgAgATgCgggACTCTg	TgCgTCCAACACTCCCTCCTCTg
Postn ⁽²⁾	AgggTTCAAaggCCTAgAAgACg	Postn ⁽¹⁾ 3'-Primer
Postn ⁽¹⁾	AAgAA <u>AgCTTCA</u> gggAgACACACCTgC	gCAggAAACCCACATTgCATgAg
Serpina1 ⁽²⁾	CCTgAAgCTTgTggAgAAgTTTCTg	gggAgCATTCTCCTCTgTgATTCC
β-actin ⁽²⁾	gACAggAtgCAgAAggAgATCACT	TgATCCACATCTgCTggAAggT

CCL19 ⁽¹⁾⁽²⁾	gCACACACA <u>AAgCTT</u> ACTTgCACTTggC	ggCTCCTTCTggTgCTgTTgC
CCL21 ⁽¹⁾⁽²⁾	CCTCAACTCAACCACA <u>AAgCTT</u> ggCTCAg	CCTCTTgAgggCTgTgTCTgTTCAg

Primer für V_H-Gene

Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
J558	A(A/g)gCCTggg(A/g)CTTCAgTgAAg	
X24	Ag(A/T)CTggAggTggCTTggTgC	
Gam3	ggAgAgACAgTCAAATCTCC	
VH1	CAgCTgCAgCAgTC(A/T)ggACCTG	
VH3	CTggTggAgTCTG(A/g)(A/g)ggAggC	
IgG1		gATCCAggggCCAgTggATAg
IgG2a/b		CAC(g/T)CAggggCC AgTggATAg
IgM		ggC TCT CgC Agg AgA CgA gg

Primer für Vektoren

Bezeichnung	5'-Primer	3'-Primer
pSPT18/19	gTCTgCTTCAgTAAgCCAgATgC	CgATAAgCCAgCTgggCCTCg
+40	CAggAAACAgCTATgAC	

2.1.6 Geräte

Veritas Mikrodisektionsgerät	Arcturus
Thermozykler	Biometra
Mikroskope Axiophot	Zeiss
Flachbettapparaturen für Agarosegele	Biorad
Vakuumzentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf

2.1.7 Software

MS-Excel	Microsoft
Veritas Operating Software v2.3.2.2	Arcturus
ABI Sequence Analysis	Perkin Elmer Applied Biosystems

MetaView	Metaview
Microarray Suite v5.0	Affymetrix
Photoshop CS	Adobe

2.2 Präparation von Mäusen und Gewebe

2.2.1 Immunisierung

Mäuse wurden immunisiert durch einmalige intraperitonealer Injektion von 100 µg Aluminiumkaliumsulfat-präzipitiertem 2-Phenyloxazon, gekoppelt an CSA (engl. *chicken serum albumin*, Hühnerserumalbumin)⁶³.

2.2.2 Präparation des Milzgewebes

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Milz entnommen. Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurde die Milz in Gefrierschalen (Cryomolds, Tissue-Tek), gefüllt mit Einbettmedium O.C.T. (Tissue-Tek), überführt und auf Trockeneis schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.3 Herstellung von Gefrierschnitten der Milz

Die optimale Schneidetemperatur des Kryostaten HM-50-OM (Microm) lag zwischen -16°C und -20°C. Gefrierschnitte mit einer Dicke von 8 µm wurden auf SuperfrostPlus-Objektträger (Roth) aufgenommen, für 5 bis 10 min bei 50°C getrocknet, 10 min in Aceton fixiert, luftgetrocknet und mit Kalziumchlorid bei -20°C gelagert.

Für *in situ*-Hybridisierung und Laser-unterstützter Mikrodisektion wurde zum Schutz der RNA das geschnittene Gewebe auf vorgekühlte Objektträger aufgenommen und unverzüglich auf Trockeneis zwischengelagert. Die Gefrierschnitte wurden anschließend mit Kalziumchlorid bei -80°C gelagert. Stichprobenmäßig wurde von neu angefertigten Gefrierschnitten die RNA-Integrität bestimmt (Abschnitt 2.4.2)

2.2.4 Herstellung einer Zellsuspension der Milz

Für die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Abschnitt 2.6) wurde aus der Milz eine Einzelzellsuspension hergestellt. Zur Schonung der Milzzellen wurden alle folgenden Schritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

Die frisch-entnommene Milz wurde in FACS-Puffer gelegt, halbiert und das Parachym aus der bindegewebshaltigen Kapsel geschabt. Das Gewebe wurde mit einem Stößel durch ein Zellsieb (Maschengröße 70 µm) gedrückt und das Zellsieb anschließend mit 20 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 1300 rpm für 8 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer resuspendiert und 2 min inkubiert. Zur Entfernung von Agglutinaten wurde die Zellsuspension wiederholt über ein Zellsieb gegeben, zügig mit 20 ml FACS-Puffer gewaschen und auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden mit 1300 rpm für 8 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.5 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus der Calvaria

Die Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus der Calvaria basiert auf den adhärenen Eigenschaften dieser Zellen in Kontrast zu den mitisolierten Zellen.

Präpariert wurden 6 neonatalen Mäuse im Alter von 3 Tage. Nach der Tötung wurde die Schädeldecke (Calvaria) entnommen, kurz in Ethanol (70%) desinfiziert, in PBS gewaschen und mit 0,1% Collagenase (Sigma-Aldrich) und 0,2% Dispase (Roche) in Kulturmedium (ohne Antibiotika) verdaut. Der Verdau wurde bei 37°C für 10 min geschüttelt, der Überstand entnommen und auf Eis platziert. Der Schritt wurde drei Mal wiederholt.

Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in 1 ml Kulturmedium resuspendiert, in 6-Loch-Platten verteilt, mit 3 ml Kulturmedium aufgefüllt und inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in PBS gewaschen: Trypsinierung mit 1 ml 1xTrypsin (PAN biotech) für 10-15 min bei 37°C, gesammelt in PBS, zentrifugiert, resuspendiert und in einer Zellkulturschale (Ø10 cm) mit 10 ml Kulturmedium für 2 Tage kultiviert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 5 min bei 1200 UpM. Inkubiert wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂.

2.3 Immunhistologie

Die Gefrierschnitte wurden etwa 5 min bei RT aufgetaut und das Gewebe mit einem Fettstift umrandet. Unspezifische Bindungen wurden mit einer 3%igen PBS-Lösung bei RT blockiert. Das Gewebe wurde mit Primärantikörpern für 60 min bei RT inkubiert und anschließend 3 Mal á 5 min gewaschen. Bei der Verwendung von ungekoppelten Primärantikörpern wurden die Gewebsschnitte mit Sekundärantikörper bzw. -reagenzien für 30 min bei RT inkubiert und 3 Mal á 5 min gewaschen. Antikörper und Sekundärreagenzien wurden mit einer Endkonzentration von 0,25-0,5 µg verdünnt in 100 µl PBS/0.5% BSA benutzt. Für die Analyse der Gewebsschnitte mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Reagenzien wurde die Schnitte nach dem Waschen mit FluoromountG (Southern Biotech) überschichtet und mit Deckgläsern blasenfrei eingedeckt.

Bei der Substratfärbung werden Antikörper und Reagenzien verwendet, die entweder mit einer Alkalischen Phosphatase oder einer Peroxidase gekoppelt sind. Für die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase wahlweise FastRed (Sigma) oder BCIP/NBT (Promega) benutzt. Das Substrat für die Peroxidase ist DAB (Sigma). Da das Substrat der Peroxidase die Alkalische Phosphatase zerstört, wurde bei Doppelfärbung erst die Phosphatase und anschließend die Peroxidase detektiert. Nach dem Waschen mit Aqua dest. wurde das Gewebe wahlweise mit Hämatoxylin (DAKO) gegengefärbt mit Kaiser's Gelatine überschichtet und mit Deckgläsern übergedeckt.

2.4 Molekularbiologie

2.4.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA müssen Laborbedarf, Geräte und Oberflächen von RNase befreit sein (RNase AWAY).

Zur Gewinnung einer Milz-cDNA-Bibliothek wurde die RNA einer Milz mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Marchery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die

RNA wurde in 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration mit dem Spektrometer Nanodrop ND-1000 (WiTec) bestimmt.

Für die Isolierung von RNA aus FACS-sortierten und mikrodisezierten Zellen wurde das PicoPure RNA Isolation Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die RNA wurde mit 13 µl Elutionspuffer eluiert. Dieses Kit erlaubt aufgrund eines erneuerten Verfahrens die Isolierung der RNA aus weniger als 10 Zellen. Die RNA wurde weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.4.2 Analyse der RNA-Integrität

Der Agilent 2100 Bioanalyzer ist ein Fluidics-basierendes Gerät zur Analyse von Nukleinsäure, aber auch von Proteinen und Zellen. Die sogenannte *Lab-on-a-Chip* - Methode (engl., Labor auf einem Chip) ermöglicht Elektrophoresen, chromatographische Auftrennungen, Färbungen und Detektion auf einzelnen integrierten Systemen. Das hier benutzte System ist ein Mikrochip, der ein untereinander verbundenes Kanalsystem, gefüllt mit einer Matrix und Puffer, beinhaltet (RNA 6000 Nano Reagents and Supply Kit, Agilent). Die RNA wird detektiert und in Agarosegel-Abbilder und Elektropherogramme übersetzt. Die Analyse der RNA wird repräsentative über die Qualität und Integrität der ribosomalen RNA 18S und 28S getroffen.

Zur Analyse der RNA wurden etwa 100 ng Probe für 2 min bei 70°C erhitzt, auf einen Mikrochip gegeben und mit dem Agilent Bioanalyzer analysiert.

2.4.3 Reverse Transkription

Bei einer Reversen Transkription (RT) wird RNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in komplementäre DNA (cDNA, engl.: *complementary DNA*) umgeschrieben.

Die Herstellung einer Milz-cDNA-Bibliothek wurde mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen) und Oligo(24-mer)-dT-Primern durchgeführt. Der Ansatz für die Reaktion ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Reaktion lief 60-75 min bei 37°C in einem Thermozykler. Die Reverse Transkriptase wurde für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung eines RT-Ansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
RNA	≤ 2 µg
Primer (10 µM)	2 µl
dNTP	2 µl
10 x RT-Puffer	2 µl
Enzym	1 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,4 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt	

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit dem AmpliTaq Gold Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2 dargestellt. Das PCR-Programm umfasste nach der Aktivierung der Polymerase (5 min, 95°C) 25-40 Zyklen mit 95°C für 30 s, 63-65°C für 30 s und 72°C für 30 s, sowie abschließend 72°C für 10 min und Abkühlung auf 4°C. Die Amplifikation wurde in einem Thermozykler durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels einer präparativen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Tabelle 2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
DNA	50 – 200 ng
Primer (10 µM)	0,5 µl
dNTP	2,5 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
Enzym	0,4 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt	

2.4.5 OneStep RT-PCR: Amplifikation von V_H-Genen

Die Reverse Transkription und Amplifikation der V-Gene von dissektierten Keimzentren wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Dieses Kit ermöglicht eine Primer-spezifische Transkription von RNA mit anschließender Amplifikation in einem Reaktionsansatz.

