

Klinik und Poliklinik für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
- Zentrums für operative Medizin -
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes M. Rueger

**Untersuchungen zur Funktion des Resistin-ähnlichen
Moleküls RELM γ *in vitro* und *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem
Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Lara Winterhoff
aus Aurich

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich der Medizin
der Universität Hamburg am: 14.12.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Heiland

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H.-P. Kruse

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	7
1.1 Identifizierung von Resistin	7
1.2 Die Resistin-Familie	8
1.3 Identifizierung von RELM γ	10
1.4 Funktionelle Untersuchung von RELM γ	12
1.5 Ziele dieser Dissertation.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	16
2.2 Genotypisierung durch PCR	17
2.3 Agarose Gelelektrophorese	18
2.4 Restriktion, Auftrennung und Membrantransfer genomischer DNA (Southern Blot)	19
2.5 Radioaktive Markierung einer RELM γ -cDNA-Sonde	20
2.6 Hybridisierung genomischer DNA mit der radioaktiv markierten Sonde.....	20
2.7 RNA-Isolation.....	21
2.8 Auftrennung und Membrantransfer von RNA (Northern Blot)..	22
2.9 Austesten von Antiseren mittels ELISA.....	23
2.10 Analyse des Blutbildes transgener Mäuse	24
2.11 Untersuchung des Einflusses von RELM γ auf die myeloblastäre Zelllinie M1	25
2.12 Herstellung von Gewebeschnitten	26
2.13 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	28
2.14 Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien zur Plattierung von Bakteriophagen-Bibliotheken	28
2.15 Plattierung der Bakteriophagen-Bibliotheken	29
2.16 Hybridisierung der Phagenbibliothek.....	30
2.17 Herstellung einer humanen Resistin-cDNA-Sonde	31

2.18	Isolierung des humanen Resistin-cDNA-Fragments zur radioaktiven Markierung.....	33
2.19	Untersuchung des Einflusses von Resistin auf die promyelozytische Zelllinie HL60	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Genotypisierung transgener ApoE-RELM γ -Mäuse.....	36
3.2	Analyse der Expression von RELM γ in der Leber durch Northern Blot.....	38
3.3	Phänotypische Analyse der ApoE-RELM γ -Mäuse	42
3.4	Identifizierung eines humanen RELM γ -Orthologs	48
4	Diskussion.....	55
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	55
4.2	RELM γ als C/EBP ϵ -Zielgen.....	56
4.3	RELM γ als Regulator der Myeloblasten- und Promyelozyten-Proliferation und Differenzierung	57
4.4	Resistin als potentieller Regulator der Granulopoese	59
4.5	Ausblick.....	62
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Danksagung.....	74
8	Lebenslauf	74
9	Eidesstattliche Versicherung.....	75

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Primärstruktur und Sekretion von RELM γ	10
Abbildung 2: Sequenzvergleich von RELM γ mit den anderen Mitgliedern der Resistin-Familie	11
Abbildung 3: Expression von RELM γ	13
Abbildung 4: Einfluß von RELM γ auf HL60-Zellen.....	14
Abbildung 5: RELM γ -cDNA-Konstrukt zur Generierung transgener Mäuse	36
Abbildung 6: Genotypisierung der ApoE-RELM γ -Mäuse durch PCR.....	37
Abbildung 7: Genotypisierung der ApoE-RELM γ -Mäuse durch Southern Blot.....	38
Abbildung 8: Expressionsanalyse von RELM γ in den transgenen Mauslinien	39
Abbildung 9: Leber-spezifische Transgen-Expression in ApoE- RELM γ -Mäusen.....	40
Abbildung 10: Vergleich von Antipeptid-Antiseren gegen RELM γ im ELISA.....	41
Abbildung 11: Vergleich von Blutausstrichen von Wildtyp- und ApoE-RELM γ -Mäusen	43
Abbildung 12: Anzahl der Myeloblasten in Blutausstrichen von Wildtyp- und ApoE-RELM γ -Mäusen	44
Abbildung 13: Proliferativer Effekt von RELM γ auf die myeloblastäre Zelllinie M1	45
Abbildung 14: Effekt von RELM γ auf die Differenzierung der myeloblastären Zelllinie M1	46
Abbildung 15: Histopathologische Analyse verschiedener Gewebe.....	47
Abbildung 16: Histopathologische Veränderung der Lunge einer ApoE-RELM γ -Maus	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17: Hybridisierung von Bakteriophagen-Bibliotheken	50
Abbildung 18: Vorbereitung der humanen Resistin-cDNA-Sonde ..	51
Abbildung 19: Vergleich der Expression von murinem und humanem Resistin.....	52
Abbildung 20: Effekt von Resistin auf HL60-Zellen	54

1 Einleitung

1.1 Identifizierung von Resistin

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß zwischen Typ-II-Diabetes und Adipositas ein Zusammenhang besteht. Vor einigen Jahren kam eine neue Gruppe von Diabetesmedikamenten, die Glitazone, auf den Markt (Day, 1999). Erster Vertreter war das Rosiglitazon, dessen Wirkmechanismus als Ligand des Transkriptionsfaktors PPAR γ mittlerweile sehr gut etabliert ist (Lehmann et al., 1995). Obwohl PPAR γ selektiv im weißen Fettgewebe exprimiert wird, führt Rosiglitazon zu einer verbesserten Insulinsensitivität aller Organe (Olefsky, 2000), was die Arbeitsgruppe um Mitchell A. Lazar zu der Hypothese führte, daß Adipozyten einen systemisch wirkenden Insulin-Antagonisten sezernieren, dessen Expression durch Rosiglitazon inhibiert wird.

In einer im Jahr 2001 in der Zeitschrift „Nature“ veröffentlichten Publikation, wurde ein solches Molekül durch cDNA-Subtraktion identifiziert und als Resistin (für „RESISTance to INSulin“) bezeichnet (Steppan et al. 2001a). Resistin ist ein Protein bestehend aus 114 Aminosäuren, wobei die ersten 21 Aminosäuren einer typischen Signalsequenz entsprechen, die zur Protein-Sekretion führt. Resistin wird in der Maus spezifisch in differenzierten Adipozyten exprimiert und in seiner Expression durch Rosiglitazon herabreguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich die Serumkonzentration von Resistin durch Nahrungsaufnahme erhöht, sowie durch Fasten erniedrigt. Zusätzliche Untersuchungen ergaben, daß die Neutralisation von Resistin durch einen spezifischen Antikörper in Mäusen zu einer Erniedrigung des Serumglukosespiegels führte, während sich durch die Gabe von rekombinantem Resistin ein gegenteiliger Effekt zeigte. Insulin-antagonistische Effekte konnten auch durch *in vitro*-Experimente nachgewiesen werden, in denen der

Insulin-abhängige Glukosetransport in Adipozyten durch die Gabe von Resistin inhibiert wurde (Steppan et al., 2001a). Eine solche Funktion wird auch durch den Phänotyp eines kürzlich beschriebenen Resistin-defizienten Mausmodells unterstützt, da diese Mäuse nach mehrstündigem Fasten signifikant erniedrigte Glukosespiegel im Serum aufwiesen (Banerjee et al., 2004).

Ob die in der Maus nachgewiesenen Insulin-antagonistischen Eigenschaften auch auf den Menschen übertragbar sind, ist jedoch noch umstritten (Ukkola, 2002). So wurden bislang keine Mutationen oder Polymorphismen im humanen Resistin-Gen identifiziert, die eindeutig mit Typ-II-Diabetes oder Adipositas assoziiert sind (Cao & Hegele, 2001; Osawa et al., 2002; Sentinelli et al., 2002). Auch konnte keine signifikante Assoziation der Resistin-Expression mit dem Körpergewicht und der Insulin-Sensitivität nachgewiesen werden (Janke et al., 2002). Desweiteren gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß Resistin in humanen Adipozyten, im Gegensatz zur Maus, nur in geringem Ausmaß exprimiert wird (Nagaev & Smith, 2001; Savage et al., 2001; Patel et al., 2003). Eine wesentlich stärkere Expression von Resistin wurde hingegen im humanen Knochenmark, bzw. in mononukleären Blutzellen nachgewiesen, was darauf hindeutet, daß die physiologischen Funktionen von Resistin in Maus und Mensch unterschiedlich sein könnten (Savage et al., 2001; Patel et al. 2003; Chumakov et al. 2004).

1.2 Die Resistin-Familie

Nahezu zeitgleich zur Beschreibung von Resistin als potentiellm Insulin-Antagonisten wurde von zwei Arbeitsgruppen publiziert, daß Resistin ein Mitglied einer neuen Proteinfamilie ist, von der zu diesem Zeitpunkt zwei weitere Moleküle identifiziert wurden. Die erste Arbeitsgruppe bezeichnete diese Proteine als FIZZ1-3, da

FIZZ1 (found in inflammatory zone) im Sekret einer Bronchiallavage aus einem allergisch entzündlichen Infiltrat der Lunge gefunden wurde (Holcomb et al., 2000). Die zweite Arbeitsgruppe führte aufgrund der Entdeckung von Resistin die Bezeichnung „Resistin-like molecules“ (RELM) ein, wobei FIZZ1 RELM α entspricht, FIZZ3 Resistin, und FIZZ2 RELM β (Steppan et al., 2001b). Da sich letztere Nomenklatur in der Literatur durchgesetzt hat, bezieht sich auch die vorliegende Dissertation auf diesen neu eingeführten Terminus.

Die drei zu diesem Zeitpunkt bekannten Mitglieder der Resistin-Familie sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut. Als Gemeinsamkeit ist zunächst eine N-terminale Signalsequenz zu nennen, die nachweislich zur Sekretion eines Proteins von etwa 90 Aminosäuren führt (Steppan et al., 2001b). Eine weitere Übereinstimmung ist die Konservierung der Cystein-Reste im C-Terminus. Aufgrund der charakteristischen Sequenz C-X₁₁-C-X₈-C-X-C-X₃-C-X₁₀-C-X-C-X-C-X₉-CC-X₃₋₆ (die tiefergestellten Zahlen stehen für die Anzahl von Aminosäuren zwischen den Cystein-Resten) wurde diese Region von Steppan und Mitarbeitern als Cystein-Signatur der Resistin-Familie bezeichnet (Steppan et al., 2001b).

Ob die verschiedenen Mitglieder der Resistin-Familie auch funktionell vergleichbar sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Während RELM α hauptsächlich im weißen Fettgewebe exprimiert wird und einen inhibitorischen Einfluß auf die Apipozyten-Differenzierung hat (Blagoev et al., 2002), wird RELM β in Zellen des Gastrointestinaltrakts exprimiert, wobei die vermehrte Produktion in Tumorzellen eines Colon-Carzinoms auf eine regulatorische Funktion bei der Proliferation der Epithelzellen hinweist (Steppan et al., 2001b). Obwohl die physiologische Funktion der einzelnen Mitglieder der Resistin-Familie noch nicht vollständig aufgeklärt ist, handelt es sich um eine interessante neue Familie von Gewebe-spezifisch exprimierten Signalmolekülen.

1.3 Identifizierung von RELM γ

Das primäre Forschungsgebiet der Experimentellen Unfallchirurgie liegt im Bereich der Osteologie. Da Typ-II-Diabetes mit erhöhter Knochendichte korreliert (Verhaeghe & Bouillon, 2002), stellte sich die Frage, ob Knochenzellen Resistin oder Resistin-ähnliche Moleküle exprimieren, die eine Insulin-antagonistische Wirkung ausüben könnten. Durch eine niedrig-stringente PCR-Reaktion, in der cDNA aus Femora neugeborener Mäuse als Matrize eingesetzt wurde, konnte ein Fragment eines Resistin-ähnlichen Moleküls amplifiziert werden, das zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war und deshalb als RELM γ bezeichnet wurde (Schinke et al., 2004). Die komplette cDNA von RELM γ kodiert für ein Protein von 117 Aminosäuren, das am N-Terminus eine Signalsequenz enthält, die zur Sekretion des Proteins führt (Abbildung 1).

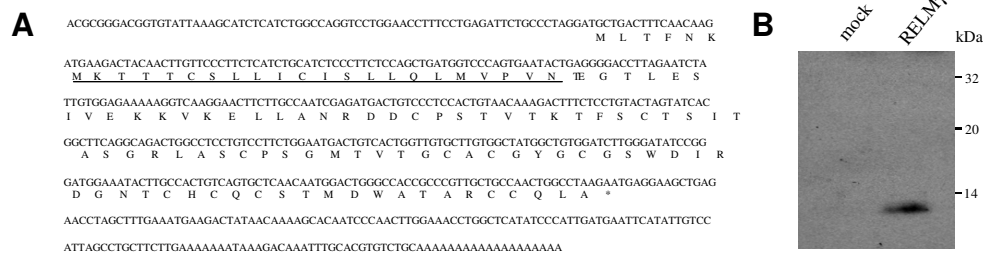


Abbildung 1: Primärstruktur und Sekretion von RELM γ . (A) cDNA- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz von murinem RELM γ . Die N-terminale Signalsequenz ist unterstrichen. (B) Sekretion von RELM γ . Nach Transfektion von 293-Zellen mit einem RELM γ -Expressionsplasmid und anschließendem Nachweis im Medium mittels Western Blot zeigte sich eine Bande bei 12 kDa, wodurch die Funktionalität der Signalsequenz verifiziert werden konnte (Schinke et al., 2004).

Die Primärstruktur von RELM γ zeigt deutliche Sequenzhomologien zu den zuvor bekannten Mitgliedern der Resistin-Familie, wobei die

größte Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich zu RELM α besteht, im C-terminalen Bereich zu RELM β (Abbildung 2). Da RELM γ in diesem Bereich auch die für die Resistin-Familie charakteristische Cystein-Signatur aufweist (Steppan et al., 2001b), handelt es sich zweifelsfrei um ein neues Mitglied dieser Protein-Familie.

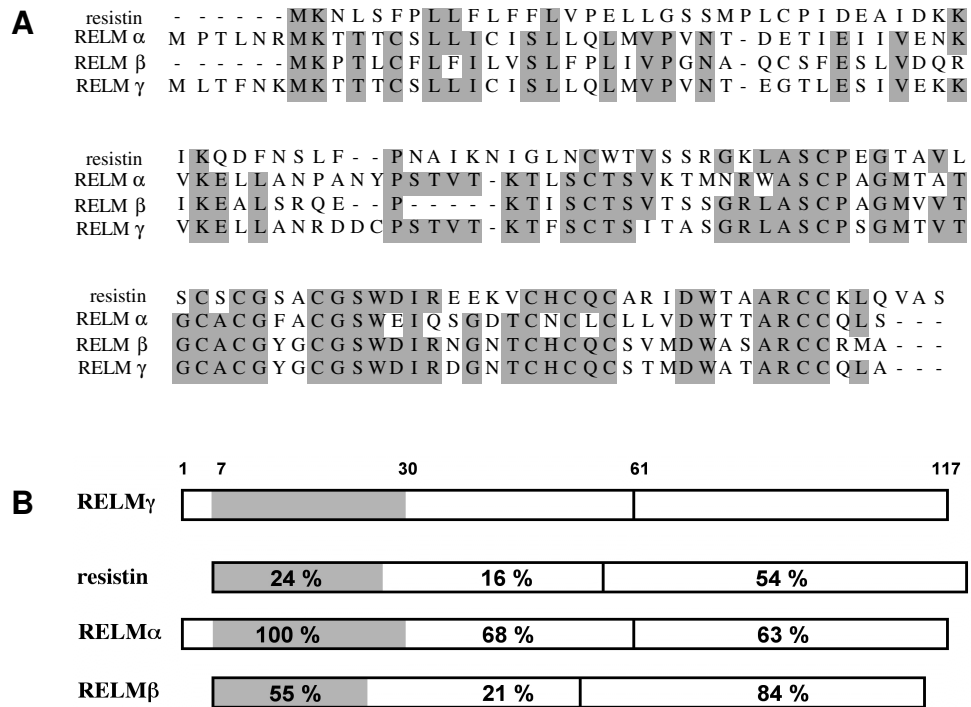


Abbildung 2: Sequenzvergleich von RELM γ mit den anderen Mitgliedern der Resistin-Familie. (A) Sequenzvergleich von Resistin, RELM α , RELM β und RELM γ aus der Maus. Konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. **(B)** Sequenzhomologie von RELM γ zu den anderen Mitgliedern der Resistin-Familie. Die Signalsequenz ist grau unterlegt (Schinke et al., 2004).

