Die Expression und Regulation des Wachstumsfaktors GDF-3

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.

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

von
Svenja Sethmann

Berlin, März 2002

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Januar 2002 am Deutschen Rheumaforschungszentrum in der AG Prof. R. Lauster angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 16.Mai 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 3
1.1 Das Immunsystem 3
1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion des Immunsystems 3
1.1.2 Aufbau und Funktion der Milz 4
1.2 Die TGFβ Superfamilie 5
1.3 Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor GDF-3 9
1.4 Ziel der Arbeit 11
2. Material und Methoden 12
2.1 Material 12
2.1.1 Murines und humanes Gewebe 12
2.1.2 Antikörper und MACS MicroBeads 12
2.1.3 Plasmide 13
2.1.4 Oligonukleotide 13
2.1.5 Geräte 14
2.1.6 Enzyme 14
2.1.7 Reaktionskits 15
2.1.8 Puffer 15
2.1.9 Chemikalien und Radiochemikalien 17
2.1.10 Medien 19
2.1.11 Kunststoffartikel und sonstige Verbrauchmaterialien 19
2.2 Methoden 20
2.2.1 Strategie zur Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen 20
2.2.2 Isolation der lymphatischen Gewebe 20
2.2.3 mRNA Präparation 21
2.2.4 cDNA Präparation 22
2.2.5 Zellsortierung (MACS) 23
2.2.6 Trennung lymphatischer Zellen durch Adhärenz 25
2.2.7 Durchflusscytometrie (FACS) 26
2.2.8 Quantitative LightCycler PCR 27
2.2.9 Anfertigung histologischer Gewebeschnitte 31
2.2.10 *In situ* Hybridisierung 31
2.2.11 Zellkultur und Zellzahlbestimmung 34

2.2.12 *In vitro* Stimulation 35
2.2.13 *In vitro* Depletionen 35
2.2.14 Immunohistochemie 36
2.2.15 Mechanismus der Regulation der GDF-3 Expression 37
2.2.16 Das GDF-3 'Standard'-Plasmid 37
3. Ergebnisse 39
3.1 Etablierung der LightCycler PCR 39
3.2 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben 41
3.2.1 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben der Maus 41
3.2.2 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben des Menschen 44
3.3 Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen 45
3.3.1 GDF-3 Expression in definierten Zellpopulationen der Milz 46
3.3.2 GDF-3 Expression in definierten Zellpopulationen des Knochenmarks 50
3.3.3 Lokalisation der GDF-3 mRNA in histologischen Schnitten der Milz 52
3.4 Regulation der GDF-3 Expression 54
3.4.1 *In vitro* Stimulationen 54
3.4.2 *In vitro* Depletionen 57
3.4.3 Immunohistochemischer Nachweis CD11b positiver Zellen 60
3.4.4 Regulationsmechanismus der GDF-3 Expression durch CD11b positive Zellen 61
3.5 GDF-3 Expression in $Rag^{-/-}$ Mäusen 62
4. Diskussion 65
4.1 Etablierung der LightCycler PCR 66
4.2 GDF-3 Expression in Gesamtgeweben 67
4.3 Identifizierung der GDF-3 exprimierenden Zellen 68
4.4 Charakterisierung von Regulationsmechanismen der GDF-3 Expression 69
4.5 GDF-3 Expression in $Rag\text{-}2^{-/-}$ Mäusen 72
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick 73
4.6.1 Schlussfolgerung 73
4.6.2 Ausblick 73
5. Zusammenfassung 76
6. Referenzen 77

Summary

The growth and differentiation factor 3 (GDF-3) is unique among the members of the TGFβ super family. It is almost exclusively expressed in lymphoid tissues (Mc Pherron and Lee, 1993), suggesting a role for GDF-3 in the maintenance and/or regulation in the immune system.