Die Zusammensetzung eines OneStep RT-PCR-Ansatzes ist dargestellt in Tabelle 3. Zur optimalen Abdeckung des V_H-Gen-Repertoires wurden folgende Primer verwendet: J558, X24, Gam3, VH1, VH3, IgG1, IgG2a/b und IgM. Das PCR-Programm umfasste die Transkriptionsphase von 50°C für 60 min und folgender Denaturierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Polymerase (15 min, 95°C). Die Amplifikation umfasste 45 Zyklen mit 95°C für 30 s, 63-65°C für 30 s und 72°C für 30 s, sowie abschließend 72°C für 10 min und Abkühlung auf 4°C. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einer präparativen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines OneStep RT-PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
RNA	10-200 ng
Primer (10 µM)	je 1 µl
dNTP	2 µl
5 x OneStep-Puffer	10 µl
Enzym-Mix	2 µl
Q-Solution	10 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt	

2.4.6 *Screening-PCR*

Bei einer *Screening-PCR* (engl., Überprüfungs-PCR) werden transformierte Vektoren auf klonierte Fragmente unter Verwendung der PCR-Technik überprüft.

Hierzu wurde Zellmaterial einer Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze in 20 µl Wasser überführt. Durch die hohe Denaturierungstemperatur wurden die Zellen lysiert, der Vektor freigesetzt und mit den Primerpaar pSPT18/19 amplifiziert (AmpliTaQ Gold Kit, Applied Biosystems).

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 4 dargestellt. Das PCR-Programm umfasste nach der initialer Inkubation (10 min, 95°C) 45 Zyklen mit 95°C für 30 s, 63°C für 30 s und 72°C für 30-45 s, sowie abschließend 72°C für 10 min und Abkühlung auf 4°C. Die Amplifikation wurde in einem Thermozykler durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einer analytischen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Bakterienklone, die ein Fragment mit gewünschter Länge aufwiesen, wurden sequenziert.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines Screening-PCR-Ansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
Bakterien in Aqua dest.	20 µl
Primer (10 µM)	je 0,5 µl
dNTP	2,5 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
Enzym	0,1 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt	

2.4.7 *LightCycler: Quantitative Polymerase-Kettenreaktion*

Um Variationen in der Ausgangsmenge der cDNA verschiedener Proben auszugleichen, wurde eine quantitative PCR zur Normierung verwendet. Die quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen

durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Am Ende der PCR-Zyklen wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale proportional die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

Die Analyse wurde mit dem LightCycler-System durchgeführt. Die Zusammensetzung eines LightCycler-Ansatzes (LightCycler Fast Start SYBR Green Kit, Roche) ist in Tabelle 5 dargestellt. Amplifiziert wurde das ubiquitär exprimierte Gene β -Actin mit den Primerpaar β -Actin. Das PCR-Programm umfasste nach der Aktivierung der Polymerase (95°C für 10 min) 36 Zyklen mit 95°C für 5 s, 64°C für 5 s und 72°C für 9 s, sowie einer abschließende Schmelzphase (95°C für 10 s, 64°C für 20 s, 72°C für 10s, 40°C für 10 s). Die Amplifikation wurde in einer LightCycler 1.5-Apparatur (Roche) durchgeführt.

Um die Konzentration der cDNA verschiedener Zelltypen zu standardisieren, wurden die Ausgangsmengen der Probe untereinander angeglichen. Anschließend wurde eine PCR (Abschnitt 2.4.4) für Gene von Interesse durchgeführt (semi-quantitative PCR).

Tabelle 5: Zusammensetzung eines LightCycler-Ansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
cDNA	50 – 200 ng
Primer (10 μ M)	je 0,5 μ l
dNTP	2 μ l
MgCl ₂	2 μ l
Enzym/Puffer-Mix	1 μ l
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 μ l aufgefüllt	

2.4.8 Agarosegelelektrophorese

Für ein Agarosegel wurden je nach Fragmentgröße 1-2% Agarose mit 5 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) in 100 ml TBE-Puffer gelöst. Für analytische Zwecke wurde Standardagarose (Appligene Oncore) und für präparative Zwecke eine Spezialagarose mit niedriger Schmelztemperatur (NuSieve GTG, Cambrex) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in TBE-Puffer mit horizontalen Flachbettapparaturen. Die Proben wurden vor

dem Auftragen auf das Gel mit 10% DNA-Ladepuffer versehen. Aus präparativen Gelen wurde die gewünschte Bande mit Einweg-Minilanzetten ausgeschnitten.

2.4.9 DNA-Gelextraktion

Aus den ausgeschnittenen Agarosestücken wurde die aufgetrennte DNA unter Verwendung des NucleoSpin Gelextraction Kits (Marchery-Nagel) präpariert. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Wenn nicht anders erwähnt, wurde die DNA in 30 µl Elutionspuffer eluiert.

2.4.10 TOPO TA-Klonierung

Die Klonierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Dieser Kit nutzt die Eigenschaft des Ligierens der Topoisomerase I, die das Schneiden und Religieren einer DNA während der Replikation katalysiert. Hierzu sind Topoisomerasen kovalent an den 3'-Phosphat-Enden eines linearisierten TOPO Vektors gebunden.

Das bei der Ligation eingesetzte Volumen (0.5 - 2µl) an DNA war von der DNA-Konzentration bzw. der Bandenstärke in der Gelelektrophorese abhängig. Die Ligationsansätze enthielten neben der DNA jeweils 0.3-0.5 µl pCR2.1 TOPO Vektor und 1 µl Salt Solution. Mit Wasser wurde das Volumen der Ansätze einheitlich auf 6 µl eingestellt. Die Ligation erfolgte durch 7-minütige Inkubation der Ansätze bei RT. 5 µl Ansatz wurde in kompetente Bakterienzellen vom Stamm E. coli TOP10F' (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) transformiert.