Nahezu zeitgleich wurde RELM γ auch von einer anderen Arbeitsgruppe als Gen identifiziert, dessen Expression im respiratorischen Epithel von Ratten durch Zigaretten-Rauch induziert wird (Gerstmayer et al., 2003). Durch eine vollständige genomische Datenbankanalyse konnten die Autoren weiterhin feststellen, daß das

RELM γ -kodierende Gen sowohl in der Ratte, als auch in der Maus, zusammen mit RELM α und RELM β in einem Gen-Cluster auf Chromosom 11, bzw. Chromosom 16 liegt (Gerstmayer et al., 2003). Im Verlauf dieser Dissertation wurde RELM γ auch von einer dritten Arbeitsgruppe beschrieben und als mXCP1 (murine ten-cysteine protein 1) bezeichnet (Chumakow et al., 2004). In dieser Arbeit wurde RELM γ als Zielgen des Transkriptionsfaktors C/EBP ϵ beschrieben, der eine physiologische Funktion bei der Granulozyten-Differenzierung spielt (Yamanaka et al., 1997; Lekstrom-Himes et al., 1999).

1.4 Funktionelle Untersuchung von RELM γ

Als erster Schritt zur funktionellen Untersuchung von RELM γ wurde eine Expressionsanalyse mittels Northern Blot durchgeführt. Daraus ergab sich ein für Zellen des hämatopoetischen Gewebes spezifisches Expressionsmuster. Es zeigten sich deutliche Signale in Lunge, Milz und Röhrenknochen, allerdings nicht im Calvarium. Demzufolge muß davon ausgegangen werden, daß RELM γ nicht von Knochenzellen exprimiert wird, sondern von Zellen des Knochenmarks bzw. von peripheren Blutzellen. Durch weiterführende Expressionsanalysen von Knochenmark und verschiedenen Zellfraktionen aus dem Blut adulter Mäuse bestätigte sich das starke Signal von RELM γ im Knochenmark. Des Weiteren zeigte sich unter den aus dem Blut isolierten Zellfraktionen bei Granulozyten die stärkste Expression.

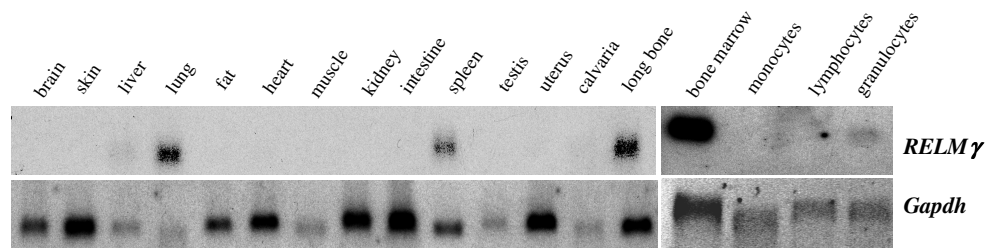


Abbildung 3: Expression von RELM γ . RNA aus verschiedenen Geweben und Zellfraktionen adulter Mäuse wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (Northern Blot). Diese Membran wurde zunächst mit einer RELM γ -cDNA-Sonde hybridisiert. Die anschließende Hybridisierung mit einer Gapdh-cDNA-Sonde diente als Positivkontrolle (Schinke et al., 2004).

Aufgrund dieser Ergebnisse schlossen sich *in vitro*-Untersuchungen an der promyelozytischen Zelllinie HL60 an, die durch Zugabe von Retinsäure zu neutrophilen Granulozyten differenziert werden kann. Durch Transfektion der HL60-Zellen mit einem RELM γ -Expressionsplasmid zeigte sich sowohl mit, als auch ohne Zugabe von Retinsäure im Vergleich zu den kontrolltransfizierten HL60-Zellen ein signifikant proliferativer Effekt. Dementsprechend stellt RELM γ ein neues sekretiertes Mitglied der Resistin-Familie dar, das eine wichtige Funktion bei der Proliferation und Differenzierung von Promyelozyten haben könnte.

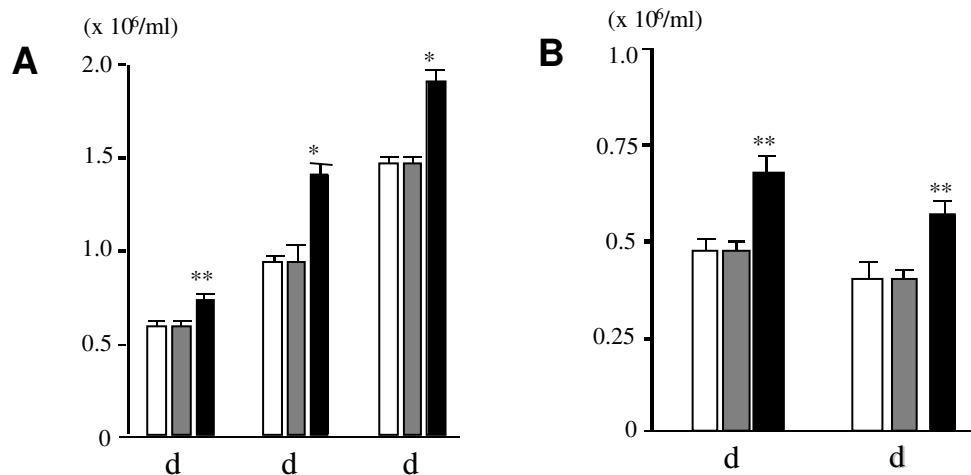


Abbildung 4: Einfluß von RELM γ auf HL60-Zellen. (A) Nicht-transfizierte (weiße Balken), kontrolltransfizierte (graue Balken) und RELM γ -transfizierte (schwarze Balken) HL60-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion (d0) auf eine Zelldichte von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht. Die Zelldichte wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen (d1-d3) mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. (B) Die in gleicher Weise behandelten Zellen wurden durch Zugabe von 9-cis-Retinsäure (10^{-6} M) zu Granulozyten differenziert.

1.5 Ziele der Dissertation

Mit der vorliegenden Dissertation sollten zwei wesentliche Fragestellungen beantwortet werden. Zum einen sollte ein transgenes Mausmodell charakterisiert werden, um die funktionellen Eigenschaften von RELM γ *in vivo* zu untersuchen. Desweiteren sollte gezielt nach dem humanen RELM γ -Ortholog gesucht werden, da zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war.

Zur Beantwortung der ersten Frage sollte eine Kolonie transgener Mäuse etabliert werden, die RELM γ unter der Kontrolle des Apolipoprotein(E)-Promotors in Hepatozyten exprimieren. Dieser Ansatz wurde bereits mehrfach eingesetzt, um die Serumkonzentration verschiedener Hormone zu erhöhen, so daß ihr Einfluss auf diverse Organsysteme *in vivo* untersucht werden kann

(Simonet et al. 1997; Eleftheriou et al., 2004). Nach Genotypisierung und Expressionanalysen sollte der Phänotyp RELM γ -transgener Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren histologisch und durch Blutbildanalysen untersucht werden.

Zur Beantwortung der zweiten Frage sollte eine humane cDNA-Bibliothek aus Knochenmark mit der murinen RELM γ -cDNA bei niedriger Stringenz hybridisiert werden, um ein mögliches humanes Ortholog zu identifizieren. Weiterhin sollte die von Chumakov und Mitarbeitern diskutierte Möglichkeit (Chumakov et al., 2004) überprüft werden, daß Resistin das humane RELM γ -Ortholog darstellt, was durch einen Vergleich der Expressionsmuster und durch *in vitro*-Experimente an HL60-Zellen überprüft werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der ApoE-RELM γ -transgenen Mäuse wurde zunächst genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert, die von Mitarbeitern der Versuchstierhaltung des UKE entnommen wurden. Zu diesen ca. 2 mm langen Schwanzbiopsien wurden jeweils 700 μ l Schwanz-Lysis-Puffer sowie 50 μ l einer Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml) zugefügt und über Nacht in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dieser Ansatz mit 600 μ l eines Phenol/Chloroform-Gemischs (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) versetzt und gemischt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden jeweils 500 μ l der oberen Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l des Phenol/Chloroform-Gemischs versetzt, gemischt und erneut für zwei Minuten zentrifugiert. Danach wurden 400 μ l der oberen Phase in ein neues Gefäß überführt und 400 μ l Isopropanol (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) zugegeben. Nach Mischung und anschließender Zentrifugation (Zentrifuge: Eppendorf AG, Hamburg) für 5 Minuten bei 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, das entstandene Pellet mit 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt) gewaschen und erneut für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nach einer wiederholten kurzen Zentrifugation komplett entfernt. Abschließend wurden jeweils 40 μ l autoklavierte TE-Lösung hinzugefügt. Die isolierte DNA ging durch Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht in Lösung und wurde anschließend für die PCR-, bzw. Southern Blot-Analyse eingesetzt.

Schwanz-Lysis-Puffer: 50 mM Tris, pH 8
100 mM EDTA
100 mM NaCl
1 % SDS

TE-Puffer: 100 mM Tris pH 8
1 mM EDTA

2.2 Genotypisierung durch PCR

Nach der wie unter 2.1 beschriebenen DNA-Gewinnung wurden von jeder Probe 1 μ l einer 1:10-Verdünnung in die PCR-Reaktion eingesetzt. Weiterhin wurden pro Ansatz 2 μ l 10xPCR-Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1 μ l 5mM dNTPs (Pharmacia), 3 μ l der spezifischen Primer (siehe unten), 0,3 μ l Taq-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) hinzugefügt und mit sterilem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden die Ansätze in einem Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) folgendermaßen inkubiert:

4 Minuten bei 94 °C;

36 Zyklen: 1 Minute bei 94 °C (Denaturierung)
1 Minute bei 58 °C (Anlagerung der Primer)
1 Minute bei 72 °C (Polymerisation)
10 Minuten bei 72 °C.

Verwendete Primer (1 μ M-Stammlösung):

Primer 1 (RELM γ): 5'- TGACTGTCCCTCCACTGTAAC -3'

Primer 2 (ApoE-polyA): 5'-TTAGAGGAAATCACAGGGGGAGGC-3'

2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Nukleinsäuren, z.B. der durch die in 2.2 beschriebenen PCR-Amplifikations-Produkte. Hierzu wurde zunächst ein 1 %-Agarosegel hergestellt, in dem 1 g Agarose (Seakem, BMA, Rockland, USA) mit 100 ml 1xTAE-Puffer versetzt und in einem Mikrowellenofen bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgeköcht wurden. Unter dem Abzug wurden anschließend 50 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) zugefügt, in eine Gelform gegossen und ein Kamm mit 40µl Taschenvolumen hineingestellt. Das erkaltete Gel wurde in eine mit 1xTAE Puffer gefüllte Laufkammer gelegt.

In die Geltaschen wurde zunächst 3 µl einer DNA-Leiter (Invitrogen, # 10488-072), nachfolgend die mit jeweils 2 µl 10x Probenpuffer versehenen PCR-Produkte pipettiert. Bei einer Spannung von 80 V wurden die Nukleinsäuren für ca. 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt und zur anschließenden Beurteilung unter UV-Licht fotografiert.

50x TAE-Puffer: 242,0 g TRIS-Base (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
57,1 g Essigsäure abs. (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
8,6 g EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
in 1000 ml H₂O
(der Puffer wurde 50x mit Wasser verdünnt)

10x Probenpuffer: 10x: 20% Ficoll 400 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
0,1 M EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
1% SDS (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
0,25 % Bromphenolblau (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
0,25 % Xylencyanol (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)

2.4 Restriktion, Auftrennung und Membrantransfer genomischer DNA (Southern Blot)

In diese Reaktion wurde 24 µl der wie unter 2.1 isolierten DNA eingesetzt. Jeder Probe wurde 3µl 10x Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 2µl Xba I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1µl RNAse (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugefügt und über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co KG Laborgeräte, Schwabach) inkubiert. Nachdem die Proben mit jeweils 3 µl 10x Probenpuffer versetzt wurden, wurden sie auf ein 1 % Agarosegel (Herstellung siehe 2.3) aufgetragen und bei einer Spannung von 60V für ca. 90 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel im UV-Licht mit einem an die erste Tasche des Gels angelegtes fluoreszierendem Lineal (zur Orientierung) fotografiert. Im Folgenden wurde das Gel in einer 0.25 M HCl-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze) für 15 Minuten inkubiert und danach mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach nachfolgender kurzer Aquilibrierung des Gels in einer 0.4 M NaOH-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze), folgte über Nacht der Transfer der DNA auf eine Hybond-N+-Membran (Amersham Bioscience AB, Uppala, Schweden). Nachfolgend wurde die DNA auf der Hybond-N+-Membran durch UV-Licht vernetzt, für 15 Minuten in einer 1M Tris Lösung (pH 7.5) inkubiert und danach mehrfach kurz mit Wasser gewaschen. Anschließend folgte der Transfer der Membran in Hybridisierungspuffer in einem Hybridisierungssofen (UVP Labortory and UV Products, Houston, USA) bei 65° für 2 Stunden.

Hybridisierungspuffer: 330 mM Natriumphosphat, pH 7,0 (Merck, Darmstadt)
6,6 % SDS (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)

2.5 Radioaktive Markierung einer RELM γ -cDNA-Sonde

Zur Herstellung der Hybridisierungssonde wurde ein Fragment vom 3'-Ende des ApoE-Gens verwendet, das im Labor zur Verfügung steht. 50 ng dieses DNA-Fragments wurden auf 10 μ l mit sterilem H₂O aufgefüllt, 5 Minuten gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Die Proben wurden mit 2 μ l 10x Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 3 μ l ATG-Nukleotid-Mix (dGTP; dTTP; dATP: Roche, Mannheim), 4 μ l ³²P-dCTP (Amersham Biosciences, Uppala, Schweden) und 1 μ l Klenow Enzym versetzt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zwischenzeitlich wurde auf ein G50-Spin-Column (Sphadex, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 150 μ l STE gegeben und 2 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach der Inkubationszeit wurde dem Reaktionsansatz 80 μ l STE zugefügt und auf die Spin Column gegeben und 2 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde 5 Minuten gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Von der Probe wurde 1 μ l zur Aktivitätsbestimmung abgenommen und gemessen.

STE: 10 mM TrisCl, pH 7,5 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
 10 mM NaCl (J.T. Backer, Deventer, Holland)
 1 M EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)

2.6 Hybridisierung genomischer DNA mit der radioaktiv markierten Sonde

Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde der Hybridisierungslösung zugegeben und bei 65°C im Hybridisierungssofen (UVP Laboratory and UV Products, Houston, USA) über Nacht inkubiert. Die Membran wurde bei 65°C zunächst kurz, dann 5 Minuten mit 2x SSC (*); 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich

GmbH, Steinheim), weiterhin zweimal 30 Minuten mit 0,2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Danach wurde die Membran zwischen zwei Frischhaltefolien (Filmpro, Ecopla, Frankreich) gelegt, in der Dunkelkammer ein Film (Kodak-Industrie, Cedex, France) aufgelegt und die Filmkassette bei -80 °C aufbewahrt. Nach drei Tagen wurde der Film entwickelt.

20x SSC: 3 M NaCl (J.T. Backer, Deventer, Holland)
 0,3 M Na₃citrat \cdot 2H₂O (Merck, Darmstadt)

2.7 RNA-Isolation

Von fünf Wochen alten Mäusen wurden verschiedene Gewebe entnommen und zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde jeder Probe 1 ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugefügt. Anschließend folgte eine Homogenisierung des Gewebes mit einem Ultra-Turrax Dispergiergerät (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen). Nach anschließender Lagerung auf Eis wurde den Proben jeweils 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt) zugefügt, vermischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 600 µl der oberen Phase wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze) zur Ausfällung der RNA hinzugegeben und durch Inversion vermischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit mit anschließender, wie oben beschriebener Zentrifugation. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol (Merck, Darmstadt) (mit DEPC (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) behandeltem H₂O verdünnt) gewaschen und 10 Minuten bei 13.000 und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand komplett entfernt wurde, wurde das Pellet in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung mit 4 µl dieser

Lösung in 400-facher Verdünnung in DEPC-H₂O gegen 400 µl DEPC-H₂O als Referenz bei einer Absorption von 260 nm.