Combining MACS technology, quantitative RT-PCR, and *in situ* hybridisation, the cellular source of GDF-3 secretion within primary and secondary lymphoid tissues could be identified. Magnetic cell sorting (MACS) was applied to separate distinct cell populations according to their specific surface markers to a high purity. mRNA was isolated from the different cell types, reversely transcribed into cDNA, and analysed by quantitative, sequence-specific PCR utilising the LightCycler system. mRNA from total lymphoid tissues was isolated for comparison. Prior to quantification, all samples were normalised to expression of the housekeeping gene β-Actin. GDF-3 transcript could specifically be detected in B220/Thy1.2/CD11b/CD11c/CD45 negative, adherently growing cells. *In situ* hybridisation of spleen sections revealed the morphological pattern of the GDF-3 expressing cells. They were clearly identified as stromal cells of the red pulp.

To address the question whether GDF-3 expression is regulated, a series of *in vitro* experiments was performed. Stimulation of splenocytes with Lipopolysaccharide (LPS), a bacterial antigen that activates the immune response, leads to a dramatic downregulation of GDF-3 expression. Furthermore, $CD11b^+$ cells, $CD11c^+$ cells, and $DX5^+$ cells were found to be required to maintain GDF-3 expression in culture. Immunohistochemistry showed that $CD11b^+$ cells are co-localised with the GDF-3 expressing stromal cells in the red pulp of spleen, suggesting an immediate effect for $CD11b^+$ cells in the regulation of GDF-3 expression. If added to CD11b-depleted splenocytes, the $CD11b^+$ fraction, but not conditioned medium from total spleen can restore full GDF-3 expression. Therefore, GDF-3 expression is mediated by direct cell contact rather than by a secreted factor.

In conclusion, the data provides strong evidence that GDF-3 is part of the complex ensemble of secreted proteins that govern the immune function.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Roland Lauster und Prof. Dr. Andreas Radbruch für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Deutschen Rheumaforschungszentrum anzufertigen. Besonders möchte ich mich bei Roland für das spannende Thema und die stete Unterstützung bedanken. Seine immer offenen Ohren, seine konstruktive Kritik und sein motivierender Optimismus sowie die ausgesprochen angenehme Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner "Laborfamilie" Luzia Reiners-Schramm, Mark Rosowski, Hendrik Nogai und Daniel Schaumann danke ich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima. Luzie danke ich vor allem für Rat und Tat in fachlichen Fragen und ihre fürsorgliche Art. Marki danke ich für seine unvergleichliche Geduld und Hilfsbereitschaft. Hendrik gilt mein ganz besonderer Dank für die intensiven fachlichen und persönlichen Gespräche. Daniel danke ich seinen frischen wissenschaftlichen Elan.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Rudolf Manz. Die vielen fachlichen Diskussionen und seine ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft waren besonders während kleinerer Durststrecken eine unverzichtbare Unterstützung. Orissa Bender danke ich für ihre freundschaftliche Hilfe beim FACS und anderen Faxen. PD Dr. Claudia Berek danke ich für die Diskussionen zu immunohistochemischer Fragestellungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Veit Krenn von der Pathologie der Charité für die Bereitstellung menschlicher Gewebe und seinen Expertenrat. Gabi Fernal danke ich für die vielen Tips und Tricks zur Histologie.
PD Dr. Andrea Vortkamp vom MPI für Molekulare Genetik danke ich für die Möglichkeit, die ISH in ihrem Labor zu erlernen und durchzuführen; Eleonora Minina für ihre geduldige Hilfe beim Überwinden technischer Hürden.
Olfert Landt und Ulrich Lass von TibMolbiol gebührt mein Dank für die wertvolle Beratung in Sachen LightCycler.

Prof. Volker A. Erdmann danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Schließlich gilt mein besonderer Dank Anthony Celeste vom Genetics Institute in Boston, der mein Interesse für Wachstumsfaktoren bestärkt hat und meine Arbeit durch motivierende Diskussionen aus der Ferne stets unterstützt hat.

Und ich danke Felix für alles, was er für mich getan hat.