2.4.11 Transformation

Für die Amplifikation der klonierten Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterienzellen mit einem entsprechenden Volumen Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte die Inkubation der Ansätze für genau 30 s bei 42° C (Hitzeschock) und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Zu den Zellen wurden 70 µl SOC- Medium (TOPO TA

Cloning Kit) gegeben und die Kulturen für 60 min bei 37° C und 200 UpM geschüttelt. 40 µl Transformationsansatz wurden auf Nähragar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Auswahl transformierter Bakterienklone mit integriertem Fragment wird bei Verwendung des TOPO TA Cloning Kits durch Blau-Weiß-Färbung der Bakterienkolonien (engl.: *blue white screening*) getroffen. Dazu enthält der Agar zusätzlich 64 µg/ml Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 50 µg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal). Positive Bakterienklone wurden von der Agarplatte isoliert und in 2 ml flüssiger Nährlösung über Nacht bei 37°C und 200 UpM vermehrt.

2.4.12 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA der 2ml-Übernachtskulturen wurde unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits (Marchery-Nagel) isoliert. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer eluiert.

2.4.13 Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion wurden mit dem ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Das System bedient sich der klassischen, enzymatischen Methode nach Sanger⁶⁴ unter Verwendung einer Taq-Polymerase. In einer linearen PCR-Reaktion wird die Kettenverlängerung jeweils durch Einbau eines Farbstoff-markierten Dideoxynukleotide (ddNTPs) angehalten.

Die Zusammensetzung eines Sequenzierungsansatzes ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Amplifikation umfasste 25-30 Zyklen mit 96°C für 10 s, 45°C für 5 s und 60°C für 4 min, sowie Abkühlung auf 4°C in einem Thermozykler. Für die Sequenzierung klonierter Fragmente im TOPO-Vektor wurde der Primer +40 bzw. klonierter Fragmente im pSPT-Vektor der 5'-Primer pSPT18/19 verwendet.

Die DNA-Amplifikate wurden durch Ethanol-Fällung wie folgt gereinigt: zu der Reaktion wurden 80 µl Aqua bidest., 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 4.6 und 250 µl Ethanol (absolut)

gegeben, gevortext und 18 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 350 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut für 10 min bei 11000 x g zentrifugiert und anschließend bei 50°C getrocknet und in 20 µl Aqua dest. aufgenommen.

Die Sequenzierung der Ansätze erfolgte mit einem ABI Prism Sequencer 310-Gerät (Applied Biosystems). Dabei wurden die Fragmente unterschiedlicher Länge in einem Polymer POP-6 (Applied Biosystems) gelektrophoretisch aufgetrennt, die Fluorochrome mit einem Argonlaser detektiert und in Elektropherogramme übersetzt.

Tabelle 6: Zusammensetzung eines Sequenzierungsansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
DNA	200-400 ng
Primer (10 µM)	1 µl
Big Dye	2 µl
5 x Sequenzierungspuffer	2 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt	

2.4.14 Sequenzanalyse

Die erhaltenen V-Gen-Sequenzen wurden mit Hilfe des DNA-Plot-Programms mit publizierten murinen Keimbahnsequenzen der V-BASE2 (<http://www.vbase2.org>) verglichen. Das Keimbahngen mit der höchsten Homologie wurde identifiziert und zur Bestimmung der somatischen Mutationen als Referenzsequenz verwendet.

Die Sequenzen von Genen, die nicht zu den V-Genen gehören, wurden mit der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) auf Richtigkeit kontrolliert.

2.4.15 Konservierung von Bakterienkulturen

Um Transformationen für spätere Amplifikationen von PCR-Matrizen zu umgehen, wurden Bakterienklone nach Überprüfung der Sequenz eingefroren. Dazu wurde eine 0,5 ml Übernachtskultur zu 0,5 ml Glycerin (Sigma) gegeben, kurz gevortext und auf

Trockeneis schockgefroren. Die konservierten Bakterien bleiben bei -70°C mindestens 2 Jahre vital.

Bei Bedarf wurde etwas gefrorenes Zellmaterial mit einer Pipettenspitze genommen und auf Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht, wurden Übernachtskulturen angesetzt (Abschnitt 2.4.11) und Plasmid-DNA präpariert (Abschnitt 2.4.12).

2.5 Laser-unterstützte Mikrodisektion

Die Technik der Laser-unterstützten Mikrodisektion wurde Mitte der neunziger Jahre entwickelt und ist eine mikroskopische Technik zur Laser-gestützten Mikrodisektion von Geweben und Zellen. Die selektive Auswahl von Zelltypen kann aufgrund von spezifischen morphologischen Kriterien oder histologischen Färbungen von Gewebsschnitten erfolgen. Ein großer Vorteil von LCM ist die Auswahl von Zellen unter direkter mikroskopischer Kontrolle.

Ein System der Laser-unterstützten Mikrodisektion ist die „Laser Capture Microdissection“ (LCM, engl., Laser-unterstützte Mikrodisektion durch Einfangen) der Firma Arcturus. Bei dem LCM wird ein Adapter, bespannt mit einer thermoplastische Membran (Cap), von einem Infrarot-Laser geschmolzen. Dabei verschmilzt die inerte Membran mit dem Gewebsausschnitt und kann im darauffolgenden Schritt entfernt werden. Durch die Verwendung von energieärmerer Infrarot- im Gegensatz zu ultravioletter Strahlung, werden Zellen und Gewebe schonender behandelt. Ein großer Vorteil für den Anschluss von empfindlichen Experimenten. Der Hersteller bietet zwei Größen von Caps an: CapSure HS Caps (Arcturus) für Einzelzellen und kleine Zellverbände und CapSure Macro Caps (Arcturus) für große Zellverbände und Gewebsabschnitte.

2.5.1 Immunhistologie für Mikrodissektion

Alle Schritte zur Vorbereitung des Gewebes für das LCM mussten zum Erhalt der RNA-Integrität sehr schnell durchgeführt werden. Desweiteren mussten Laborbedarf, Geräte und Oberflächen frei von RNasen sein (RNase AWAY).