2.8 Auftrennung und Membrantransfer von RNA (Northern Blot)

80 ml DEPC-behandeltes Wasser wurden mit 10 ml 10xMOPS-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Danach wurden 12 ml 37%-iges Formaldehyd (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Das Gel wurde unter dem Abzug gegossen. 10 µg der wie unter 2.5 isolierten RNA wurde jeweils mit 20 µl RNA-Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 65 °C auf dem Heizblock (Eppendorf AG, Hamburg) erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Das Gel wurde mit den Proben beladen und in einem 1x MOPS-Laufpuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 60 V für ca. 45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Im Folgenden wurde das Gel für 5 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) gefärbt und für zwei Stunden auf einem Schüttler und mehrmaligem Wasserwechsel gewaschen. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Danach wurde das Gel in 10x SSC-Puffer aquilibriert und über Nacht auf eine Hybond-N+Membran (Amersham Biosciences AB, Uppala, Schweden) transferiert. Nun wurde die RNA auf der Hybond-N+-Membran durch UV-Licht vernetzt, für 15 Minuten in 6xSSC inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran im Hybridisierungssofen (UVP Laboratory and UV Products, Houston, USA) für zwei Stunden bei 60 °C.

Die RELM γ -cDNA-Sonde war im Labor vorhanden und wurde wie in 2.4 beschrieben radioaktiv markiert. Nach Hybridisierung über Nacht bei 60 °C wurde die Membran zunächst für kurz, dann für 5 Minuten mit 2x SSC; 0,1 % SDS, anschließend zweimal für je 30 Minuten mit 0,5x SSC; 0,1 % SDS bei 60 °C im Hybridisierungssofen gewaschen. Die Membran wurde dann zwischen Frischhaltefolie gelegt und in der

Dunkelkammer ein Film aufgelegt. Die Filmkassette wurde bei -80 °C gelagert. Der Film wurde drei Tage später entwickelt.

10 x MOPS-Puffer:	0,4 M MOPS, pH 7 0,5 M Natriumacetat 10 mM EDTA
RNA-Probenpuffer:	720 µl Formamid 160 µl 10 x MOPS-Puffer 260 µl 37 % Formaldehyd 180 µl DEPC-behandeltes H ₂ O 100 µl 80 % Glycerol (in DEPC-behandeltem H ₂ O) 20 µl gesättigtes Bromphenolblau

2.9 Austesten von Antiseren mittels ELISA

Zunächst wurde in eine 96-Well-Platte (Becton Dickinson Labware, Franklin Lake, N.J., USA) 100 µl Beschichtungspuffer vorgelegt. Als Antigen zur Austestung der Antipeptid-Antiseren diente ein zur Verfügung gestelltes GST-RELM γ -Fusionsprotein, das in einer Ausgangskonzentration von 2 µg/ml vorlag. Durch sukzessive 1:2-Verdünnung mit dem vorgelegten Beschichtungspuffer wurde für jedes auszutestende Antiserum eine vertikal absteigende Verdünnungsreihe angelegt. Die 96-Well-Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Weiterhin wurde jedes Well nach vorherigem Leeren der Platte für 30 Minuten bei 37 °C mit 200 µl Blockierungspuffer (*) inkubiert. Danach wurde die Platte wieder ausgeleert und 100 µl der ersten Antikörper (1.: rab 365; A α -EKK 27; 2.: rab 367; AG α -NTE 27; 3.: rab 368; AG α -YGC 27) (Prof. Dr. Müller-Esterl, Frankfurt) in einer 1000-fachen Verdünnung (in Blockierungslösung) hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit Waschpuffer 3x gewaschen. Danach wurden 100 µl des Zweitantikörpers (anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-

gekoppelt) in einer 1000-fachen Verdünnung (in Blockierungslösung) hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte wieder 3x in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Substratlösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Extinktion bei 410 nm photometrisch gemessen.

Beschichtungspuffer:	15 mM Na ₂ CO ₃ (Merck, Darmstadt) 35 mM NaHCO ₃ , pH 9,6 (Merck, Darmstadt)
Blockierungspuffer:	PBS (20 mM Phosphat, pH 7,4 (*); 150 mM NaCl (J.T Backer, Deventer, Holland) 1 % BSA (Merck, Darmstadt) 0,005 % Tween 20 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
Waschpuffer:	PBS (Gibco, Grand Island, N.Y., USA) 0,005 % Tween (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
Substrat-Lösung:	0,1 M citric acid (Merck, Darmstadt) 0,1 M Na ₂ HPO ₄ , pH 4,5 (Merck, Darmstadt) 0,1 % ABTS (*) 0,012 % H ₂ O ₂ (*)

2.10 Analyse des Blutbildes transgener Mäuse

Nach Tötung 4-12 Wochen alter Mäuse wurde diesen nach Eröffnung des Thorax und anschließender Freipräparation der Brustorgane, mit einer Pipette 20 µl Blut aus dem Herz abgenommen und randständig auf einen Objektträger pipettiert. Im Folgenden wurde ein weiterer Objektträger an den Rand des Blutstropfens in einem 45°-Winkel angesetzt und zur anderen Seite des Objektträgers hin zügig ausgestrichen. Nach vollständiger Trocknung der Blutausrutsche wurde eine Färbung nach Pappenheim wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Ausstriche wurden zunächst für 4 Minuten in einer konzentrierten May-Grünwald-Lösung (Merck,

Darmstadt) inkubiert. Weiterhin wurden sie für 3 Minuten in einer 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnten May-Grünwald-Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Nun wurden die Präparate für 10 Minuten in einer 1:20 mit Weise-Puffer (*) verdünnten Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt und danach gespült. Nach der Färbung wurden sie an der Luft getrocknet. Die anschließende Analyse erfolgte mikroskopisch bei einer 40x Vergrößerung durch Auszählung der einzelnen Zellfraktionen im Sinne eines Differentialblutbildes.

2.11 Untersuchung des Einflusses von RELM γ auf die myeloblastäre Zelllinie M1

Zellen der myeloblastären Mauszelllinie M1 (ATCC, The Global Bioresource Center, USA) wurden in Kulturmedium bei 37°C und 5%-iger CO₂-Sättigung bis zu einer Zellkonzentration von 1.000.000 Zellen/ml inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 9 ml abgenommen, bei 1000 g abzentrifugiert und in antibiotikafreies Kulturmedium überführt. Je 500 μ l dieser Zellsuspension wurden im Folgenden in die Kavitäten einer 24-Well-Platte überführt. Pro Ansatz wurde 1 μ g DNA (pCMV4, pCMV4-RELM γ oder keine DNA) zu 50 μ l Serum/Antibiotika-freiem RPMI-Medium hinzugefügt. Weiterhin wurden pro Ansatz 2 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad) zu 50 μ l Serum/Antibiotika-freiem RPMI-Medium hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA mit der Lipofectamine 2000-Lösung kombiniert und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Schließlich wurde dieses Gemischs zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C und 5%-iger CO₂-Sättigung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 1000 g abzentrifugiert und in einer Konzentration von 250.000 Zellen/ml in M1-Kulturmedium aufgenommen. An den drei darauf folgenden

Tagen wurde die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses von RELMy auf die Differenzierung dieser Zellen wurden die transfizierten Zellen nicht in M1-Kulturmedium, sondern in konditioniertem Medium der Zelllinie WEHI-3 aufgenommen. Diese Zellen wurden zuvor in ihrem eigenen Kulturmedium für 3 Tage inkubiert und sezernieren Cytokine wie IL-6 oder CSF, die zu einer granulozytären Differenzierung von M1-Zellen führen (Zitat).

M1-Kulturmedium: 90% RPMI (Gibco, USA)
10% FBS (Merck, Darmstadt);
1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, NY, USA)

WEHI3-Kulturmedium: 90% IMDM (ATCC, USA)
10% FBS (Merck, Darmstadt);
1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA)

2.12 Herstellung von Gewebeschnitten

Nach Tötung der Mäuse wurden folgende Organe entnommen: Leber, Milz, Lunge, Nieren, Lymphknoten, Thymus, Herz und Sternum. Danach folgte die Fixierung in 37% Formalinlösung (Merck, Darmstadt) über 24 Stunden. Das Sternum wurde bei 37°C in einer 10% EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) über Nacht entkalkt. Weiterhin wurden die Organe nach der Fixierung zugeschnitten und in dafür vorgesehenen Kapseln in 80% Ethanol bis zur nachfolgenden Entwässerung aufbewahrt. Die Entwässerung und anschließende Infiltration mit Paraffin erfolgte im Autotechnikon (Firma Bavimed) nach folgendem Schema:

- 70% Ethanol (1-5h)
- 70% Ethanol (1h)
- 80% Ethanol (1h)

- 96% Ethanol (1h)
- 96% Ethanol (1h)
- Abs. Ethanol (1h)
- Abs. Ethanol (1h)
- Paraffin 60°C (1h)
- Paraffin 60°C (1h)
- Paraffin 60°C (1h)

Danach wurden die mit Paraffin infiltrierten Gewebe aus dem Autotechnikon entnommen, und für jedes Präparat flüssiges Paraffin in eine Metallkapsel gefüllt. Das Gewebestück wurde mit einer Pinzette auf dem Boden der Metallkapsel platziert und auf eine Eisplatte gestellt, damit durch sofortiges Erkalten des Paraffins das Gewebe auf dem Grund der Kapsel haften blieb. Nun wurde die Gewebekapsel auf die Metallkapsel platziert und nach Erkalten des Paraffins die Metallkapsel vom Block entfernt.

Weiterhin wurden die Blöcke nach Kühlung im Kühlschrank mit einem Schlittenmikrotom (Firma Jung) geschnitten. Zur Vorbereitung wurden die Paraffinblöcke auf einer Eisplatte gekühlt, ein Wasserbad auf 60°C erhitzt, und die Schlittenbahnen des Mikrotoms mit nicht harzendem Mikrotomöl (Firma Techno-Med) eingerieben und ein Einmalklingenhalter (Feather Mikrotome Blades, Japan) in der Halterung des Mikrotoms befestigt. Im Folgenden wurden Schnitte in einer Schichtdicke von 2 µm angefertigt. Diese Schnitte wurden mit einem Pinsel auf die Oberfläche des Wasserbades gelegt und auf einen Objektträger aufgezogen. Es folgte die Trocknung der Präparate. Unmittelbar vor des sich daran anschließenden Färbungsvorganges wurden die Schnitte zur Fixierung bei 60°C für ca. 2 h in einem Wärmeschrank fixiert.

2.13 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

In einer Färbeküvette wurden die fixierten Gewebeschnitte in folgender Reihenfolge inkubiert:

2x Xylol (*):	je 5 Minuten entparaffinieren
2x Ethanol 100%:	je 2 Minuten
Ethanol 96%:	2 Minuten
Ethanol 80%:	2 Minuten
Ethanol 70%:	2 Minuten
Ethanol 50%:	2 Minuten
Aqua dest.:	spülen
Hämatoxylin (Merck, Darmstadt):	10 Minuten
Leitungswasser:	2 Minuten
Eosin 0,1% (Merck, Darmstadt):	2 Minuten
Ethanol 80%:	kurz spülen
Ethanol 96%:	2 Minuten
2x Ethanol 100%:	je zwei Minuten
3x Xylol:	je 5 Minuten

Danach wurden die Präparate mit DPX (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) eingedeckt.

2.14 Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien zur Plattierung von Bakteriophagen-Bibliotheken

Zunächst wurden bei -80°C tiefgefrorene E.coli XL1-Bakterien (Stratagene, Kirkland, WA) kurz aufgetaut, etwas Zellsuspension mit einer Pipettenspitze abgenommen, auf einer LB-Platte (LB Agar: Invitrogen, Paisley, Scotland) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 10 ml LB-Medium (Invitrogen, Paisley, Scotland) mit 10 mM MgSO₄ (Merck, Darmstadt) und 2 % Maltose (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) in einem Schüttler für ca. 6-8h bei 37°C inkubiert, bis

nach photometrischer Messung eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,9 erreicht war. Diese Zellsuspension wurde für 10 Minuten auf Eis gestellt, anschließend bei 4°C und 2.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde schließlich in 5mM kaltem 10 mM MgSO₄ (Merck, Darmstadt) aufgenommen.

2.15 Plattierung der Bakteriophagen-Bibliotheken

Je 9 ml flüssiger TOP-Agar wurde in 15 ml-Reaktionsgefäßen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J., USA) für 2 Stunden bei 45°C im Wasserbad vorgewärmt. Danach wurde zu jeweils 200µl der kompetenten XL1-Bakterien (siehe 2.14) eine verdünnte Bakteriophagen-Suspension (pro Ansatz 30000 Phagen) gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden diese Ansätze dem vorgewärmten TOP-Agar zugefügt, direkt auf vorgewärmte LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die beiden eingesetzten Bakteriophagen-Bibliotheken wurden von den Firmen Stratagene (genomische Bibliothek der Maus als Positivkontrolle) und Invitrogen (cDNA-Bibliothek aus humanem Knochenmark) bezogen. In beiden Fällen wurden 10 Ansätze ausplattiert, wodurch insgesamt ca. 300000 Phagenklone durch sogenannte Plaques im Bakterienrasen sichtbar wurden.

Top-Agar (500 ml): 10g LB broth (Invitrogen, Paisley, Scotland)
 3,6 g Agarose (Seakem, BMA, Rockland, ME, USA)
 10 mM MgSO₄ (Merck, Darmstadt)

2.16 Hybridisierung der Phagenbibliothek

Am nächsten Tag folgte der Transfer der über Nacht ausgebildeten Phagenklone auf Nitrocellulosefilter (Amersham Biosciences AB, Uppala, Schweden), wobei pro Platte zwei Filter angelegt wurden. Diese wurden anschließend für 7 Minuten in Denaturierungslösung, danach 2x für 3 Minuten in Neutralisierungslösung inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in 2x SSC wurde die gebundene Bakteriophagen-DNA durch UV-Bestrahlung kovalent mit der Membran quervernetzt. Schließlich wurden die Filter für zwei Stunden in Hybridisierungspuffer bei 37 °C inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde die zur Verfügung gestellte RELM γ -cDNA-Sonde wie in 2.5 beschrieben radioaktiv markiert. Anschließend wurde nach Überführung der Filter in ein neues Gefäß mit Hybridisierungspuffer diese Sonde zugegeben und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Filter zunächst 2x 5 Minuten bei 37 °C mit 2xSSC; 0,5% SDS, danach 2x 45 Minuten bei 40 °C mit 1xSSC; 0,5% SDS gewaschen. Anschließend wurde ein Film aufgelegt und die Filmkassette bei -80 °C exponiert. Die auf dem Film sichtbaren Punkte wurden mit den Markierungen auf den bei 4 °C gelagerten Phagenplatten abgeglichen, die dementsprechenden Phagenkolonien wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen und in 1ml SM-Buffer bei 4 °C über Nacht eluiert. Dieser experimentelle Arbeitsvorgang wurde im Folgenden mit den in SM-Puffer gelösten Phagen in einer zweiten Runde wiederholt, wobei 1 μ l einer 1:10-Verdünnung der betreffenden Phagensuspensionen eingesetzt wurde.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl (J.T. Backer, Deventer, Holland)
0,5 M NaOH (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)

2 Material und Methoden

Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl (J.T. Backer, Deventer, Holland)
0,5 M Tris pH 8 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)

Hybridisierungspuffer: 30 ml 20x SSC (siehe 2.6)
2,5 ml 20% SDS (Sigma-Aldrich, Steinheim)
5 ml Denhardt Solution (Sigma-Aldrich GmbH,
Steinheim)
30 ml 25% Dextransulfat (Sigma-Aldrich GmbH,
Steinheim)
20 ml Formamid (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
0,2 ml Heringssperma-DNA (Roche)
Mit H₂O auf 100 ml auffüllen

SM-Puffer: 100 mM NaCl (J.T. Backer, Deventer, Holland)
10 mM MgSO₄ (Merck, Darmstadt)
35 mM Tris, pH 7,5 (Sigma-Aldrich GmbH,
Steinheim)
0,01 % Gelatine (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)

2.17 Herstellung einer humanem Resistin-cDNA-Sonde

Um die Expression von murinem und humanem Resistin zu vergleichen, sollte zunächst ein Teilfragment der humanen Resistin-cDNA durch PCR amplifiziert werden, um es als Sonde im Northern Blot einsetzen zu können. Hierzu wurde RNA aus humanem Knochenmark (Invitrogen) unter Zuhilfenahme des „Cloned AMV First-Strand cDNA synthesis Kits“ (Invitrogen) durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. 1 µg der RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)₂₀-Primer (50 µM) und 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) versetzt und mit DEPC-behandeltem H₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Die RNA wurde in diesem Mix für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Pro Reaktionsansatz wurden anschließend 4 µl des 5 x Synthese-Puffers, 1 µl Dithiothreitol (0.1 M), 1 µl Rnase OUTTM (40 U/µl), 1 µl DEPC-

behandeltes H₂O und 1 µl Cloned AMV RT (15 U/µl) zugesetzt. Die reverse Transkription erfolgte anschließend für 60 Minuten bei 50 °C. Die Reaktion wurde danach durch eine 5-minütige Inkubation bei 85 °C terminiert.

