

**Analyse der
Transkriptionsregulation von *LMO2*:
Ein T-Zell Onkogen und essentieller
hämatopoetischer Faktor**

Dissertation

eingereicht am Institut für Chemie,
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

von

Diplom-Biochemiker Maik Martin Prüß

Berlin, Februar 2000

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1997 bis Februar 2000 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin in der Abteilung von Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers und am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Düsseldorfer Heinrich-Heine Universität bei Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora.

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf)
2. Prof. Dr. Dr. Manfred Schweiger (Freie Universität Berlin)

Tag der Disputation: 06. Juni 2000

Für
meinen lieben Vater

Heinz Prüß
(1949 - 1998)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Hämatopoese - ein molekularbiologischer Überblick.....	1
1.2.	Leukämien - die maligne Hämatopoese.....	4
1.3.	<i>LMO2</i> und seine Rolle bei der T-ALL und der normalen Hämatopoese.....	6
1.4.	Ziele der Analysen.....	10
2.	Material.....	12
3.	Methoden	
3.1.	DNA-Präparation.....	19
3.2.	DNA-Analyse	
3.2.1.	Messung der DNA-Konzentration und Restriktionsverdau.....	19
3.2.2.	Southern Blot.....	20
3.2.3.	Radioaktive Markierung und Hybridisierung.....	21
3.2.4.	DNA-Sequenzierung.....	22
3.2.5.	Zellkern-Präparation und DNaseI-Verdau.....	24
3.3.	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	24
3.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	
3.4.1.	PCR-Bedingungen.....	26
3.4.2.	RT-PCR und RACE (<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>).....	28
3.5.	EMSA und Supershift-Assay.....	30
3.6.	RNA-Präparation.....	31
3.7.	Formaldehyd-Gel, Northern Blot und Hybridisierung.....	33
3.8.	Kernprotein-Präparation und Dialyse.....	34
3.9.	Zellkultur	
3.9.1.	Säugerzellen in Kultur, Mycoplasmendetektion und Färbung.....	35
3.9.2.	Transfektion.....	37
3.9.3.	Reportergen/Luciferase-Assay.....	38
3.9.4.	<i>Sense-/Decoy</i> -Assay mit PTOs.....	39
3.10.	Bioinformatik.....	40

4.	Ergebnisse	
4.1.	Charakterisierung und Verifizierung der Zelllinien	
4.1.1.	Molekulargenetische Charakterisierung.....	41
4.1.2.	Zytogenetische Verifizierung und Mycoplasmen-Detektion.....	44
4.2.	Genomische Sequenzierung der 5'-flankierenden Region.....	47
4.3.	Kartierung von DNaseI hypersensitiven Stellen.....	51
4.4.	EMSA und Supershift-Assays.....	60
4.5.	In vivo Funktionsanalysen	
4.5.1.	<i>Sense-/Decoy</i> -Assay mit PTOs.....	66
4.5.2.	Reportergen/Luciferase-Assay.....	74
4.6.	Transkriptanalysen.....	80
5.	Diskussion	
5.1.	Charakterisierung der stromaufwärts liegenden Region von <i>LMO2</i>	84
5.2.	Alternative Transkripte, Promotor P2 und Einfluß von <i>LMO2</i> auf eine Leukämogenese.....	89
5.3.	Weitere Studien und Ausblick.....	94
6.	Zusammenfassung	
6.1.	Deutsche Zusammenfassung.....	97
6.2.	Englische Zusammenfassung (Summary).....	100
7.	Literaturverzeichnis	
7.1.	Veröffentlichungen.....	102
7.2.	Eigene Veröffentlichungen.....	119
8.	Anhang	
8.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	120
8.2.	Abbildungsverzeichnis.....	122
8.3.	Tabellenverzeichnis.....	123
8.4.	Sequenzverzeichnis.....	123
8.5.	Lebenslauf.....	124
8.6.	Danksagung.....	125