Die Gefrierschnitte (Abschnitt 2.2.3) wurden dem -80°C Gefrierschrank entnommen, auf dem Handrücken aufgetaut und in 75% Ethanol für 30 s fixiert. Die Gewebsschnitte wurden 2 Mal á 5 s mit je 100 µl RNase-freiem Puffersystem (Puffer A und B, HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit, Arcturus) gewaschen und mit dem Fluoreszenzmarkierten Antikörper bei 4°C inkubiert. Das Gewebe wurde in einer Ethanolreihe (75% → 95% → absolut) für jeweils 30 s und Xylol für 5 min dehydriert. Zellen des dehydrierten Gewebes wurden innerhalb der nächsten 3 Stunden (maximal) mit dem LCM isoliert.

Zur Visualisierung wurde das Gewebe wie folgt inkubiert: Keimzentren der Lrat/- - Milzen mit PNA-Rhodamine (20 µg/ml) für 3 min, stromale Zellen der SCID-Milzen mit anti-BP3:Alexa488 (20 µg/ml) für 3 min und FDC der BALB/c-Milz mit anti-CD21:Alexa488 (20 µg/ml) für 90 s. Zur Identifizierung von Sekundärfollikel immunisierter BALB/c wurden konsekutive Gefrierschnitte mit anti-CD21:Alexa488 und PNA-Rhodamine gefärbt (Abschnitt 2.3).

Vor der Mikrodissektion neu-präparierter Gefrierschnitte, wurde die Qualität und Integrität der RNA überprüft. Dazu wurde ein Gefrierschnitt vom Objektträger gelöst, die RNA isoliert (Abschnitt 2.4.1) und analysiert (Abschnitt 2.4.2).

2.5.2 Isolierung der Zellen durch Mikrodissektion

Die Stärke des Lasers und der damit verbundenen Querschnitt des Lasers (Spot) musste aufgrund des Gewebeszustandes individuell bestimmt werden. Bei einer durchschnittlichen Laserenergie von 50-60 mW (*Power*), 1500-2000 µsec (*Pulse*) und 200 mV (*Intensity*) lag die Spotgröße bei 10-15 µm. Für die Mikrodissektion wurde eine Überlagerung der Spots von 40% gewählt.

Für die Mikrodissektion von Stromalen Zellen wurden Marco Caps verwendet. Die dissektierte Gesamtfläche betrug für jede Probe etwa 1 mm². War die dissektierte Fläche

kleiner, wurden Caps bei anschließender RNA-Isolierung entsprechend vereint. Für die Mikrodisektion von Keimzentren wurde ein Keimzentrum pro HS Cap isoliert.

Das Cap wurde auf ein mit 50 µl XB-Puffer (PicoPure RNA Isolation Kit) gefüllten Reaktionsgefäß befestigt und kopfüber bis zur Beendigung der Mikrodisektion aufbewahrt. Nach erfolgter Mikrodisektion wurde das Restgewebe mit 50 µl XB-Puffer (PicoPure RNA Isolation Kit) herunter gelöst und in eine Reaktionsgefäß überführt. Diese Probe diente zur Bestimmung der RNA-Integrität dieses Gewebes nach Färbung und Fixierung.

2.6 Sortierung von Zellen aus Zellsuspensionen

2.6.1 Zellanreicherung mittels MACS

Die MACS-Technik (engl.: *magnetic associated cell sorting*, Magnet-assoziierte Zellsortierung) dient der Aufreinigung bzw. Anreicherung von Zellpopulationen. Dabei werden Antikörper-markierte Zellen mit Hilfe von magnetischen Partikeln (engl.: Microbeads) separiert. Die Zellsuspension wird über eine mit Stahlwolle gefüllte Säule gegeben, die von einem Dauermagneten umgeben ist. Antikörper-markierte Zellen werden über Wechselwirkungen zwischen Microbeads und Dauermagnet in der Stahlwolle zurückgehalten, während unmarkierte Zellen durchfließen.

Zur Anreicherung von B-Zellen aus einer Zellsuspension der Milz (Abschnitt 2.2.4) wurden zuerst unspezifische Bindungen der Zellen mit anti-FcγRII und Ratten-IgG für 10 min auf Eis gesättigt. Anschließend wurden anti-B220:Bio zugesetzt und die Zellen für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FACS-Puffer gestoppt und bei 11000 x g für 4 min zentrifugiert. Die Zellen wurden unter Zugabe von 100 µl anti-Bio-Microbeads (Miltinyi) in 900 µl FACS-Puffer. Alle weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden über eine LS MACS-Säule (Miltinyi) gegeben. Nach der Separation wurden die B-Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.6.2 Zellsortierung mittels FACS

Für FACS-Messungen (engl., *fluorescence activated cell sort*, Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie) werden Zellen einer Zellsuspension mit Antikörpern wahlweise gegen Oberflächenmarker oder intrazelluläre Proteine markiert. Die Antikörper sind an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, die im FACS-Gerät mit einem Laser angeregt werden. Die einzelnen Zellen werden anhand der Lichteinstreueigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung charakterisiert.

Für die FACS-Zellsortierung wurden die angereicherten B-Zellen (Abschnitt 2.6.1) für 20 min auf Eis mit anti-CD21:FITC, anti-CD23:PE und SA:APC für folliculäre B-Zellen der nicht-immunisierten Mäuse bzw. PNA-FITC und SA-APC für Keimzentrums-B-Zellen der immunisierten Mäuse inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FACS-Puffer gestoppt und bei 11000 x g für 4 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und von einem FACS-Gerät (FACSAria, Beckton Dickinson) sortiert. Propidiumjodid (Sigma) 5 µl (1 mg/ml) wurde verwendet, um tote Zellen zu kennzeichnen, die ausgeschlossen wurden.

Aus den Zellsuspensionen wurden jeweils folliculäre B-Zellen (B220+, CD21schwach, CD23+) bzw. Keimzentrums-B-Zellen (B220+, PNA^{stark}) durch Ablenkung des Flüssigkeitsstrahls im FACS-Gerät jeweils in separate Gefäße sortiert. Etwa 10⁵ Zellen wurden pro Gefäß sortiert.