Die resultierende cDNA wurde schließlich als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt, die wie in 2.2 beschrieben durchgeführt wurde. Die verwendeten Primer (5'-AGAAGCCATCAATGAGAGG-3' und 5'-CTCCAGGTTTATTTCCAGC-3') aus der humanen Resistin-cDNA wurden unter Zuhilfenahme der MacVectorTM-Software (Firma Accelrys) ausgewählt. Das hierdurch entstehende PCR-Produkt wurde auf einem 1,5% Agarose-Gel aufgetragen, durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht und als Bande ausgeschnitten. Zum Herauslösen der DNA aus den Gelstücken wurde der „Quiaex II Gel extraction kit“ (Firma Qiagen) eingesetzt. Hierzu wurden 500 µl des Puffers QX1 sowie 10 µl der DNA-bindenden Quiaex-Beads zu den Gelstücken hinzugefügt und für 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach vollständiger Auflösung der Agarose wurden die Beads mit der gebundenen DNA für 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden anschließend 1-mal mit 500 µl Puffer QX1 und 2-mal mit 500 µl Puffer PE gewaschen und danach getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte schließlich durch Resuspension der Beads in 20 µl H₂O. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde erneut für 2 Minuten zentrifugiert, und der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das hierdurch isolierte PCR-Produkt wurde anschließend unter Zuhilfenahme des „TOPO TA Cloning Kits“ (Invitrogen) in einen Vektor stabil integriert. Hierzu wurde 1 µl der aufgereinigten DNA mit 3 µl H₂O, 1 µl Salz-Lösung und 1 µl pTOPOII-Vektor versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl dieses Ansatzes wurde danach zu den kompetenten E.coli-Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt und eine Stunde

bei 37°C geschüttelt. 50 µl dieser Suspension wurden anschließend auf einer Ampicillin-haltigen LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien mit einer Pipette in 3 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und für 6 Stunden bei 37°C geschüttelt.

2.18. Isolierung des humanen Resistin-cDNA-Fragments zur radioaktiven Markierung

Aus den in 2.17 beschriebenen Kulturen wurde anschließend unter Zuhilfenahme des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Firma Qiagen) die Plasmid-DNA isoliert. Die Bakterien wurden zunächst abzentrifugiert und in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer, 350 µl P3-Puffer und anschließender Vermischung wurde das Protein abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in eine Qiaprep-Säule überführt. Die gebundene DNA wurde mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen und schließlich in 50 µl H₂O eluiert. Die erfolgte Integration des PCR-Produkts wurde durch eine Restriktion mit dem Enzym EcoRI überprüft. Hierzu wurden 17 µl der gereinigten Plasmide mit 2 µl eines 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers (Puffer H, Roche) und 1 µl des Restriktionsenzym EcoRI versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen, wodurch das Resistin-cDNA-Fragment von dem Vektor getrennt werden konnte.

Zwei der positiven Klone wurden durch Sequenzierung verifiziert. Hierzu wurden in einem Endvolumen von 20 µl je 500 ng der gereinigten Plasmid-DNA mit 6 µl eines 2.5-fach konzentrierten Reaktionspuffers (Applied Biosciences), 15 pmol Primer (M13 forward, Invitrogen) und 2 µl BigDye (Applied Biosciences) versetzt und im Thermocycler folgendermaßen inkubiert:

25 Zyklen: 10 Sekunden bei 96°C
 5 Sekunden bei 50°C
 4 Minuten bei 60°C

Anschließend wurde das Sequenzier-Produkt mit 80 µl H₂O versetzt und durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat (pH6) und 300 µl Ethanol ausgefällt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde schließlich zur Sequenzierung im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie abgegeben. Nachdem hierdurch die erwartete Sequenz bestätigt werden konnte, konnte das humane Resistin-cDNA-Fragment für die Northern Blot-Analyse eingesetzt werden.

Diese erfolgte wie in 2.8 beschrieben, wobei RNA aus humanem Fettgewebe und Knochenmark (Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert wurde, die anschließend mit der radioaktiv markierten humanen Resistin-cDNA-Sonde hybridisiert wurde. Parallel hierzu wurde ein Northern Blot mit Maus-RNA aus den gleichen Geweben und einer Maus-Resistin-cDNA-Sonde durchgeführt, die in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand.

2.19 Untersuchung des Einflusses von Resistin auf die promyelozytische Zelllinie HL60

Zellen der humanen promyelozytischen Zelllinie HL60 (ATCC, The Global Bioresource Center, USA) wurden in Kulturmedium bei 37°C und 5%-iger CO₂-Sättigung bis zu einer Zellkonzentration von 250.000 Zellen/ml inkubiert. Weiterhin wurden 25 µg humanes Resistin (Research Diagnostics) in 250 µl destilliertem H₂O gelöst, so daß Resistin 5 µM (100 µg/ml) konzentriert war. 3 ml der Zellsuspension wurden mit 3 µl dieser Resistin-Lösung versetzt, sodaß eine finale Konzentration von 100 ng/ml erreicht wurde. Je 500 µl dieser Ansätze wurden in die Kavitäten einer 24-Well-Platte

überführt und bei 37°C und 5 %-tiger CO₂-Sättigung im Brutschrank inkubiert. An den zwei folgenden Tagen wurden die jeweiligen Zellkonzentrationen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In einem zweiten Experiment wurde der Einfluss von Resistin auf die granulozytäre Differenzierung der HL60-Zellen untersucht. Hierzu wurde 9-cis-Retinsäure (10⁻⁶ M finale Konzentration), bzw. Resistin (500 ng/ml finale Konzentration) zugegeben und ebenfalls an den beiden darauffolgenden Tagen die Zelldichte bestimmt.

HL60-Kulturmedium: 90% RPMI (Gibco, USA)
10% FBS (Merck, Darmstadt);
1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, NY, USA)

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung transgener ApoE-RELM γ -Mäuse

Zur funktionellen Untersuchung von RELM γ *in vivo*, sollte ein transgenes Mausmodell untersucht werden, das in der Experimentellen Unfallchirurgie generiert worden war. Da es sich bei RELM γ um ein sekretiertes Protein handelt, wurde eine ektopische Expression in Hepatozyten gewählt, die zu einer erhöhten Serumkonzentration von RELM γ führen sollte (Simonet et al., 1997; Elefteriou et al., 2004). Hierfür wurde in ein Plasmid zur Hepatozyten-spezifischen Expression die RELM γ -cDNA eingefügt, die somit unter der Kontrolle der regulatorischen Regionen des humanen Apolipoprotein(E)-Gens steht (Abbildung 1). In Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg wurde dieses Konstrukt in Maus-Zygoten mikroinjiziert, die anschließend einer scheinchwangeren Maus implantiert wurden.

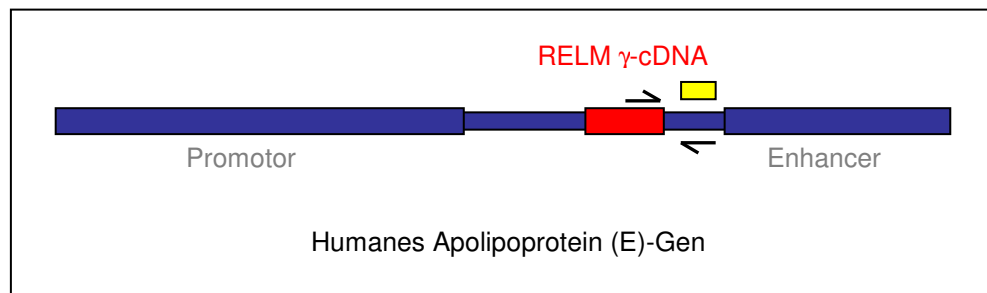


Abbildung 5: RELM γ -cDNA-Konstrukt zur Generierung transgener Mäuse.

Das Konstrukt besteht aus den regulatorischen Regionen des Apolipoprotein-(E)-Gens (Promotor und Enhancer), in das die für RELM γ kodierende cDNA eingefügt wurde. Die Lage der Primer zur Genotypisierung durch PCR ist durch Pfeile gekennzeichnet. Das Fragment zum Nachweis des Transgens im Southern-Blot ist in gelb dargestellt.

Von der Nachkommenschaft dieser Mäuse wurde aus Schwanzbiopsien DNA gewonnen, um durch eine PCR-Reaktion mit Transgen-spezifischen Primern (siehe Abb. 5) zu untersuchen, ob es zu einer genomischen Integration des DNA-Konstrukts kam. Hierbei zeigte sich, daß in 3 von insgesamt 32 analysierten Mäusen das Transgen durch die PCR-Reaktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 6).

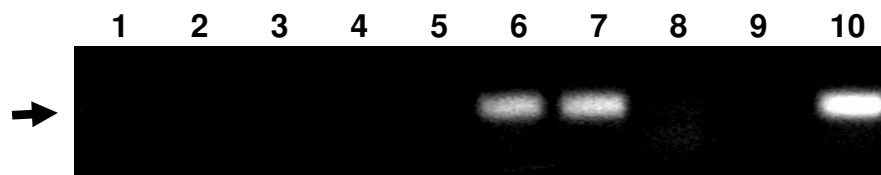


Abbildung 6: Genotypisierung der ApoE-RELM γ -Mäuse durch PCR. Aus Schwanzbiopsien wurde DNA gewonnen und in einer Genotypisierung durch PCR mit Transgen-spezifischen Primern eingesetzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte ein spezifisches PCR-Produkt bei 3 von 10 Mäusen nachgewiesen werden (Pfeil).

Diese sogenannten „Founder-Mäuse“ wurden anschließend mit Wildtyp-Mäusen verpaart, um drei transgene Linien zu etablieren. Die Nachkommenschaft der betreffenden Verpaarungen wurde zunächst durch PCR genotypisiert. Um jedoch falsch positive Ergebnisse auszuschließen, die durch diese Methode erzielt werden könnten, wurde dazu übergegangen, die Genotypisierung routinemäßig mittels Southern Blot durchzuführen. Hierzu wurde die aus Schwanzbiopsien gewonnene DNA mit dem Restriktionsenzym Xba I geschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel auf eine Membran transferiert. Diese wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde (siehe Abb. 5) inkubiert, die nach Hybridisierung und anschließender Autoradiographie zur Detektion eines Transgen-spezifischen Restriktionsfragments von 5.5 kb führte (Abb. 7).

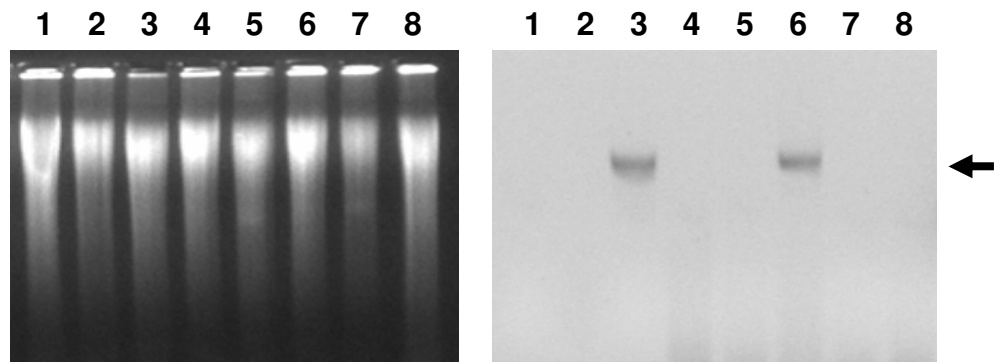


Abbildung 7: Genotypisierung der ApoE-RELM γ -Mäuse durch Southern Blot. Aus Schwanzbiopsien gewonnene DNA wurde mit Xba I geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert (links). Nach dem Membran-Transfer und der anschließenden Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Transgen-spezifischen Sonde (rechts) zeigte sich auf dem Röntgenfilm bei den transgenen Tieren eine spezifische Bande bei 5.5 kb (Pfeil).

3.2 Analyse der Expression von RELM γ in der Leber durch Northern Blot

Im nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob die ApoE-RELM γ -Mäuse das integrierte Transgen Leber-spezifisch exprimieren. Hierzu wurde zunächst aus Lebergewebe der Nachkommenschaft der drei verschiedenen „Founder-Mäuse“ RNA isoliert. Diese wurde im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten RELM γ -cDNA-Sonde inkubiert. Nach der anschließenden Autoradiographie zeigte sich auf dem Röntgenfilm eine starke Expression von RELM γ in der Leber transgener Mäuse, während in Wildtyp-Mäusen kein Signal detektiert werden konnte (Abb. 8). Bezüglich der Expressionsrate konnte kein auffälliger Unterschied zwischen den verschiedenen „Founder-Linien“ festgestellt werden, weshalb sich die weiterführende Charakterisierung auf zwei der drei Linien beschränkte.

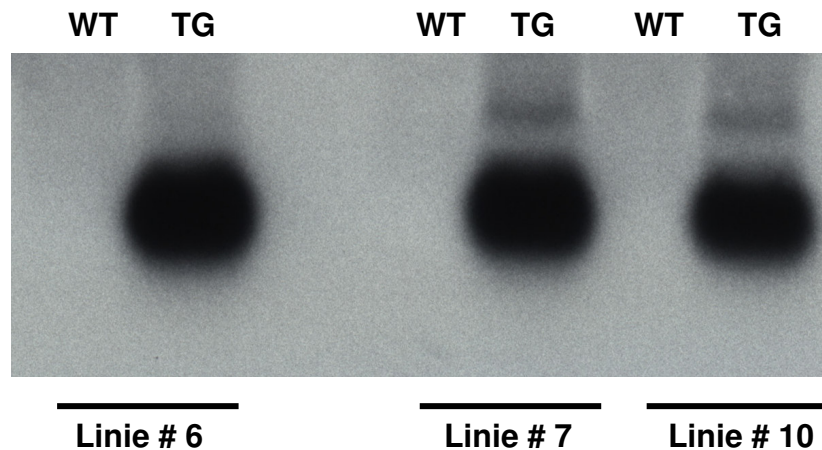


Abbildung 8: Expressionsanalyse von RELM γ in den transgenen Mauslinien. Leber-RNA aus der Nachkommenschaft der Founder 6, 7 und 10 (siehe Abb. 6) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer RELM γ -cDNA-Probe hybridisiert. Es zeigte sich eine spezifische Bande in transgenen Mäusen, jedoch nicht in Wildtyp-Mäusen aller drei Linien.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Expression des Transgens Hepatozyten-spezifisch erfolgt. Hierzu wurde aus verschiedenen Geweben von Wildtyp- und transgenen Mäusen RNA isoliert und im Northern Blot mit der RELM γ -cDNA Sonde inkubiert. Schon bei geringer Expositionszeit des Röntgenfilms zeigte sich, daß die starke Über-Expression von RELM γ bei den transgenen Mäusen der „Founder-Linien“ 6 und 7 in der Tat auf die Leber beschränkt ist (Abb. 9). Dementsprechend ist davon auszugehen, daß dieser experimentelle Ansatz zum Erfolg geführt hat und daß die transgenen Mäuse eine erhöhte RELM γ -Serumkonzentration aufweisen könnten.

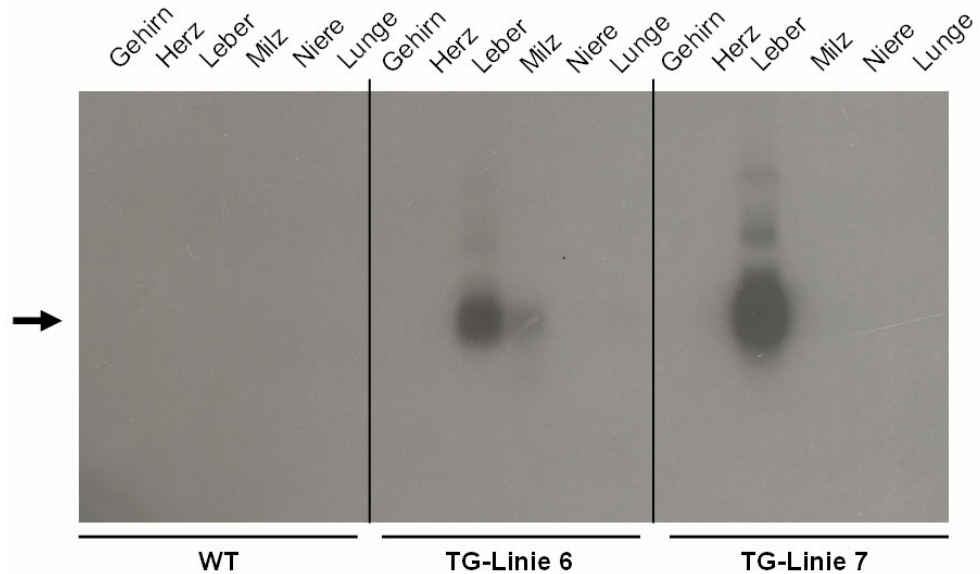


Abbildung 9: Leber-spezifische Transgen-Expression in ApoE-RELM γ -Mäusen. RNA aus verschiedenen Geweben wurde nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert, die mit einer RELM γ -cDNA-Sonde hybridisiert wurde. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen zeigte sich in den transgenen Mäusen der Linien 6 und 7 eine starke und selektive Expression in der Leber.

Um die RELM γ -Serumkonzentration quantitativ erfassen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Müller-Esterl in Frankfurt drei Antiseren gegen Peptide aus der RELM γ -Sequenz hergestellt. Die Eignung dieser Antiseren zur Konzentrationsbestimmung wurde zunächst mittels ELISA untersucht, wobei ein zur Verfügung gestelltes rekombinantes GST-RELM γ -Fusionsprotein als Kontrolle diente. Dies wurde auf einer 96-well-Platte in einer Verdünnungsreihe aufgetragen und mit den drei verschiedenen Antiseren (α -EKK 27; α -NTE 27 und α -YGC 27) inkubiert. Die Bindung dieser Antikörper wurde nach Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen-IgG) durch Umsetzung eines spezifischen Substrats bei 410 nm gemessen. Hierbei zeigte sich bei allen drei Antiseren eine positive

Reaktion, wobei das Antiserum gegen das Peptid NTE-27 die stärkste Reaktion aufwies (Abb. 10).

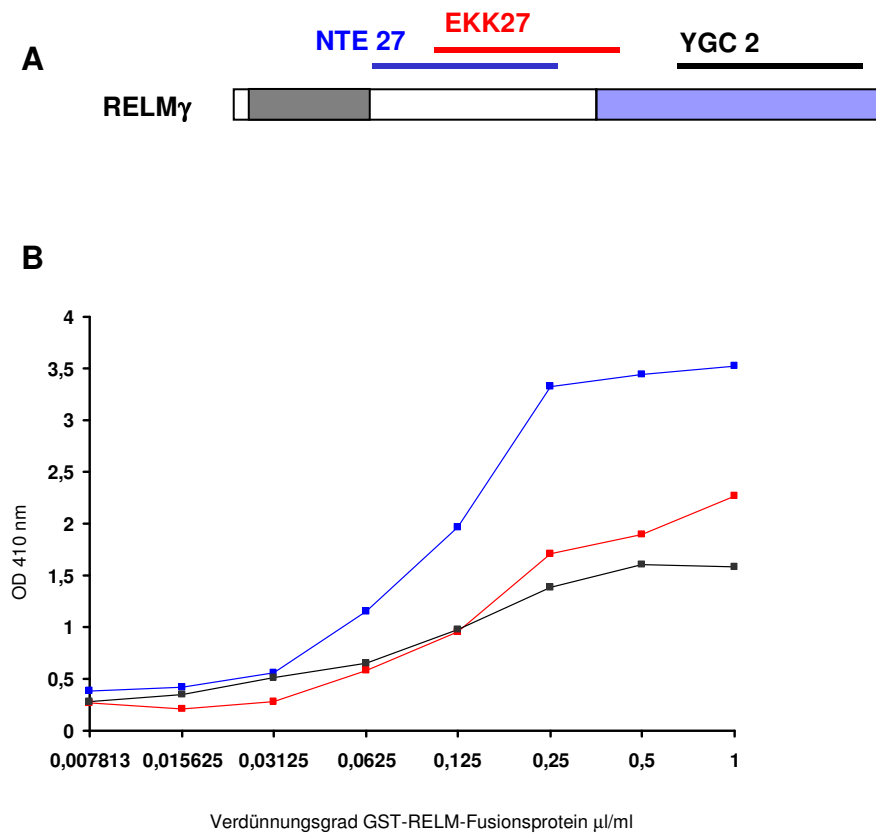


Abbildung 10: Vergleich von Antipeptid-Antiseren gegen RELM γ im ELISA.

(A) Drei Antiseren gegen Peptide aus der RELM γ -Sequenz wurden durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt. Die Lage dieser Peptide ist oben dargestellt. Die Signalsequenz und die Cystein-Domäne von RELM γ sind grau, bzw. hellblau unterlegt. (B) Die Ergebnisse des ELISA sind unten dargestellt. Das GST-RELM γ -Fusionsprotein wurde von allen drei Seren detektiert, wobei der Antikörper gegen das Peptid NTE-27 die stärkste Reaktion zeigte.

Es war jedoch nicht möglich, die Serumkonzentration von RELM γ in Wildtyp- und transgenen Mäusen mit der gleichen Methode zu bestimmen (nicht gezeigt). Die Begründung hierfür liegt entweder darin, daß die Antiseren nicht spezifisch genug sind, oder daß die RELM γ -Konzentration in den Maus-Seren unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Zur Lösung dieses Problems sollten entweder die Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie

aufgereinigt werden, oder die Seren der Mäuse fraktioniert werden. Alternativ dazu wurde damit begonnen, einen Antikörper gegen das GST-RELM γ -Fusionsprotein zu generieren, das theoretisch ein besseres Antigen sein sollte als die aus der Sequenz abgeleiteten Peptide. Diese Etablierungen gehen jedoch über den Rahmen dieser Dissertation hinaus.

3.3 Phänotypische Analyse der ApoE-RELM γ -Mäuse

Nach der initialen Charakterisierung der ApoE-RELM γ -Mäuse stellte sich die Frage, zu welchen phänotypischen Konsequenzen die Hepatozyten-spezifische Über-Expression von RELM γ in der Maus führt. Aufgrund der zuvor beschriebenen *in vitro*-Befunde (siehe Abb. 4), durch die ein proliferativer Effekt von RELM γ auf die promyelozytische Zelllinie HL60 nachgewiesen werden konnte, wurde davon ausgegangen, daß eine Erhöhung der RELM γ -Serumkonzentration einen Einfluss auf die Hämatopoese haben könnte. Aus diesem Grund wurden zunächst Blutausstriche von 6 Wochen alten Mäusen angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich eine auffällig erhöhte Anzahl kernhaltiger Zellen in den Blutausstrichen transgener Mäuse (Abb. 11). In einzelnen Fällen wurden auch sogenannte Gumprechtschollen gefunden, die zerplatzten kernhaltigen Zellen entsprechen und die in Ausstrichen von Wildtyp-Mäusen nicht gefunden wurden. Bei stärkerer Vergrößerung konnten die kernhaltigen Zellen eindeutig bestimmten Differenzierungs-Stadien zugeordnet werden, wobei auffiel, daß die Mehrzahl der Zellen in den ApoE-RELM γ -Mäusen dem undifferenzierten Stadium der Myeloblasten entsprach.

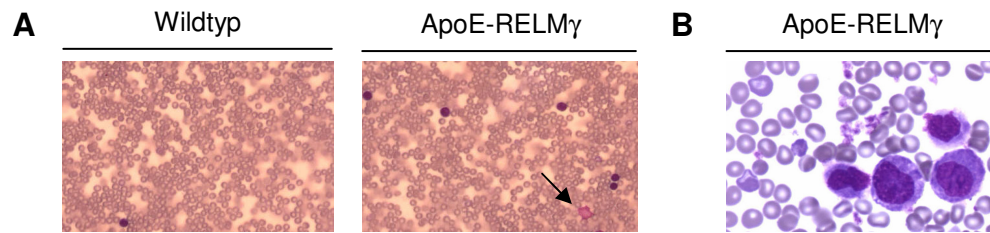


Abbildung 11: Vergleich von Blutausstrichen von Wildtyp- und ApoE-RELM γ -Mäusen. (A) In der Gesamt-Übersicht fällt auf, daß die Anzahl kernhaltiger Zellen in den transgenen Mäusen deutlich erhöht ist. Gumprechtschollen (durch den Pfeil gekennzeichnet) wurden ebenfalls in den Ausstrichen der transgenen Mäuse gefunden. (B) Bei stärkerer Vergrößerung konnten die meisten der kernhaltigen Zellen als Myeloblasten identifiziert werden.

Um diesen auffälligen Unterschied auch quantitativ zu erfassen, wurde die durchschnittliche Anzahl der Myeloblasten in den Blutausstrichen manuell ausgezählt. Dies erfolgte ohne vorherige Kenntnis des Genotyps an Ausstrichen von 10 Wildtyp-Mäusen und 10 transgenen Mäusen von 2 verschiedenen „Founder-Linien“. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Myeloblasten pro 10 Gesichtsfeldern in den transgenen Blutausstrichen. Obwohl dies für beide Founder-Linien galt, war der Unterschied zu den Wildtyp-Kontrollen für die Linie #7 etwas stärker, weshalb die weiterführende Untersuchung mit der Nachkommenschaft der Linie #7 durchgeführt wurde.

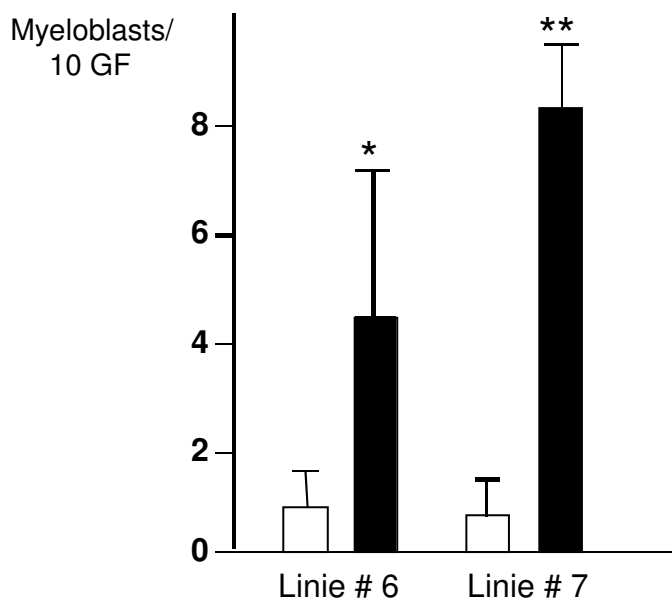


Abbildung 12: Anzahl der Myeloblasten in Blutausstrichen von Wildtyp- und ApoE-RELM γ -Mäusen. Die Anzahl der Myeloblasten pro 10 Gesichtsfeldern ist in den transgenen Mäusen beider „Founder-Linien“ im Vergleich zu den Wildtyp-Kontroll-Tieren signifikant erhöht. Die Balken geben Mittelwerte und Standardabweichung an (n=5). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**).

Aufgrund dieser Befunde, die für einen myeloproliferativen Effekt von RELM γ sprechen, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob RELM γ *in vitro* eine Wirkung auf Myeloblasten hat. Hierzu wurde die myeloblastäre Mauszelllinie M1 mit einem RELM γ -Expressionsplasmid (pCMV-RELM γ), bzw. mit einem Kontrollplasmid (pCMV) transfiziert. Durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer an den folgenden Tagen zeigte sich bei den mit RELM γ transfizierten Zellen eine signifikant erhöhte Zelldichte im Vergleich zu nicht transfizierten, bzw. Kontroll-transfizierten Zellen (Abbildung 13).

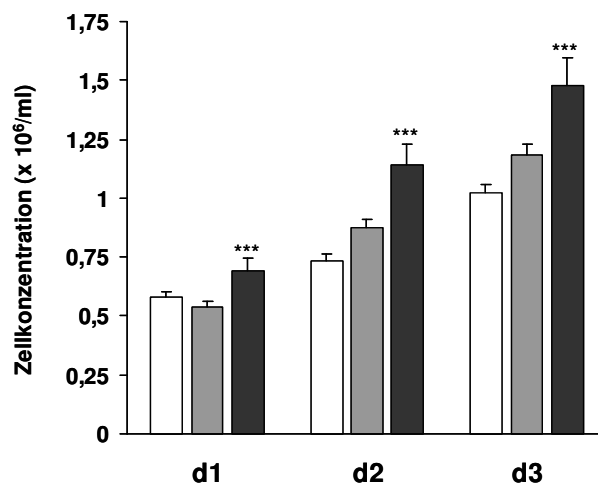


Abbildung 13: Proliferativer Effekt von RELM γ auf die myeloblastäre Zelllinie M1. Nicht-transfizierte (weiße Balken), Kontroll-transfizierte (graue Balken) und RELM γ -transfizierte (schwarze Balken) Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion (d0) auf eine Zelldichte von 250.000 Zellen/ml gebracht. An drei aufeinanderfolgenden Tagen (d1-d3) wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. An allen drei Zeitpunkten zeigte sich eine signifikant erhöhte Zelldichte bei den RELM γ -transfizierten Zellen. Die Balken geben Mittelwerte und Standardabweichung an (n=9). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $p < 0.005$ (**), $p < 0.0005$ (***)

Um den Einfluß von RELM γ auf die Differenzierung von Myeloblasten zu untersuchen, wurde eine weitere Transfektion unter gleichen Bedingungen durchgeführt, allerdings wurden die Zellen nach der Transfektion in WEHI-3-konditioniertem Medium kultiviert. Dieses Medium enthält von den WEHI-3-Zellen produzierte Zytokine wie GSA (granulocyte stimulating activity) und Interleukin-3 (IL-3), die eine Differenzierung von M1-Zellen zu Makrophagen bei gleichzeitiger Inhibition der Zellproliferation vermitteln. Auch in diesem Experiment zeigte sich, daß die Zelldichte in den mit RELM γ transfizierten Zellen gegenüber den Kontroll-transfizierten Zellen signifikant erhöht war (Abb. 14). Dementsprechend scheint RELM γ einen proliferativen Effekt auf Myeloblasten auszuüben, der der

Differenzierung entgegenwirkt. Ein solcher Effekt steht im Einklang mit der in den transgenen Mäusen nachgewiesenen Vermehrung der Myeloblasten-Population im peripheren Blut (siehe Abb. 12).

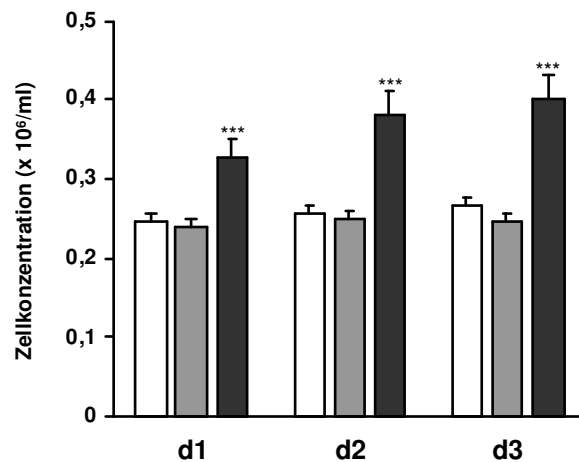


Abbildung 14: Effekt von RELM γ auf die Differenzierung der myeloblastären Zelllinie M1. Nicht-transfizierte (weiße Balken), Kontroll-transfizierte (graue Balken) und RELM γ -transfizierte (schwarze Balken) Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion (d0) in WEHI-3-konditioniertes Medium überführt und auf eine Zelldichte von 250.000 Zellen/ml gebracht. An drei aufeinanderfolgenden Tagen (d1-d3) wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die Zelldichte ermittelt. Zu allen drei Zeitpunkten zeigte sich eine signifikant erhöhte Zelldichte bei den RELM γ -transfizierten Zellen. Die Balken geben Mittelwerte und Standardabweichung an (n=9). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $p < 0.0005$ (***) .

Da die Auffälligkeiten in den Blutaussstrichen der ApoE-RELM γ -Mäuse (Abb. 11) auf eine myeloische Leukämie hindeuteten, sollte desweiteren untersucht werden, ob dies auch zu histopathologischen Veränderungen führt. Deshalb wurden verschiedene Organe (Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz, Sternum (Knochenmark) und Thymus) von Wildtyp- und transgenen Mäusen präpariert und in Parafin eingebettet. Anschließend wurden Gewebeschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Bei der mikroskopischen Auswertung

der Präparate zeigten sich jedoch keine auffälligen Unterschiede zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen (n=5) im Alter von 6 Wochen (Abb. 15), was durch eine unabhängige Begutachtung eines Hämatopathologen (Prof. Dr. K. Kamino, Hannover) bestätigt wurde.