Für die Isolierung von hämatopoietischen Zellpopulationen wurden eine Einzelzellsuspension der Milz mit anti-CD3:PE, anti-B220:Alexa405, anti-CD11b:FITC und anti-CD11c gefärbt und T- und B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen sortiert.

Sortierte Zellen wurden bei 11000 x g für 4 min zentrifugiert und für die anschließende Isolierung der RNA in 50 µl XB-Puffer (PicoPure RNA Isolation Kit) aufgenommen.

2.7 DNA-Microarray

DNA-Microarray (engl., Kleinstanordnung) ist ein Glasträger, auf dem kurze Genabschnitten aufgebracht sind. Die Hybridisierung linear amplifizierter und Fluoreszenz-markierter RNA auf einen DNA-Microarray ermöglicht eine schnelle und simultane Expressionsanalyse von Tausenden von Genen eines Zelltypus oder Gewebe.

Von der hybridisieren RNA wird das Fluoreszenzsignal des DNA-Microarrays mittels eines Lasers ausgelesen und die reine Intensität normalisiert, um z.B. Abbaueffekten verschieden guter Extraktionen zu berücksichtigen. Die Normalisierung von Signalen ist dabei eine hochkomplexe bioinformatische Angelegenheit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden industriell gefertigte DNA-Microarrays der Firma Affymetrix eingesetzt. Diese Arrays werden mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens (schichtweise Aufbringung von lichtgesteuerten chemischen Synthesen) hergestellt. Für jedes Gen sind 11 bis 20 "Messpaare", die aus je 25-mer Oligonukleotiden bestehen, auf den Microarray abgebildet. Somit werden durchschnittlich ein Genabschnitt von 200-300 Nukleotiden gedeckt. Der verwendete Mikroarray-Typ GeneChip Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix) besitzt eine Datenmenge von mehr als 45.000 Genen.

2.7.1 Lineare Amplifikation und Markierung der RNA

Die lineare Amplifikation und Markierung der isolierten RNA erfolgte in zwei Syntheserunden. Eingesetzt wurde die RNA von etwa 0,8-1 mm² dissektiertem Zellgewebe (Abschnitt 2.5) bzw. 20.000 FACS-isolierten B-Zellen (Abschnitt 2.6).

In der ersten Runde wurde die isolierte RNA (Abschnitt 2.4.1) mit dem hochempfindlichen RiboAmp OA RNA Amplification Kit (Arcturus) amplifiziert. Durch eine verbesserte Effizienz wird RNA bis zu 1000-fach in einer einzigen Runde mit einer hohen Genauigkeit amplifiziert. In der zweiten Runde wurde die RNA mit dem GeneChip 3' Amplification for IVT Labeling Kit (inklusive GeneChip Sample Clean-up Module, Affymetrix) markiert. 15 µg der amplifizierten und markierten RNA wurden fragmentiert (GeneChip Sample Clean-up Module). Die Amplifikation, Markierung und

Fragmentierung erfolgten nach den Protokollen der Hersteller. Die Qualität der amplifizierten RNA wurde mit dem Bioanalyzer (Abschnitt 2.4.2) überprüft.

2.7.2 Hybridisierung eines DNA-Microarrays

Die Hybridisierung der 15 µg fragmentierten RNA wurde unter Verwendung des GeneChip Hybridization Control Kits (Affymetrix), des Hybridisierungsofens GeneChip 640 (Affymetrix) und einer Fluidics Station (Affymetrix) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die hybridisierten Microarray wurden mit dem GeneArray Scanner 3000 (Affymetrix) analysiert.

2.7.3 Datenanalyse

Nach dem Scannen wurden die Daten mit der Software GCOS 1.1 (Affymetrix) verarbeitet, normalisiert, archiviert und die Microarrays untereinander verglichen. Hierfür wurden alle Parameter laut Voreinstellung übernommen und der TGT-Wert (engl., *target signal intensity*, Soll-Signalintensität) jedes Microarrays auf 100 gesetzt. Die erhaltenen Daten wurden als Excel-Tabelle exportiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software MS-Excel und die Clusteranalyse mit Gene@Work⁶⁵. Eine Clusteranalyse ist eine multivariante Statistik und dient der Auswertung und Visualisierung signifikanter Gene, dargestellt in einem Dendrogramm.

Für die Analyse der Ontologie der Gene wurde die funktionelle Annotations-Datenbank DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) benutzt.

Die GCOS-Software ermittelt folgende Daten:

Scale Factor: Die GCOS-Software normalisiert Microarrays durch Skalierung aller Algorithmen zu einem Wert, ausgedrückt durch den *Scale Factor* (Skalierungsfaktor). Falls die Werte des Scale Factor zwischen Microarrays stark variiert, ist das ein Indikator, dass Probleme beim Vergleichen von Microarrays auftreten können.

Present Call: Aufgrund von Algorithmen misst die Software für jedes Gen auf dem Microarray, ob ein RNA-Transkript verlässlich in der Probe detektiert wurde. Die

Anzahl der *Present Calls* (engl., vorliegendes Signal) ist ein Maß der Gesamtqualität. Große Varianzen zwischen ähnlichen Proben sind Anzeichen von Problemen.

Signal Present: Bei *Signal Present* (vorliegendes Signal) handelt es sich um die durchschnittliche Signalstärke der Present Calls und sollte aufgrund der Normalverteilung wenig Varianz zwischen zu vergleichenden Proben besitzen.

3'/5' GAPDH: Probleme bei der RNA-Amplifikation und RNA-Degradation kann zur Unterrepräsentation des 5'-Endes bei Sonden führen. Affymetrix konzipierten einen Satz von Proben, die entweder am 3'- oder 5'-Ende liegen. Der 3'/5'-Quotient von dem ubiquitär exprimierten Gen *gabdh* (3'/5' GAPDH) gibt Auskunft über Qualität und Amplifikation der RNA.