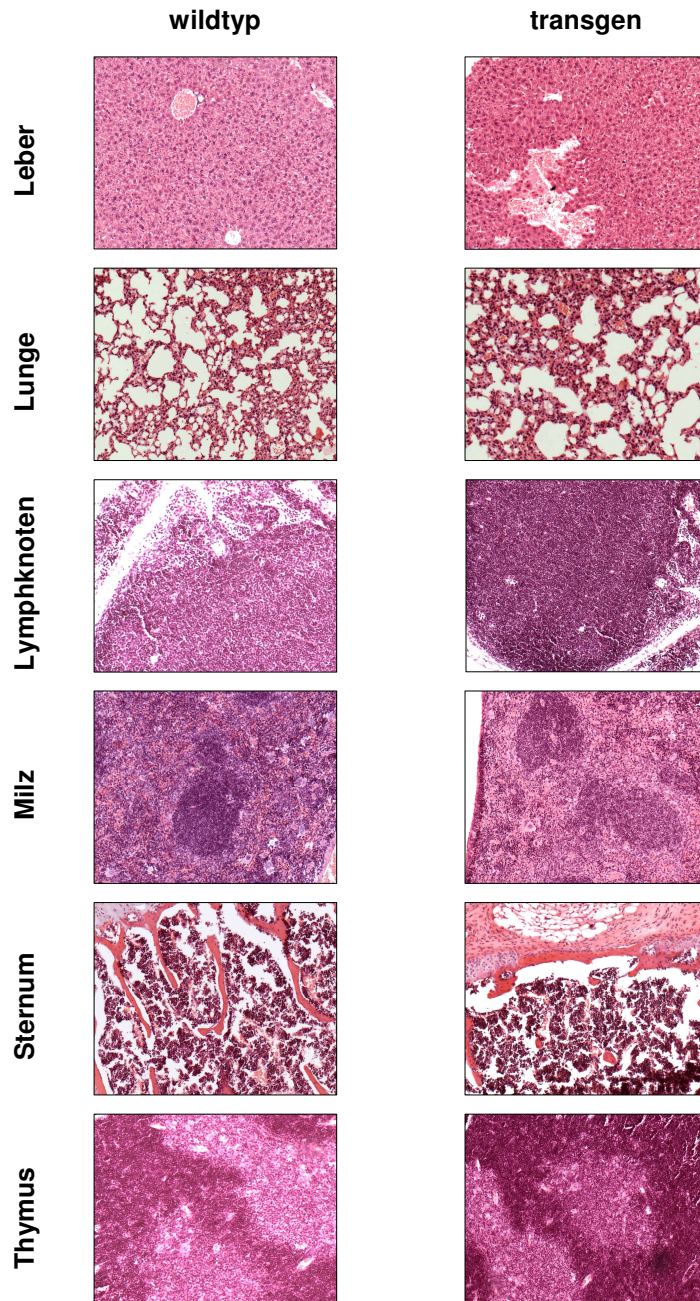


Abbildung 15: Histopathologische Analyse verschiedener Gewebe. Die Gewebeschnitte wurden nach Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Der histopathologische Vergleich von Wildtyp- und ApoE-RELM γ -Mäusen (n=5) ergab keinen auffälligen Unterschied im Alter von 6 Wochen.

Es muss jedoch angemerkt werden, daß sich in einer der fünf untersuchten ApoE-RELM γ -Mäuse ein hämorrhagischer Infarkt mit leukämischer Infiltration in der Lunge zeigte (Abb. 16). Auch wenn dies nur ein Einzelbefund war, steht dieser jedoch im Einklang mit der nachgewiesenen Erhöhung der Myeloblasten-Zahl in den ApoE-RELM γ -Mäusen. In zukünftigen Studien ist es deshalb geplant, eine größere Gruppe von Tieren in einem deutlich höheren Alter (6-18 Monate) zu untersuchen, da sich der histopathologische Phänotyp in Analogie zur chronischen myeloischen Leukämie im Menschen verzögert entwickeln könnte.

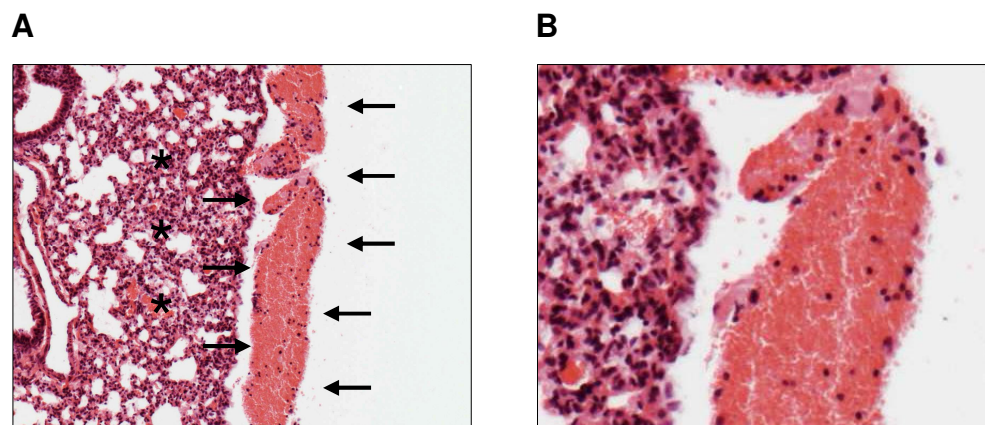


Abbildung 16: Histopathologische Veränderung der Lunge einer ApoE-RELM γ -Maus. (A) Ein randständiger hämorrhagischer Infarkt (Pfeil) wurde in dem Lungenpräparat einer ApoE-RELM γ -Maus beobachtet. (Infarkt mit Pfeil markiert; intaktes Lungengewebe mit * markiert.) **(B)** Bei stärkerer Vergrößerung zeigten sich violett angefärbte leukämische Zellen in diesem Areal.

3.4 Identifizierung eines humanen RELM γ -Orthologs

Die bislang erzielten Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von RELM γ bei der Myelopoese hin, die vor dem Hintergrund der myeloischen Leukämien von klinischer Relevanz sein könnte. Da eine solche Funktion jedoch bislang nur für murines RELM γ

nachgewiesen werden konnte, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation ein humanes RELM γ -Ortholog gefunden werden. Das RELM γ -kodierende Gen liegt im Maus-Genom zusammen mit RELM α und RELM β in einem Cluster auf Chromosom 16. Im humanen Genom befindet sich in der synthetischen Region auf Chromosom 3 allerdings nur das Gen für RELM β , während für RELM α und RELM γ keine homologen Sequenzen in dieser Region gefunden wurden. Aus diesem Grund war es möglich, daß kein humanes Ortholog zu RELM γ auf genomischer Ebene existiert.

Um dies experimentell zu bestätigen oder zu falsifizieren, wurde zunächst eine Bakteriophagen-Bibliothek mit humaner Knochenmark-cDNA auf das Vorkommen RELM γ -ähnlicher Sequenzen untersucht. Nach Ausplattierung der Bakteriophagen und anschließendem Transfer der über Nacht entstandenen „Plaques“ auf entsprechende Membranen, wurden diese mit einer radioaktiv markierten Maus-RELM γ -cDNA-Sonde über Nacht inkubiert. Die Filter wurden anschließend bei niedrig stringenten Bedingungen gewaschen, um auch die Hybridisierung mit ähnlichen, nicht nur mit identischen Sequenzen, zu gewährleisten. Als Positivkontrolle für dieses Experiment wurde parallel eine Bakteriophagen-Bibliothek mit genomischer Maus-DNA unter gleichen Bedingungen hybridisiert.

In einer ersten Hybridisierungsrunde zeigten sich auf den aufgelegten Röntgenfilmen Signale, die bei der genomischen Maus-Bibliothek jedoch wesentlich stärker waren als bei der humanen Knochenmark-Bibliothek (Abb. 17). Die Bakteriophagen aus den betreffenden „Plaques“ wurden anschließend isoliert, um eine zweite Hybridisierungsrunde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchzuführen. Hierbei zeigten sich bei mehreren Klonen der genomischen Maus-Bibliothek deutliche Signale auf dem Röntgenfilm. Im Gegensatz dazu wurden bei der humanen Knochenmark-Bibliothek keine Signale mehr gefunden, weshalb davon ausgegangen werden muss, daß es sich in der ersten Runde

um unspezifische Bindung gehandelt hatte. Diese Daten deuten darauf hin, daß im menschlichen Knochenmark kein RELM γ -Ortholog mit ausgeprägter Sequenzhomologie exprimiert wird, zumindest keines, das durch Hybridisierung bei niedrig stringenten Bedingungen identifiziert werden kann.

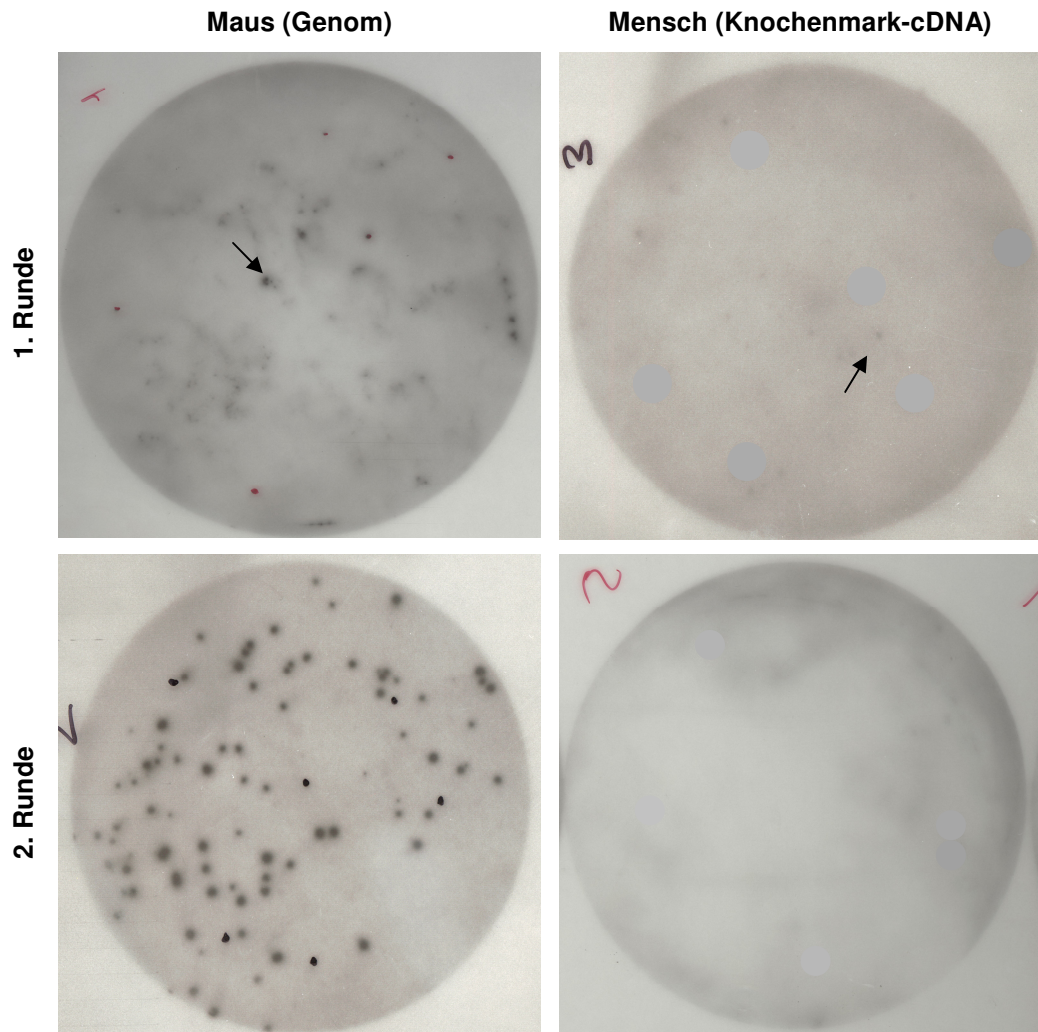


Abbildung 17: Hybridisierung von Bakteriophagen-Bibliotheken Nach Hybridisierung mit der murinen RELM γ -cDNA-Sonde wurden in beiden Fällen auf dem Röntgenfilm Signale (Pfeile) detektiert. Die betreffenden Bakteriophagen wurden isoliert und in einer zweiten Runde hybridisiert. Hierbei zeigten sich deutliche Signale ausschließlich bei der genomischen Maus-Bibliothek, nicht jedoch bei der humanen Knochenmark-Bibliothek.

Auch wenn diese Ergebnisse zunächst ernüchternd erschienen, waren sie jedoch vor dem Hintergrund einer Publikation über die Regulation der Resistin-Expression durch PPAR γ durchaus interessant (Patel et al., 2003). In dieser Studie wurde nämlich unter anderem gezeigt, daß Resistin im Menschen, im Gegensatz zur Maus, nicht im Fettgewebe, sondern hauptsächlich im Knochenmark exprimiert wird. Dies könnte bedeuten, daß Resistin im Menschen eine andere Funktion ausübt als in der Maus und daß Resistin auf funktioneller Ebene das humane RELM γ -Ortholog darstellt. Aufgrund der Wichtigkeit dieser Hypothese für die Fortsetzung des Projekts, sollte zunächst die von Patel et al. publizierte RT-PCR-Expressionsanalyse durch eine Northern-Blot-Analyse verifiziert werden (Patel et al., 2003).

Um dies zu erreichen, wurde eine humane Resistin-cDNA-Sonde durch PCR amplifiziert und in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) eingesetzt. Nach Vermehrung des resultierenden Plasmids (pCR-TOPO-hRES) wurde dieses zunächst durch eine Kontroll-Restriktion mit EcoRI sowie durch eine Sequenzierungsreaktion überprüft (Abb. 18). Das 0.4 kb große EcoRI-Fragment wurde anschließend aus dem Agarose-Gel isoliert und für die Northern Blot-Hybridisierung radioaktiv markiert.

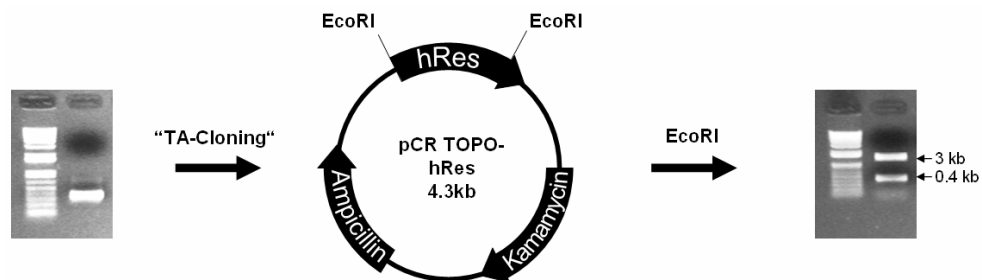


Abbildung 18: Vorbereitung der humanen Resistin-cDNA-Sonde. Ein Teilfragment der humanen Resistin-cDNA wurde durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO eingefügt. Der Erfolg dieser Methode wurde durch einen EcoRI-Verdau des resultierenden Plasmids pCR-TOPO-hRES überprüft.

Für die Northern Blot-Analyse wurde RNA aus Fett und Knochenmark adulter Mäuse isoliert, während die betreffende Human-RNA von der Firma Invitrogen bezogen wurde. Die RNA-Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die RNA aus den Mausgeweben wurde anschließend mit einer murinen Resistin-cDNA-Sonde inkubiert, die im Labor zur Verfügung stand. Die RNA aus menschlichen Geweben wurde mit der oben beschriebenen humanen Resistin-cDNA-Sonde hybridisiert. Nach Entwicklung der aufgelegten Röntgenfilme zeigte sich im Fettgewebe der Maus wie erwartet ein starkes Expressionssignal von Resistin, wohingegen im Knochenmark kein Signal vorlag. Im Unterschied dazu zeigte sich im humanen Fettgewebe kein Expressionssignal von Resistin, im Gegensatz zum Knochenmark, wo eine deutliche Expression von humanem Resistin nachweisbar war (Abb. 19).