Background: Der Hintergrund (engl: *Background*) wird über Signalintensität gemessen, die durch Autofluoreszenz der Microarray-Oberfläche und unspezifischen Bindungen von Sonden und Färbemolekülen verursacht wird.

Signalstärke: Das Maß für die Abundanz eines jeden Transkripts wird als Signalstärke (engl.: *Signal*) angegeben.

Detektion: Über die Detektion (engl.: *Detection*) wird festgelegt, ob die Expression eines Transkripts vorliegt (engl: *present*, P), marginal (M) oder abwesend (A) ist.

Signal Log Ratio: Der Signal Log Ratio- (logarithmischer Quotient der Signale) Algorithmus misst die Größenordnung und Richtung eines veränderten Transkriptniveaus von verglichenen Microarrays.

Change Call: Die Angabe des *Change call* (Veränderungsstärke) in den Transkriptniveaus zwischen zwei Microarrays erfolgt als Anstieg (*increase*, I), marginaler Anstieg (*marginal increase*, MI), Unverändert (*no change*, NC), marginale Abnahme (*marginal decrease*, MD) und Abnahme (*decrease*, D).

Change p-Value: Die Signifikanz des *Change Call* wird statistisch als *Change p-value* (p-Wert der Veränderung) ermittelt.

2.8 *in situ*-Hybridisierung

2.8.1 Klonierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungssonden sind nicht-radioaktiv-markierte RNA-Sonden. Für die Herstellung von RNA-Sonden wurden die gewünschten Genabschnitte mittels PCR (Abschnitt 2.4.4) aus einer Milz-cDNA-Bibliothek (Abschnitt 2.4.1) amplifiziert. Beim Fehlen einer HindIII-Restriktionsstelle im Fragment wurde diese durch Basenaustausch in der Primersequenz eingefügt. Die Einfügung einer EcoRI-Restriktionsstelle erfolgt über eine Subklonierung mit dem TOPO Cloning-System (Abschnitt 2.4.10).

Die Fragmente wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII aus dem TOPO TA-Vektor herausgeschnitten. Die Expressionsvektoren pSPT18 bzw. pSPT19 (SP6/T7 RNA DIG Labeling Kit) wurden mit den gleichen Enzymen geschnitten. Die Restriktionsansätze sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über eine präparative Gelelektrophorese (Abschnitt 2.4.8) und Gelextraktion (Abschnitt 2.4.9).

Tabelle 7: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
DNA	≤2 µg
10 x NEB 2-Puffer	5 µl
EcoRI (15 U/µl)	2 µl
HindIII (20 U/µl)	1.5 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt	

Die Fragmente wurden mittels einer T4-Ligase (Fermentas) in die pSPT-Vektoren geklont (Tabelle 8). Dabei war zu beachten, dass das Verhältnis Vektor:Fragment im Reaktionsansatz etwa 1:5 entsprach und die maximal eingesetzte DNA-Menge <400 ng entsprach. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler für 2 Stunden bei 22°C durchgeführt. Die T4-Ligase wurde durch Inkubation für 10 min bei 65°C inaktiviert.

Anschließend wurde der Ligationsansatz dialysiert (Nitrocellulose 0,025 µm Dialysefilter, Millipore). Mit 10 µl dialysiertem Ligationsansatz wurden 30 µl kompetente Bakterienzellen (DHα-Select Silver, Bioline) transformiert (Abschnitt 2.4.11). Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung erfolgte über PCR (Abschnitt 2.4.6). Die Plasmid-DNA gewünschter Klone wurde präpariert (Abschnitt 2.4.12).

Tabelle 8: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

Komponenten	Volumen/Menge pro Ansatz
DNA	200-400 ng
Primer (10 µM)	1 µl
Big Dye	2 µl
5 x Sequenzierungspuffer	2 µl
mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt	

2.8.2 *in vitro* Transkription

Zum Erhalt der RNA-Sonden mussten Laborbedarf, Geräte und Oberflächen gesäubert und RNase-frei sein (RNase AWAY). Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem SP6/T7 RNA DIG Labeling Kit (Roche). Der enthaltene Expressionsvektor pSPT18 bzw. pSPT19 besitzt neben essentiellen Vektoreigenschaften einen SP6-Promotor am 5'-Ende und einen T7-Promotor am 3'-Ende der multiplen Klonierungsregion. Der Unterschied zwischen beiden Vektoren ist eine entgegengesetzte Orientierung der multiplen Klonierungsregion. Als Enzym diente die DNA-abhängige RNA-Polymerase T7 oder SP6. Zur Herstellung der Matrize für die *in vitro* Transkription wurden PCR-Amplifikate eingesetzt. Für Sequenzierung und PCR-Amplifikation in Auftrag gegebenen Primer pSPT18/19for und pSPT18/19rev flankieren die multiple Klonierungsregion und beide Promotoren.

Der Reaktionsansatz der PCR ist im Abschnitt 2.4.4 beschrieben. Zur Herstellung der Matrizen für die *in vitro* Transkription wurden 2 µl klonierter pSPT-Vektor in einem aufskalierten 50 µl Ansatz eingesetzt. Die PCR-Amplifikate wurde dialysiert und am 3'-Ende als Transkriptionsstop für die Polymerase mit HindIII bzw. EcoRI verdaut (Tabelle

7). Die Reaktion wurde in einem Thermozykler für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über eine präparative Gelelektrophorese (Abschnitt 2.4.8) und Gelextraktion (Abschnitt 2.4.9). Zur Erhöhung und Konzentrierung der Ausbeute wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer, erwärmt auf 50°C, eluiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für FITC-markierte Sonden wurde der FITC Labeling Mix (Roche) eingesetzt.

Die markierten RNA-Amplifikate wurden durch Ethanol-Fällung wie folgt gereinigt: zu der Reaktion wurden 100 µl Aqua bidest., 10 µl 4 M Lithiumchlorid und 300 µl Ethanol (absolut) gegeben, gevortext, 30 min bei -80°C inkubiert und 20 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde mit 300 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut für 10 min bei 11000 x g zentrifugiert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl Aqua dest. aufgenommen. Die Proben wurden aliquotiert und kurzfristig bei -20°C bzw. längerfristig bei -70°C gelagert.

2.8.3 Hybridisierungsreaktion

Zur Vorbereitung des Gewebes für die *in situ* Hybridisierung mussten zum Erhalt der RNA-Integrität Laborbedarf, Geräte und Oberflächen gesäubert und RNase-frei sein (RNase AWAY). Puffer und Aqua dest. wurden DEPC-behandelt.

Die Gefrierschnitte (Abschnitt 2.2.3) wurden dem -80°C Gefrierschrank entnommen, auf dem Handrücken aufgetaut und in 4% Paraformaldehyd (Sigma) in PBS für 20 min fixiert. Die Gewebsschnitte wurden zwei Mal á 15 min in 0,1% aktiven DEPC in PBS gewaschen und 15 min in 5xSSC equilibriert. Jeder Gewebsschnitt wurde mit 50 µl Hybridisierungslösung bei 50°C für 90 min prä-hybridisiert. Die RNA-Sonden pro Gewebsschnitt wurden wie folgt vorbereitet: 1-2 µl RNA-Sonde und 6 µl tRNA (Ambion) wurden für 5 min auf 80°C erhitzt und mit 50 µl kalter Hybridisierungslösung verdünnt. Anschließend wurde die RNA-Sonde zu dem Gewebsschnitt gegeben, die Hybridisierungsreaktion mit Parafilm abgedeckt und für 16-20 Stunden bei 60°C inkubiert.

Es folgte zwei Mal á 10 min in 2xSSC waschen und der Verdau unvollständig hybridisierter RNA-Sonden. Dazu wurde das Gewebe 5 min in RNase-Puffer equilibriert

und mit 20 ng RNase A (Qiagen) in RNase-Puffer für 30 min bei RT inkubiert. Die RNase wurde durch zweimaliges Waschen mit 2xSSC entfernt. Das Gewebe wurde dann 60 min in 2xSSC bei 55°C und 60 min in 0,1xSSC bei 55°C gewaschen.

2.8.4 Detektion und Substratreaktion

Im Anschluss an die Hybridisierungsreaktion wurde das Gewebe in TS-Puffer 5 min equilibriert und unspezifische Bindungsstellen mit 2% Blocking Reagent (Roche) in TS-Puffer blockiert. Die markierten RNA-Hybride wurden mit einem AP-gekoppelten anti-DIG-Antikörper (1:400) über Nacht bei 4°C detektiert. Anschließend wurde das Gewebe drei Mal mit TS-Puffer gewaschen und mit AP-Puffer für 5 min equilibriert. Die Substratlösung BCIP/NBT (Promega) wurde nach Angaben des Herstellers zubereitet, mit 40 ng/ml Levamisol versehen, auf das Gewebe gegeben und alle 2 Stunden gewechselt. Erreichte die Färbung die gewünschte Intensität, wurde das Gewebe zwei Mal in Aqua dest. gewaschen, mit Kaiser's Gelatine überschichtet und mit Deckgläsern eingedeckt.

2.8.5 Doppel-*in situ*-Hybridisierung

Die Doppel-*in situ* Hybridisierung unterschied sich von der normalen Hybridisierung in folgenden Punkten: Zu der Prä-Hybridisierung werden je 1-2 µl DIG-markierte und FITC-markierte Probe gegeben. Nach der Hybridisierung wurde zuerst die FITC-Sonde mit einem AP-gekoppelten anti-FITC-Antikörper (1:400) detektiert und mit dem Vektor AP Substrate Kit III (blaue Färbung) gefärbt. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch eine 15-minütige Inkubation in 0,1 M Wasserstoffperoxid (Sigma) zerstört. Im nächsten Schritt wurde die DIG-markierte Sonde über Nacht detektiert (Abschnitt 2.8.4) und mit Sigma FastRed (rote Färbung) gefärbt.

2.9 Zellkultur

Alle Zellenkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

2.9.1 Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen

Nach dem die mesenchymalen Stammzellen isoliert wurden und konfluent wuchsen, wurde die Zellen gewaschen (Abschnitt 2.2.5), in 5 Zellkulturschalen verteilt und für 3 Tage inkubiert. Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums wurden die Zellen erneut gewaschen, 10⁵ Zellen pro Loch in eine 6-Loch-Zellkulturplatte (Grainer) gegeben und 2 bis 3 Tage inkubiert. Erreichten die Zellen Konfluenz, wurden sie für die Differenzierung stimuliert.

2.9.2 *in vitro* Ausdifferenzierung von Osteoblasten

Die kultivierten mesenchymalen Stammzellen differenzierten in Kulturmedium mit 5 mM β -Glycerophosphat (Fluka) und 100 μ g/ml Ascorbinsäure (Sigma) für 21 Tage aus. Das Kulturmedium mit Stimulanzen wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Ausdifferenzierung zu Osteoblasten wurde mit der von-Kossa-Silbernitratfärbung überprüft.

2.9.3 *in vitro* Ausdifferenzierung von Adipozyten

Die kultivierten mesenchymalen Stammzellen differenzierten in Kulturmedium mit 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma), 1 μ M Dexamethason (Sigma) und 10 μ g/ml Insulin (Sigma) für 21 Tage aus. Das Kulturmedium mit Stimulanzen wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Ausdifferenzierung zu Adipozyten wurde mit Oil Red O Färbung überprüft.