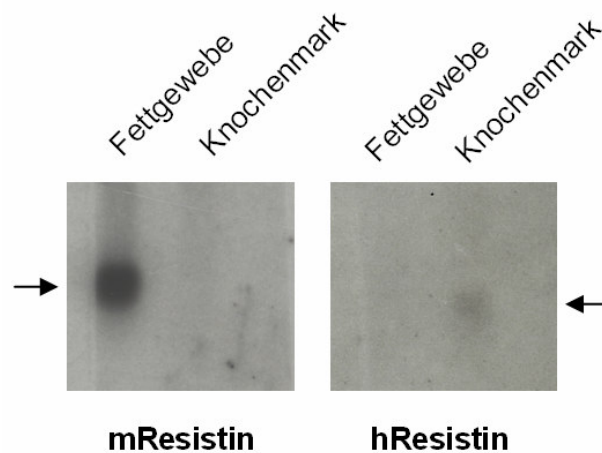


Abbildung 19: Vergleich der Expression von murinem und humanem Resistin. RNA aus murinem (links) bzw. humanem (rechts) Fettgewebe und Knochenmark wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert. Diese wurde mit einer Maus-Resistin-cDNA-Sonde (links), bzw. einer humanen Resistin-cDNA-Sonde (rechts) hybridisiert. Hierbei zeigte sich, daß Resistin in der Maus stark und ausschließlich im Fettgewebe exprimiert wird, während im Menschen ein umgekehrtes Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte.

Diese deutliche Umkehrung des Resistin-Expressionsmusters im Menschen im Vergleich zur Maus steht im Einklang mit einer erst kürzlich publizierten Expressionsanalyse aller Resistin-Familienmitglieder in Maus und Mensch (Chumakov et al., 2004). Hierbei zeigte sich eine auffällige Übereinstimmung der Expressionsmuster von murinem RELM γ mit humanen Resistin, die beide hauptsächlich im Knochenmark, aber auch in Milz und Lunge exprimiert werden. Diese Beobachtung veranlasste die Autoren dazu, Resistin als humanes Ortholog von RELM γ zu bezeichnen (Chumakov et al., 2004). Sollte dies der Fall sein, ist davon auszugehen, daß auch humanes Resistin einen Proliferationsfördernden Effekt auf die promyelozytische Zelllinie HL60 ausübt, der für murines RELM γ beschrieben wurde (Schinke et al., 2004).

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden HL60-Zellen bei einer initialen Zelldichte von 250000/ml mit Resistin in einer finalen Konzentration von 100 ng/ml versetzt, um an den beiden darauffolgenden Tagen die Veränderung der Zellkonzentration zu bestimmen. Zur Hälfte der Ansätze wurde 9-cis-Retinsäure gegeben, um auch den Einfluss von humanem Resistin auf die dadurch ausgelöste granulozytäre Differenzierung zu untersuchen. Sowohl ohne, als auch mit 9-cis-Retinsäure zeigte sich an beiden Tagen unter dem Einfluß von Resistin eine signifikant höhere Zellkonzentration im Vergleich zu den nicht mit Resistin behandelten Zellen (Abb. 20). Somit hat humanes Resistin auf die promyelozytische Zelllinie HL60 den gleichen Effekt wie murines RELM γ , was nun in zukünftigen Studien molekular analysiert werden sollte.

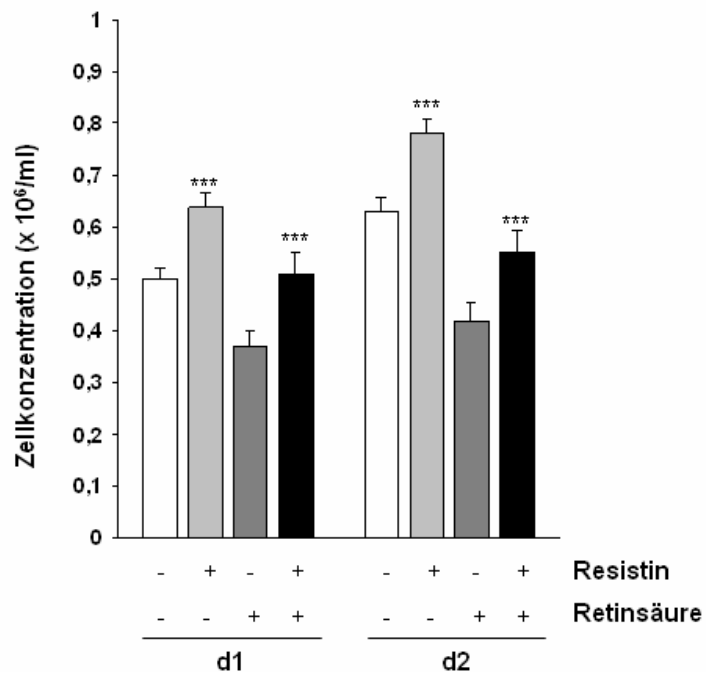


Abbildung 20: Effekt von Resistin auf HL60-Zellen. HL60-Zellen wurden auf eine Zelldichte von 250.000 Zellen/ml gebracht und wie angezeigt mit Resistin und/oder 9-cis-Retinsäure stimuliert. An den beiden darauffolgenden Tagen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die Zelldichte ermittelt. Unter dem Einfluß von Resistin zeigte sich eine signifikant erhöhte Zellkonzentration an beiden Tagen. Die Balken geben Mittelwerte und Standardabweichung an (n=9). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $p < 0.0005$ (***).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung der Funktion von RELM γ *in vivo*, wurde in der Experimentellen Unfallchirurgie ein transgenes Mausmodell mit Hepatozyten-spezifischer Über-Expression von RELM γ generiert, das im Rahmen dieser Dissertation analysiert werden sollte. Durch Genotypisierung mittels PCR und Southern Blot konnten drei transgene Linien etabliert werden, die zunächst im Hinblick auf die Expression des Transgens untersucht wurden. Durch eine Northern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle drei Linien eine starke und spezifische RELM γ -Expression in der Leber aufwiesen, weshalb nachfolgend 2 dieser Linien phänotypisch untersucht werden sollten. Durch die quantitative Auswertung von Blutausstrichen zeigte sich im Alter von 6 Wochen bei den transgenen Mäusen beider Linien im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung der Myeloblasten-Zahl. Dies steht im Einklang mit dem ebenfalls nachgewiesenen proliferativen Effekt von RELM γ auf die myeloblastäre Zelllinie M1. Die histopathologische Untersuchung dieser Mäuse ergab jedoch keine auffälligen Veränderungen (abgesehen von dem in Abb. 16 gezeigten leukämischen Infiltrat bei einer ApoE-RELM γ -Maus), was jedoch am relativ geringen Alter der Mäuse (6 Wochen) liegen könnte.

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte der Frage nach dem humanen RELM γ -Ortholog nachgegangen werden. Durch Hybridisierung einer humanen Knochenmark-cDNA-Bibliothek mit der murinen RELM γ -Sonde bei niedriger Stringenz konnten jedoch keine positiven Bakteriophagen identifiziert werden. Dies steht im Einklang zu der auch von anderen Arbeitsgruppen aufgestellten Hypothese, dass auf genomischer Ebene kein humanes RELM γ -Ortholog existiert (Gerstmayer et al., 2003; Chumakow et al., 2004).

Da jedoch mittels Northern Blot bestätigt werden konnte, dass humanes Resistin, im Gegensatz zur Maus, hauptsächlich im Knochenmark exprimiert wird (Patel et al., 2003; Chumakov et al., 2004), wurde die Möglichkeit untersucht, dass Resistin auf funktioneller Ebene das humane RELM γ -Ortholog darstellen könnte. Hierzu wurde der Einfluß von Resistin auf die promyelozytische Zelllinie HL60 untersucht, wobei sich zeigte, daß Resistin den gleichen proliferativen Effekt ausübt, der zuvor für murines RELM γ nachgewiesen werden konnte (Schinke et al., 2004).

4.2 RELM γ als C/EBP ϵ -Zielgen

C/EBP ϵ ist ein Transkriptionsfaktor, der überwiegend in Vorläuferzellen der Granulopoese während der Differenzierungsphase zu neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (R. Yamanaka et al., 1997; R. Morosetti, 1997). In C/EBP ϵ -defizienten Mäusen konnten keine funktionsfähigen neutrophile und eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden, was die wichtige Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Granulopoese aufzeigt (R. Yamanaka et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Mutationen des humanen C/EBP ϵ -Gens das Defizit von neutrophilen Granula zur Folge hat (Lekstrom-Himes et al., 1999).

Zur Identifizierung von Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors wurden differentielle Expressions-Analysen mit myeloischen Zellen aus C/EBP ϵ -defizienten in Wildtyp-Mäusen durchgeführt (Kubota et al., 2000). Unter den Genen, die in C/EBP ϵ -defizienten myeloischen Zellen nicht mehr exprimiert wurden, befand sich auch RELM γ , das zu diesem Zeitpunkt als kurzes cDNA-Fragment des 3'-Endes in der EST (expressed sequence tag) Datenbank abgelegt wurde. Durch die weiterführende Charakterisierung dieser Arbeitsgruppe, die für RELM γ die alternative Bezeichnung mXCP1 (murine ten-cysteine

protein 1) einführten, konnte dies bestätigt werden (Chumakov et al., 2004). Zudem konnten die Autoren zeigen, dass durch Transfektion mit einem C/EBP ϵ -Expressionsplasmid die Expression von mXCP1/RELM γ induziert wird (Chumakov et al., 2004). Dementsprechend muss RELM γ als Zielgen des Transkriptionsfaktors C/EBP ϵ angesehen werden, was im Einklang mit dem Expressionsmuster von RELM γ steht (Schinke et al., 2004). In den bisherigen *in vitro*-Untersuchungen zeigte sich, daß RELM γ einen proliferativen Effekt sowohl auf die myeloblastäre Zelllinie M1, als auch auf die promyelozytische Zelllinie HL60 vermittelt. Ein solcher Effekt wird auch durch die bislang erzielten *in vivo*-Ergebnisse unterstützt, da in den ApoE-RELM γ -transgenen Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl von Myeloblasten nachgewiesen werden konnte. Diese Daten deuten darauf hin, daß RELM γ Teil eines negativen Rückkopplungskreises zur Regulation der Granulopoese sein könnte. In granulozytären Vorläuferzellen induziert C/EBP ϵ die Expression von RELM γ , das seinerseits der Differenzierungs-fördernden Wirkung von C/EBP ϵ entgegenwirkt und die Zellen in einem proliferativen Stadium hält. Ob ein solcher Regelkreis existiert und welche molekularen Mechanismen diesem zugrundeliegen, kann nun in weiterführenden Experimenten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, untersucht werden.

4.3 Resistin als potentieller Regulator der Granulopoese

Resistin ist das erste Mitglied einer mittlerweile bei Nagetieren aus vier (Resistin, RELM α , RELM β und RELM γ) und beim Menschen aus zwei (Resistin und RELM β) Peptidhormonen bestehenden Proteinfamilie. Aufgrund der initial beschriebenen Versuche am Mausmodell wurde für Resistin eine Rolle als systemisch wirkender Insulin-Antagonist postuliert, was aufgrund der Adipozyten-

spezifischen Expression von murinem Resistin die Korrelation von Typ-II-Diabetes und Adipositas erklären könnte (Steppan et al., 2001a; Banerjee et al., 2004). Beim Menschen ist eine solche Rolle von Resistin in der Pathogenese der Insulinresistenz jedoch umstritten (Ukkola, 2002). Desweiteren deuten alle bislang durchgeführten Expressionanalysen darauf hin, dass humanes Resistin nicht im Fettgewebe, sondern in hämatopoetischen Geweben exprimiert wird. Vor dem Hintergrund, dass auf genomischer Ebene offenbar kein humanes RELM γ -Ortholog existiert, ist diese Verschiebung des Resistin-Expressionsmusters von Maus zu Mensch von großer Bedeutung.

Die ersten Hinweise auf die spezifische Expression von Resistin in hämatopoetischen Geweben kamen von einer von Patel et al. publizierten RT-PCR-Expressionsanalyse (Patel et al., 2003). Der in dieser Publikation nachgewiesene Unterschied der Resistin-Expression in Fettgewebe und Knochenmark konnte in der vorliegenden Dissertation durch eine Northern Blot-Analyse bestätigt werden. Nahezu zeitgleich zu diesem Experiment wurde von Chumakov et al. publiziert, dass murines RELM γ ein Zielgen von C/EBP ϵ ist (Chumakov et al., 2004). In dieser Publikation wurde zudem das Expressionsmuster aller bislang bekannten Mitglieder der Resistin-Familie in Maus und Mensch analysiert, wobei sich zeigte, dass humanes Resistin ein nahezu identisches Expressionsmuster aufwies wie murines RELM γ (Chumakov et al., 2004). Aus diesem Grund führten die Autoren die neue Bezeichnung mXCP1 (murine ten-cysteine protein 1) für murines RELM γ und hXCP1 (human ten-cysteine protein 1) für humanes Resistin ein, um beide Moleküle bewusst aus dem Kontext von Resistin (RESISTance to Insulin) herauszunehmen. Diese neu eingeführte Nomenklatur, die sich zwar bislang noch nicht durchgesetzt hat, zeigt jedoch auf, dass diese Autoren Resistin als humanes RELM γ -Ortholog ansehen. Dies wird durch folgenden Satz in der Diskussion dieser Publikation deutlich

unterstrichen: „While this work was in progress, cloning of resistin cDNA in mice (Steppan et al., 2001a) resulted in misidentification of hXCP1 as human resistin.“ (Chumakov et al., 2004).

Sollte diese Hypothese korrekt sein, müsste humanes Resistin ähnliche funktionelle Eigenschaften besitzen wie murines RELMy. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluß von rekombinantem humanem Resistin auf die promyelozytische Zelllinie HL60 untersucht. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Kulturen eine signifikante Erhöhung der Zellkonzentrationen, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 9-cis-Retinsäure. Nahezu identische Ergebnisse wurden zuvor für murines RELMy durch Transfektion der HL60-Zellen beschrieben (Schinke et al., 2004). Dementsprechend besteht in der Tat die Möglichkeit, daß Resistin im Menschen die Funktion von RELMy in der Maus übernommen haben könnte, was im Zusammenhang mit myeloproliferativen Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sein könnte.

4.4 Ein möglicher neuer therapeutischer Ansatz für myeloproliferative Erkrankungen

Leukämie ist eine systematisierte diffuse autonome Proliferation einer Leukozytenrasse. Die Expansion eines malignen Zellklons führt zur generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark, evtl. Infiltration extramedullärer Organe und Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut (Herold, 2004). Die Folgen einer Leukämie sind die Verdrängung der normalen Hämatopoese mit Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie (Panzytopenie) mit daraus resultierender Schwäche, bakteriellen Infekten und Blutungsneigung. Die Leukämie wird grob in folgende Krankheitsgruppen (mit jeweiligen Unterformen) unterteilt:

1. Chronische Leukämie: - chronisch lymphatische Leukämie
- chronisch myeloische Leukämie
2. Akute Leukämie: - akute lymphatische Leukämie
- akute myeloische Leukämie.

Der Vergleich der Blutausstriche 6 Wochen alter Wildtyp- und ApoE-RELM γ -transgener Mäusen ergab keine Veränderungen in der Anzahl der Lymphozyten, weshalb die lymphatischen Leukämieformen im Zusammenhang mit RELM γ eher von untergeordneter Bedeutung sind. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Myeloblastenzahl in den Blutausstrichen transgener Mäuse, was auf einen myeloproliferativen Effekt von RELM γ hindeutet. Da sich in diesen Ausstrichen Zellen aller Entwicklungsstufen der Granulopoese zeigten, ist eher von einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) auszugehen, da die akute myeloische Leukämie (ALL) durch das ausschließliche Vorhandensein uniformer Myeloblasten einer Entwicklungsstufe gekennzeichnet ist. Auch wenn die weiterführende Untersuchung an älteren Tieren noch aussteht, soll im Folgenden zunächst die mögliche Bedeutung dieser Befunde im Zusammenhang mit CML diskutiert werden.

Bei der CML kommt es in über 60 % der Fälle zu einer myeloischen Blastenkrise sowie hämorrhagischen Organinfarkten mit leukämischen Infiltraten. Solche generalisierten histopathologischen Veränderungen wurden zwar in den ApoE-RELM γ -transgenen Mäusen nicht nachgewiesen, allerdings wurde zumindest in der Lunge einer transgenen Maus ein solcher hämorrhagischer Infarkt nachgewiesen. Da die CML beim Menschen allerdings bis zum Auftreten erster Symptome eine mehrjährige Latenzzeit aufweist, ist es durchaus denkbar, dass sich histopathologische Veränderungen in den ApoE-RELM γ -transgenen Mäusen erst nach einigen Monaten manifestieren. Dementsprechend wurden zum Ende der vorliegenden Dissertation zahlreiche Verpaarungen angesetzt, um in

zukünftigen Untersuchungen den Phänotyp dieser Mäuse im Alter von 6, 12 und 18 Monaten zu analysieren.

Da durch die bisherigen Untersuchungsergebnisse *in vitro* nicht nur ein proliferativer Effekt auf die myeloblastäre Zelllinie M1, sondern auch auf die promyelozytische Zelllinie HL60 demonstriert werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass sich in den älteren transgenen Mäusen eine spezielle Form der AML manifestieren könnte, nämlich die akute Promyelozytenleukämie (APL). Im Menschen wird die APL in 90 % der Fälle durch eine chromosomale Translokation des Retinsäure-Rezeptorgens RAR α verursacht, was die Differenzierung promyelozytischer Zellen zu Granulozyten stark beeinträchtigt (Piazza et al., 2001). Patienten mit APL werden hauptsächlich durch eine Kombination aus Chemotherapie und ATRA (all-trans retinoic acid) behandelt. Diese Kombinationstherapie führt zwar in den meisten Fällen zunächst zur Remission, aber es gibt eine sehr hohe Rückfallrate, die durch die Entwicklung von ATRA-Resistenzen geprägt ist (Douer, 2002).

Problematisch ist auch die Behandlung chronisch myeloischer Leukämien, da das zur Zeit angewandte Therapieschema (Kombination aus Tyrosinkinase-Inhibitoren, Interferonen, Chemotherapie und Knochenmark-Transplantation) durch die zahlreichen Nebenwirkungen limitiert ist. Deshalb ist es sowohl für die APL, als auch für die CML von großer Bedeutung, neue therapeutische Ansatzpunkte für die Zukunft zu finden. Die Identifizierung von RELM γ und Resistin als Regulatoren der myeloiden Zellproliferation könnte dementsprechend von grosser klinischer Relevanz sein, auch weil es sich in beiden Fällen um extrazelluläre Proteine handelt, die vermutlich über einen noch zu identifizierenden Rezeptor auf die betreffenden Zellen wirken.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Dissertation weisen auf eine wichtige Rolle von RELM γ , bzw. Resistin bei der Regulation der Proliferation myeloischer Zellen hin. Dies ist vor dem Hintergrund myeloproliferativer Erkrankungen auch von klinischer Relevanz und sollte deshalb in zukünftigen Experimenten weiterführend untersucht werden. Zum einen sollten histologische Untersuchungen älterer ApoE-RELM γ -transgener Mäuse durchgeführt werden, um deren Phänotyp vollständig zu charakterisieren. Zum anderen erscheint es sinnvoll, den Einfluss von humanem Resistin auf verschiedene myelische Zelllinien weiterführend zu untersuchen. Neben der molekularen Analyse der bereits nachgewiesenen Effekte, sollte hierbei sicherlich die Frage nach einem potentiellen Resistin-Rezeptor im Mittelpunkt stehen, da ein solches Molekül ein gutes Zielmolekül für die zukünftige therapeutische Intervention bei myeloproliferativen Erkrankungen sein könnte.

5 Zusammenfassung

Murines RELM γ ist Mitglied einer neuen Familie Resistin-ähnlicher Moleküle. Es handelt es sich um ein sekretiertes Protein, das ein für hämatopoetisches Gewebe spezifisches Expressionsmuster aufweist. Durch initiale *in vitro*-Experimente konnte ein proliferativer Effekt von RELM γ auf die promyelozytische Zelllinie HL60 nachgewiesen werden, was eine Rolle bei der Regulation der Granulopoese nahelegte. Die beiden wesentlichen Ziele dieser Dissertation waren zum einen die funktionelle Untersuchung von RELM γ *in vivo* und zum anderen die Identifizierung eines humanen RELM γ -Orthologs.

Hierzu wurde ein in der Experimentellen Unfallchirurgie generiertes Mausmodell charakterisiert, in dem aufgrund einer Über-Expression von RELM γ in Hepatozyten dessen Serumkonzentration erhöht sein sollte. Nach Genotypisierung der erhaltenen Mäuse wurde zunächst die spezifische Expression des Transgens durch Northern Blot nachgewiesen. Zur phänotypischen Analyse wurden Blutaussstriche angefertigt, deren quantitative Auswertung eine signifikante Erhöhung der Myeloblasten-Anzahl bei den transgenen Mäusen aufzeigte. Diese apparente myeloische Leukämie führte im Alter von 6 Wochen jedoch noch nicht zu generalisierten histopathologischen Veränderungen, weshalb nun die Untersuchung älterer transgener Mäuse geplant ist.

Zur Identifizierung eines humanen RELM γ -Orthologs wurde zunächst eine humane Knochenmark-cDNA-Bibliothek hybridisiert, wodurch allerdings auch bei niedrig stringenten Bedingungen keine positiven Signale detektiert werden konnten. Im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass Resistin das humane Ortholog von RELM γ sein könnte, da es beim Menschen nicht im Fettgewebe, sondern im Knochenmark exprimiert wird. Diese Hypothese konnte zudem durch *in vitro*-

Experimente an HL60-Zellen bestätigt werden, wodurch nachgewiesen wurde, daß auch Resistin einen proliferativen Effekt auf Promyelozyten ausübt.

6 Literaturverzeichnis

Amanullah, A., Hoffmann B., Liebermann D. A. (2000). Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15^{INK4B} and p16^{INK4A}. *Blood* **96**, 475-482.

Aruna, B., Ghosh, S., Singh, A. K., Shekhar, C. M., Srinivas, V., Chauhan R., Ehtesham, N. Z. (2003). Human recombinant Resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkage. *Biochemistry* **42**, 10554-10559.

Banerjee, R. R., Lazar, M. (2001). Dimerization of Resistin and Resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* **276**, 25970-25973.

Banerjee, R.R., Lazar, M. (2003). Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* **81**, 218-226.

Banerjee, R. R., Rangwala, S. M., Shapiro, J. S., Rich, A. S., Rhoades, B., Qi, Y., Wang, J., Rajala, M. W., Poci, A., Scherer, P. E., Stepan, C. M., Ahima, R. S., Obici, S., Rossetti, L., Lazar, M. (2004). Regulation of fasted blood glucose by Resistin. *Science* **303**, 1195-1198.

Blagojev, B., Kratchmarova, I., Nielsen, M. M., Fernandez, M. M., Voldby, J., Andersen, J. S., Kristiansen, K., Pandeys, A., Mann, M. (2002). Inhibition of adipocyte differentiation by Resistin-like molecule α . *J Biol Chem* **277**, 42011-42016.

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U. (2001). Pathologie. *Urban & Fischer Verlag, München*

Cao, H., Hegele, R.A. (2001). Single nucleotide polymorphism of the Resistin (RSTN) gene. *J Hum Genet* **46**, 553-555

Chumakov, A., Griller, I., Chumakova, E., Chih, D., Slater, J., Koeffler, P. (1997). Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP ϵ transcription faktor. *Mol Cellular Biol* **17**, 1375-1386.

Chumakov, A., Kubota, T., Walter, S., Koeffler, H. P. (2004). Identification of murine and human XCP1 genes as C/EBP- ϵ -dependent members of FIZZ/Resistin gene family. *Oncogene* **23**, 3414-3425.

Collins, S., Ullmer, J., Purton, L., Darlington, G. (2001). Multipotent hematopoietic cell lines derived from C/EBP ϵ (-/-) knockout mice display granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, granulocyte-colony-stimulating factor, and retinoic acid-induced granulocytic differentiation. *Blood* **98**, 2382-2388.

Day, C., (1999). Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* **16**, 179-192.

Douer, D., (2002). Advances in the treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia. *Acta Haematol* **107**, 1-17.

Elefteriou, F., Takeda, S., Ebihara, K., Magre, J., Patano, N., Kim, C.A., Ogawa, Y., Liu, X., Ware, S.M., Craigen, W.J., Robert, J.J., Vinson, C., Nakao, K., Capeau, J., Karsenty, G. (2004) Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3258-3263

Fehmann, H. C., Heyn, J., (2002). Plasma Resistin levels in patients with typ 1 and typ 2 diabetes mellitus and in healthy controls. *Horm Metab Res* **34**, 671-673.

Gerstmayer, B., Küsters, D., Gebel, S., Müller, T., Van Miert, E., Hoffmann, K., Bosio, A. (2003). Identification of RELM γ , a novel Resistin-like molecule with a distinct expression pattern. *Genomics* **81**, 588-595.

Herold, G. und Mitarbeiter (2004). Innere Medizin. *Ohne Verlag*, Köln

Holocomb, I. N., Kabakoff, R. C., Chan, B., Baker, T. W., Gurney, A., Henzel, C. N., Lowman, H. B., Wright, B. D., Skelton, N. J., Frantz, G. D., Tumas D. B., Peale, F. V., Shelton, D. L., Hebert, C. C. (2000). FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* **19**, 4046-4055.

Janke, J., Engeli, S., Gorzelnik, K., Luft, F. C., Sharma, A. M. (2002). Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* **10**, 61-62.

Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., Patsch, J. R. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Bioch Biophys Res Comm* **309**, 286-290.

Kim, K.-H., Lee, K., Moon, Y. S., Sul, H. S. (2001). A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **276**, 11252-11256.

Kubota, T., Kawano, S. Chih, D.Y., Hisatake, Y., Chumakov, A.M., Taguchi, H., Koeffler, H.P. (2000). Representational difference analysis using myeloid cells from C/EBP epsilon deletional mice. *Blood* **96**, 3953-3957

Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Wilson, T.A., Kliever, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270**, 12953-6.

Lekstrom-Himes, J.A., Dorman, S.E., Kopar, P., Holland, S.M., Gallin, J.I. (1999). Neutrophil-specific granule deficiency results from a novel mutation with loss of function of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein epsilon. *J Exp Med* **189**, 1847-1852.

Lekstrom-Himes, J. A. (2001). The role of C/EBP ϵ in terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells* **19**, 125-133.

Meijers-Heijboer, H., Lindhout, D., Menko, F., Vossen, S., Möslein, G., Tops, C., Bröcker-Vriends, A., Wu, Y., Hofstra, R., Sijmons, R., Cornelisse, C., Morreau, H., Fodde., R. (1999). The fusion gene cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* **23**, 144-146.

Morosetti, R., Park, D. J., Chumakov, A. M., Griller, I., Shiohara, M., Gombart, A. F., Nakamaki, T., Weinberg, K., Koeffler, H., P. (1997). A novel, myeloid transcription factor C/EBP ϵ , is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood* **90**, 2591-2600.

Muse, E. D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B. P., McKay, R. A., Rajala, M. W., Scherer, P. E., Rossetti, L. (2004). Role of Resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* **114**, 232-239.

Nagaev, I., Smith, U. (2001). Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to Resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 561-564

Nogueiras, R., Gallego, R., Gualillo, O., Caminos, J. E., Garcia-Caballero, T., Casanueva, F. F., Dieguez, C. (2003). Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Letters* **548**, 21-27.

Olefsky, JM. (2000). Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* **106**, 467-472.

Osawa, H., Onuma, H., Murakami, A., Ochi, M., Nishimiya, T., Kato, K., Shimizu, I., Fujii, Y., Ohshi, J., Makino, H. (2002). Systematic search for single nucleotide polymorphism in the Resistin gene/ the absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphism with japanese type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 863-866.

Passegue, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Möhle-Steinlein, U., Wagner, E. F. (2001). Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking JunB expression in myeloid lineage. *Cell* **104**, 21-32.

Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I., J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C., H., Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly

regulated by PPAR γ activators. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 472-476.

Piazza, F., Gurrieri, C., Pandolfi, P.P. (2001). The theory of APL. *Oncogene* **20**, 7216-7222.

Rajala M. W., Lin, Y., Ranaletta, M., Yang, X. M., Quian, H., Gingerich, R., Barzilai, N., Scherer, P. E. (2002). Cell type-specific expression and coregulation of murine Resistin and Resistin-like molecule- α in adipose tissue. *Mol Endocrinol* **16**, 1920-1930.

Savage, D. B., Seweter, C. P., Klenk, E. S., Segal, G. D., Vidal-Puing, A., Considine, R. V., O'Rahilly, S. (2001). Resistin/FIZZ3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor actions in humans. *Diabetes* **50**, 2199-2202.

Schinke, T., Haberland, M., Jamshidi, A., Nollau, P., Rueger, J. M., Amling, M. (2003). Cloning and functional characterization of Resistin-like molecule γ . *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 356-362.

Sentinelli, F., Romeo, S., Arca, M., Filippi, E., Leonetti, F., Banchieri, M., Di Mario, U., Baroni, M., G. (2002). Human Resistin gene, obesity, and type 2 diabetes/ mutation analysis and population study. *Diabetes* **51**, 860-862.

Shimada, H., Ichikawa, H., Nakamura, S., Katsu, R., Iwasa, M., Kitabayashi, I., Ohki, M. (2000). Analysis of genes under downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood* **96**, 655-663.

Shuldiner, A. R., Yang, R., Gong, A.-W. (2001). Resistin, obesity and insulin resistance-the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* **345**, 1345-1346.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W.J., et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319

Steppan C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, S. R., Lazar, M. A. (2001a). The hormone Resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312.

Steppan, C. M., Brown, E. J., Wright, C. M., Bhat, S., Banerjee, R. R., Dai, C. Y., Enders, G. H., Silberg, D. G., Wen, X., Wu, G. D., Lazar, M. A. (2001b). A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 502-506.

Truong, B.-T., Lee, Y.-L., Lodie, T. A., Park, D. J., Perotti, D., Watanabe, N., Koeffler, H. P., Hideaki, N., tenen, D., G., Kogan, S. C. (2003). CCAAT/enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia. *Blood* **101**, 1141-1148.

Ukkola, O. (2002). Resistin- a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur J Endocrinol* **147**, 571-574.

Verhaeghe, L.G., Bouillon, R. (2002). Effects of diabetes and insulin on bone physiology. In: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan,

G.A. (Eds.), *Principles of Bone Biology*, Academic Press, San Diego, 741-755

Vidal-Puig, A., O’Rahilly, S. (2001). Resistin: an new link between obesity and insulin resistance? *Clin Endocrinol* **55**, 437-438.

Villena, J. A., Kim, K. H., Sul, H. S. (2002). Pref-1 and ADSF/Resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm Metab Res* **34**, 664-670.

Way, J. M., Görgrün, C. Z., Tong, Q., Uysal, K. T., Brown, K. K., Harrington, Oliver, W. R., Wilson, T., M., Kliewer, S. A., Hotamisligil, G. S. (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *J Biol Chem* **276**, 25651-25653.

Yamanaka, R., Barlow, C., Lekstrom-Himes, J., Castilla, L. H., Liu, P. P., Eckhaus, M., Decker, T., Wynshaw-Boris, A., Xanthopoulos, K. G. (1997). Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein ϵ -deficient mice. *Med Sci* **94**, 13187-13192.

Yang, R.-Z., Huang, Q., Xu, A., McLenithan, J. C., Eison, J. A., Shuldiner, A. R., Alkan, S., Gong, D.-W. (2003). Comparative studies of Resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 927-935.

7 Danksagung

Bei Prof. Dr. med. Johannes M. Rueger, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie im Zentrums für operative Medizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Amling für die Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Thorsten Schinke für sein großes Engagement am Fortgang der Arbeit, seine ständige Unterstützung, seine Bereitschaft zur fruchtbaren Diskussion, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und für die Einführung in die faszinierenden Fragestellungen der Molekularbiologie.

Bei Prof. Dr. med. K. Kamino möchte ich mich für die Unterstützung bei der histopathologischen Analyse bedanken.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie, und in diesem Zusammenhang insbesondere bei Frau Cordula Müldner bedanken.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lara Iris Valeska Winterhoff
Geburtsdatum: 24.06.1979
Geburtsort: Aurich
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1986-1990 Grundschule, Aurich
1990-1992 Orientierungsstufe, Aurich
1992-1999 Gymnasium Ulricianum Aurich;
Abschluß: Abitur

Studium:

2000-2006 Studium der Medizin an Universität Hamburg
2002 Ärztliche Vorprüfung
2003 1. Staatsexamen
2005 2. Staatsexamen

Dissertation:

2003-2005 Anfertigung der vorliegenden Arbeit
bei Prof. Dr. Michael Amling,
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie,
Zentrums für operative Medizin,
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Thema: Untersuchungen zur Funktion des
Resistin-ähnlichen Moleküls RELM γ *in vitro*
und *in vivo*

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: