

1. Einleitung

1.1. Hämatopoese - ein molekularbiologischer Überblick

Alle Blutzellen eines Individuums finden ihren entwicklungsbiologischen Ursprung in den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC). In den ersten Wochen der Säugetier-Embryogenese werden die Blutzellen in den Blutinseln des Dottersacks gebildet. Später wandern sie in die Leberanlagen des Embryos und erst kurz vor Ende der Schwangerschaft ist der Hauptteil der Hämatopoese im Knochenmark lokalisiert (Orkin, S.H., 1995a; Orkin, S.H., 1996; Silver, L. and Palis, J., 1997).

Neben dem Knochenmark sind das lymphatische Gewebe und das Blut weitere Stätten der Blutzellen-Reifung im erwachsenen Organismus (Lasky, L.A., 1996). Die genaue Anatomie der hämatopoetischen Stellen innerhalb eines Organismus ist teilweise zwischen den Spezies verschieden und variiert innerhalb einer Spezies, beispielsweise der Fische (Orkin, S.H., 1995a).

Das Blut besteht aus verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen. Viele Zellen haben eine limitierte Lebenszeit und sind unfähig, sich zu teilen. Daher müssen sie während des ganzen Lebens ununterbrochen ersetzt werden. Aus den HSC entwickeln sich Vorläuferzellen, die dann nach Stimulation proliferieren und sich in die verschiedenen Zellen differenzieren (Abb. 1) (Orkin, S.H., 1996; Socolovsky, M. et al., 1998).

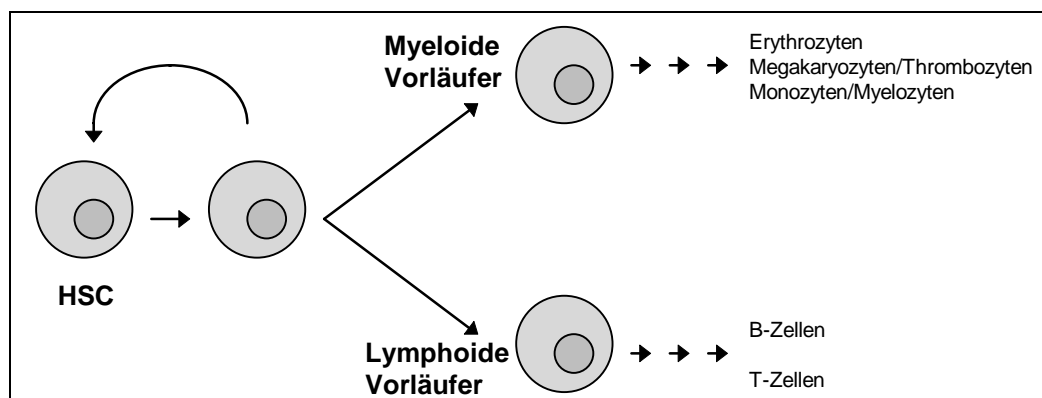


Abb. 1: Entwicklung der verschiedenen Blutzellen (aus Socolovsky, M. et al., 1998).

HSC = Hämatopoetische Stammzellen

Drei Hypothesen zur Erklärung der hämatopoetischen Differenzierung existieren. Die Erste besagt, daß es sich bei der Entwicklung einer Vorläuferzelle in eine bestimmte Linie um ein stochastisches Ereignis handelt, bei dem bestimmte Wachstumsfaktoren nur zum Überleben und zur Proliferation der Vorläuferzellen benötigt werden. Die zweite, sogenannte induktive Hypothese geht von einer aktiven Rolle bestimmter Wachstumsfaktoren bei der Differenzierung aus, diese bestimmen auch das Schicksal der Zellen. Die dritte Möglichkeit ist ein Hybrid aus den beiden genannten Hypothesen (Socolovsky, M. et al., 1998).

Nicht nur äußere Faktoren regulieren die Hämatopoese, sondern auch spezifische Transkriptionsfaktoren, die Linien-spezifische Gene aktivieren (Orkin, S.H., 1995b); in Abb. 2 ist eine nicht vollständige Liste der hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren und ihr Wirkungsort dargestellt.

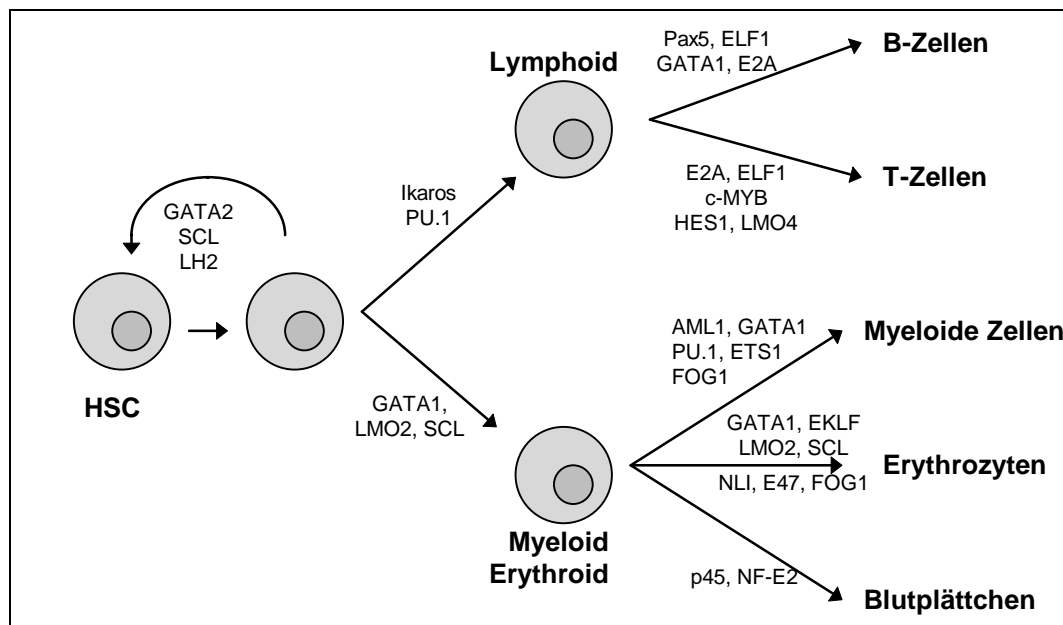


Abb. 2: Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese (verändert aus Orkin, S.H., 1995b). HSC = Hämatopoetische Stammzellen, Abkürzungen der Transkriptionsfaktoren ohne mögliche weitere Synonyme.

Dabei sind es keine einzelnen Regulatoren, sondern die Kombination aus verschiedenen Faktoren, die eine Linien-spezifische Genexpression steuern (Orkin, S.H., 1995b; Sieweke, M.H. and Graf, T., 1998).

Im sogenannten „Cocktailparty“-Modell (Sieweke, M.H. and Graf, T., 1998) wird die Blutzellen-Differenzierung, gesteuert durch multiple Transkriptionsfaktor-Komplexe, beschrieben. Erst die Interaktion verschiedener Faktoren innerhalb der Komplexe und der dynamische Wandel in der Zusammensetzung ermöglicht die Differenzierung durch veränderte Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Promotor- oder Enhancer-Elementen. Die Substitution einzelner Faktoren innerhalb multipler Transkriptionskomplexe und der damit verbundene Übergang in einen neuen Komplex mit veränderten Eigenschaften ist günstiger, als einen Komplex mit komplett neuen Transkriptionsfaktoren zu bilden. Deshalb steuert kein Faktor die Entwicklung einer einzigen Linie (s. Abb. 2). Das „Cocktailparty“-Modell setzt voraus, daß der nachfolgende Differenzierungszustand eine ähnliche Zusammensetzung von Transkriptionsfaktoren in der Steuerung der dafür notwendigen Gene hat wie der vorherige. In der Differenzierung weiter fortgeschrittene Stadien hingegen unterscheiden sich viel stärker in der Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren. Dieses Modell reflektiert damit auch die biologische Realität, daß benachbarte Differenzierungszustände ineinander überführt werden können, während das für weiter fortgeschrittene Differenzierungsstadien weniger möglich ist.

Nach heutiger Kenntnis über die hämatopoetische Differenzierung geht man auch davon aus, daß bestimmte Transkriptionsfaktor-Komplexe nicht nur die für die Differenzierung zu einer Zelllinie notwendigen Gene aktivieren, sondern die Gene für die Entwicklung in alternative Linien deaktivieren (Orkin, S.H., 1995b; Labbaye, C. et al., 1995; Sieweke, M.H. and Graf, T., 1998; Engel, I. and Murre, C., 1999).

1.2. Leukämien - die maligne Hämatopoese

Wenn hämatopoetische Zellen unkontrolliert wachsen und ihre Fähigkeit, sich in reife Blutzellen zu differenzieren, verloren haben, bezeichnet man das als Leukämie. Es gibt auch Erkrankungen, die nur einen Teilaspekt der vollen Leukämie aufweisen, z. B. nur expansives Wachstum (myeloproliferative Syndrome) oder nur Differenzierungsstop (myelodysplasive Syndrome) (Sawyers, C.L. et al., 1991; Sachs, L., 1996; Raskind, W.H. et al., 1998).

Unter allen Leukämien ist die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) bei Kindern mit 80% die häufigste Form. Die malignen Zellklone entwickeln sich meist aus normalen Vorläufern, verbleiben dann aber auf einer frühen Stufe der B- oder T-Zell-Ontogenie. Die Patienten mit ALL weisen heterogene Phänotypen auf, da sich die transformierten Zellen in Morphologie, Zytogenetik und immunologischen Markern stark unterscheiden. Bei Kindern findet man etwa 15 % T-Zell-ALL (T-ALL) und etwa 85 % B-Zell-ALL (B-ALL), wobei Patienten mit T-ALL häufig eine schlechtere Prognose als B-ALL-Patienten haben (Heerema, N.A. et al., 1998; Uckun, F.M. et al., 1998).

Molekularbiologische Analysen der Leukämien und anderer Tumoren identifizierten und charakterisierten Gene, die an der Pathogenese der malignen Erkrankungen beteiligt sind. Sie können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Proto-Onkogene und Tumorsuppressor-Gene (Thandla, S. and Aplan, P.D., 1997). Die Proto-Onkogene sind normale zelluläre Gene, die jedoch nach strukturellen Veränderungen (wie Punktmutationen, Gen-Amplifikationen, intragenischen Deletionen oder chromosomalen Translokationen) für abnormale Proteine codieren können, die dann für maligne Charakteristika, wie z. B. unkontrollierte Proliferation oder veränderte Differenzierung verantwortlich sind (*gain of function*) (Bishop, J.M., 1991; Look, A.T., 1997). Bei den Tumorsuppressor-Genen führt erst die Inaktivierung oder der Verlust beider Kopien des Gens zur malignen Transformation (*loss of function*) (Marshall, C.J., 1991; Harber, D. and Harlow, E., 1997).

Chromosomale Veränderungen, insbesondere Translokationen und Inversionen (die im weiteren Verlauf zusammengefaßt als Translokationen bezeichnet

werden), weisen auf einen möglichen malignen Phänotyp hin (Sánchez-García, I., 1997; Barr, F.G., 1998; Lengauer, C. et al., 1998; Cahill, D.P. et al., 1999). Zwei prinzipielle Konsequenzen resultieren aus den chromosomalen Translokationen: 1. ein Proto-Onkogen wird durch die Translokation aktiviert, oder 2. die Translokation führt zu einem Fusionsgen, das für ein chimäres Protein codiert (Rabbitts, T.H., 1991; Korsmeyer, S.J., 1992; Rabbitts, T.H., 1994; Mitani, K., 1996; Lengauer, C. et al., 1998). Chromosomale Veränderungen sind in allen Chromosomenbanden zu finden (Mitelman, F. et al., 1997). Balancierte strukturelle Veränderungen (hauptsächlich Translokationen) sind häufiger als unbalancierte, und balancierte findet man häufiger in malignen hämatologischen Erkrankungen als in soliden Tumoren (Mitelman, F. et al., 1997; Rabbitts, T.H., 1997). Gene, die für T-Zell-Rezeptoren (TCR) und Immunglobuline (Igs) codieren, sind häufig an den hämatologischen Translokationen beteiligt (Rabbitts, T.H., 1994; Korsmeyer, S.J., 1992; Sánchez-García, I., 1997). Eine fehlerhafte Rekombination ist eine der möglichen Ursachen der Translokation (Zucman-Rossi, J. et al., 1998), die von den Enzymen, die an der normalen V(D)J-Rekombination zur Bildung verschiedener Igs und TCR-Moleküle beteiligt sind, verursacht werden (Richardson, C. et al., 1998). Rekombinationssignalsequenzen werden von bestimmten Proteinen erkannt und durch einen induzierten Doppelstrangbruch die Rekombination eingeleitet (Roth, D.B. and Craig, N.L., 1998; Hiom, K. et al., 1998). Deshalb sind Regionen, die die Ig-Gene (z.B. 14q32 oder 2p11-12) und TCR-Gene (z. B. 7q34-35 und 14q11) enthalten, häufig an chromosomalen Translokationen beteiligt (Rabbitts, T.H., 1994; Mitani, K., 1996; Sánchez-García, I., 1997).

1.3. *LMO2* und seine Rolle bei der T-ALL und der normalen Hämatopoese

Die Klonierung und Analyse des Translokationsbruchpunktes t(11;14)(p13;q11) in T-ALL Patienten (Royer-Pokora, B. et al., 1989) ergab eine CpG-Insel nahe des Bruchpunktes auf Chromosom 11p13, welche auf ein mögliches Gen hindeutete. Dieses könnte durch den Bruchpunkt unterbrochen und möglicherweise an der Entstehung der T-Zell-Leukämie beteiligt sein. Die Klonierung eines Gens aus dieser Region erfolgte 1991 (Boehm, T. et al., 1991; Royer-Pokora, B. et al., 1991) und wurde aufgrund seiner Sequenzhomologie zu *LMO1* (LIM-only protein 1) *LMO2* (früher *TTG2*, *RBTN2*, *Rhombotin-2*) genannt. Das Gen codiert für ein 18 kDa großes Cystein-reiches Protein mit zwei nebeneinander liegenden LIM-Motiven (Boehm, T. et al., 1991; Royer-Pokora, B. et al., 1991). LIM-Motive haben eine Zinkfinger-ähnliche Struktur (Michelsen, J. W. et al., 1993; Archer, V.E.V. et al., 1994), binden jedoch keine DNA. Es sind funktionelle Domänen, die verantwortlich sind für Protein-Protein-Wechselwirkungen (Schmeichel, K.L. and Beckerle, M.C., 1994; Sánchez-García, I. and Rabbitts, T.H., 1994; Dawid, I.B. et al., 1998).

In transgenen Mäusen konnte das onkogene Potential von *LMO2* gezeigt werden. Eine Überexpression von *LMO2*, das unter der Kontrolle eines T-Zell-spezifischen Promotors lag, führte u.a. zu T-Zell-Leukämien und Lymphomen (Fisch, P. et al., 1992; Larson, R.C. et al., 1994; Larson, R.C. et al., 1995; Neale, G.A.M. et al., 1997). Untersuchungen in *Knock-out*-Mäusen zeigten, daß *Lmo2* nicht nur in der frühen Embryogenese exprimiert wird, sondern daß es auch an der Erythropoese beteiligt ist, da die Mäuse keine Dottersack-Erythropoese aufweisen (Feroni, L. et al., 1992; Warren, A.J. et al., 1994). In Experimenten mit *Lmo2* ^{-/-} embryonischen Stammzellen ist gezeigt worden, daß die gesamte adulte Hämatopoese (inkl. Lymphopoese und Myelopoese) fehlt (Yamada, Y. et al., 1998). Daraus läßt sich eine mögliche Funktion von *Lmo2* auf die frühe Hämatopoese, möglicherweise sogar auf die HSC, schließen (Rabbitts, T.H. et al., 1999). Nach dem heutigen Kenntnisstand geht man bei *LMO2* von einem sogenannten hämatopoetischen „Master-Gen“ aus, das für die Entwicklung nahezu aller hämatopoetischen Linien

verantwortlich ist (Yamada, Y. et al., 1998; Rabbitts, T.H., 1999).

In fast allen fötalen Geweben ist *LMO2* exprimiert, mit Ausnahme vom Thymus und Darm (Royer-Pokora, B. et al., 1995; Neale, G.A.M. et al., 1995a). In Patienten mit der spezifischen Translokation ist *LMO2* in den T-Zellen überexprimiert (Royer-Pokora, B. et al., 1991). Normale Vorläuferzellen der erythroiden/myeloiden Linie exprimieren ebenfalls *LMO2*, während es in reiferen Zellen nicht zu detektieren ist (Dong, W.F. et al., 1996). Patienten mit myeloiden oder lymphoiden Leukämien, ohne die spezifische Translokation, exprimieren vereinzelt auch *LMO2* in den T-Zellen (Royer-Pokora, B. et al., 1991; Dong, W.F. et al., 1996).

Für das *LMO2*-Protein identifizierte man verschiedene hämatopoetische Interaktionspartner, z. B. *SCL* (auch *TAL1*) (Valge-Archer, V.E. et al., 1994; Wadman, I. et al., 1994), *GATA1* (Osada, H. et al., 1995; Osada, et al., 1997), *Elf2* (Wilkinson, D.A. et al., 1997) oder *NLI* (Jurata, L.W. et al., 1996; Visvader, J.E. et al., 1997; Drechsler, M. et al., 1999). *LMO2* besitzt Domänen zur Transkriptionsaktivierung, mit der es ihm möglich ist, die Transkription von Promotoren, die von seinen Interaktionspartnern gebunden werden, zu verstärken (Sánchez-García, I. et al., 1995; Mao, S. et al., 1997a; Mao, S. et al., 1997b), und Repressordomänen (Mao, S. et al., 1997a). Innerhalb von erythroid-spezifischen multiplen Transkriptionsfaktor-Komplexen (Wadman, I.A. et al., 1997) und Komplexen in unreifen T-Zellen (Grütz, G.G. et al., 1998) nimmt *Lmo2* wahrscheinlich eine Art Brückenfunktion ein. Neben einem transkriptionsregulierenden Effekt (Mao, S. et al., 1997a) beeinflusst *Lmo2* damit wahrscheinlich die Hämatopoese auch durch seine Beteiligung an verschiedenen Komplexen (Rabbitts, T.H. et al., 1999).

Das *LMO2*-Gen codiert für zwei alternative Transkripte (Abb. 3); *LMO2a* wird vom Promotor 1 (P1) und *LMO2b* wahrscheinlich von einem bis heute unbekanntem Promotor 2 (P2) initiiert. Diese zwei Transkripte unterscheiden sich in der Länge ihrer 5'- nichttranslatierten Region (UTR), codieren aber für das gleiche Protein (Royer-Pokora, B. et al., 1995).

Die Tatsache, daß das Gen nach der Translokation und Entfernen von Promotor P1 noch exprimiert wird, und das das *LMO2b*-Transkript auch in normalem adulten Nierengewebe zu identifizieren ist, läßt den Schluß zu, daß es noch mindestens einen weiteren Promotor P2 gibt (Royer-Pokora, B. et al., 1995).

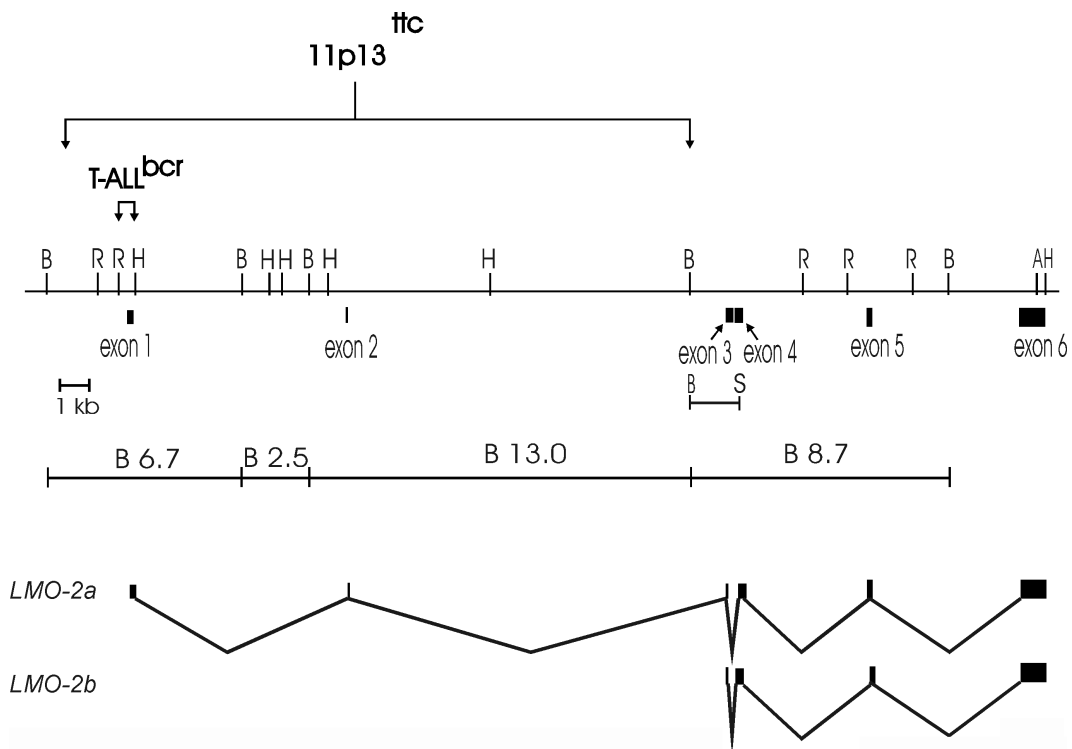


Abb. 3: *LMO2*: Struktur und alternative Transkripte (aus Royer-Pokora, B. et al., 1995). Abkürzungen: B = BamHI, R = EcoRI, S = SmaI, H = HindIII, A = Accl; bcr = *Breakpoint cluster region*; ttc = *T-cell translocation cluster*; B 6.7, B 2.5, B 13 und B 8.7 geben BamHI-Restriktionsfragmente in kb an. In *LMO2b* ist Exon 3 nur partiell identifiziert worden. Der Translationsstart befindet sich in Exon 4.

Zwei verschiedene Transkripte wurden auch in Skelettmuskel und Testis gefunden (Neale, G.A.M. et al., 1995a). In fötaler Leber und Milz ist *LMO2a* hoch exprimiert, während in adulter Niere *LMO2a* nur gering exprimiert wird, sich dafür *LMO2b* in hoher Konzentration detektieren läßt (Royer-Pokora, B. et al., 1995). Zusätzlich läßt sich das kleinere *LMO2b*-Transkript in den Proben der T-ALL-Patienten mit t(11;14) detektieren (Royer-Pokora, B. et al., 1995). Der P1 ist im BamHI-6.7 kb-Restriktionsfragment lokalisiert und besitzt keine TATA-Box, aber potentielle Bindestellen für GATA1 und SP1 sind unweit des Transkriptionsstarts identifiziert worden (Royer-Pokora, B. et al., 1995).

GATA1 ist ein Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich in erythroiden Zellen gebildet wird und ein Hauptfaktor für die Regulation erythroid-spezifischer Gene ist (Martin, D.I.K. et al., 1989; Orkin, S.H., 1995b; Orkin, S.H. et al., 1999), während SP1 ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor ist (Dyanan, W.S. and Tjian, R., 1983; Philipsen, S. and Suske, G., 1999) und meistens die Transkription von Promotoren reguliert, die keine TATA-Box besitzen (Hofmann, W. et al., 1993; Boisclair, Y.R. et al., 1993; Chen, X. et al., 1994; Kollmar, R. et al., 1994; Dusing, M.R. and Wiginton, D.A., 1994; Brown, P.C. and Silverman, J.A., 1996; Körner, K. et al., 1997).

LMO2 ist an der normalen Hämatopoese beteiligt. Translokationen innerhalb des Gens führen oft zur Expression von *LMO2* in T-Zellen, wo es normalerweise nicht exprimiert wird, und dann möglicherweise zur T-Zell-Leukämie T-ALL. Voraussetzung für ein Verständnis der Beteiligung von *LMO2* an der T-Zell-Leukämogenese ist jedoch die Analyse der normale Regulation und der Struktur von *LMO2*, erst dann läßt sich seine Dysregulation erklären.

1.4. Ziele der Analysen

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse (Abb. 4) der Transkriptionsregulation von *LMO2*, einem T-Zell-Onkogen und zentralen Transkriptionsfaktor der humanen Hämatopoese.

Eine funktionelle Analyse der stromaufwärts liegenden Region von Promotor P1 soll durchgeführt werden. Hierfür wird nach Sequenzierung von etwa 3.0 kb diese Region mittels Computer-Analyse auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen hin untersucht. Die Aufklärung der erythroid-spezifischen Regulation von *LMO2* über P1 steht im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen. Dazu wird ein System mit erythroiden Zellen etabliert, in dem die *LMO2*-Expression *in vivo* analysiert werden kann. In einem geeigneten System werden DNaseI hypersensitive Stellen (DHS) vor dem Transkriptionsstart von *LMO2* kartiert. Sie weisen auf Änderungen in der Chromatinstruktur hin, wie sie häufig in transkriptionell aktiven Regionen zu finden sind. Eine Integration der Sequenzdaten mit den Ergebnissen der DHS-Kartierung führt zu Kandidaten-DNA-Sequenzen, die möglicherweise an der *LMO2*-Regulation beteiligt sind.

Für eine detailliertere Analyse werden Oligonukleotide und größere DNA-Fragmente, die Teile des Promotors P1 repräsentieren, mit Protein-Extrakten aus erythroiden Zellen inkubiert und in EMSAs (*Electrophoretic mobility shift assays*) eingesetzt. Spezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen lassen sich so *in vitro* studieren.

Besonders der erythroid-spezifische Faktor GATA1, von dem bereits eine Bindestelle am Transkriptionsstart von *LMO2* lokalisiert wurde, soll untersucht werden. Mit einem *Sense-/Decoy*-Ansatz wird die Beteiligung von GATA1 an der *LMO2*-Regulation untersucht. Mittels Nuklease-resistenten Oligonukleotiden soll GATA1 in einem geeigneten Zellsystem kompetiert und eine mögliche *LMO2*-Expressionsänderung nachgewiesen werden.

Die Aktivität des Promotors wird mittels Reporter-gen-Assays überprüft. In nicht-erythroiden Zellen sind Co-Transfektionen mit Expressionsvektoren für verschiedene Transkriptionsfaktoren (insbesondere GATA1) durchzuführen, um die Beteiligung dieser Faktoren an der Aktivierung des Promotors P1 *in vivo*

nachzuweisen.

Zur komplexen Regulation des *LMO2*-Gens gehört möglicherweise noch mindestens ein zweiter putativer Promotor P2. Das *LMO2b*-Transkript beginnt mit einem partiellen Exon 3 und wurde in normalem adulten Nierengewebe identifiziert. Eine DHS-Kartierungen vor Exon 3 wird durchgeführt. Ein Nachweis neuer alternativer Transkripte rundet das Gesamtmodell der *LMO2*-Regulation ab.

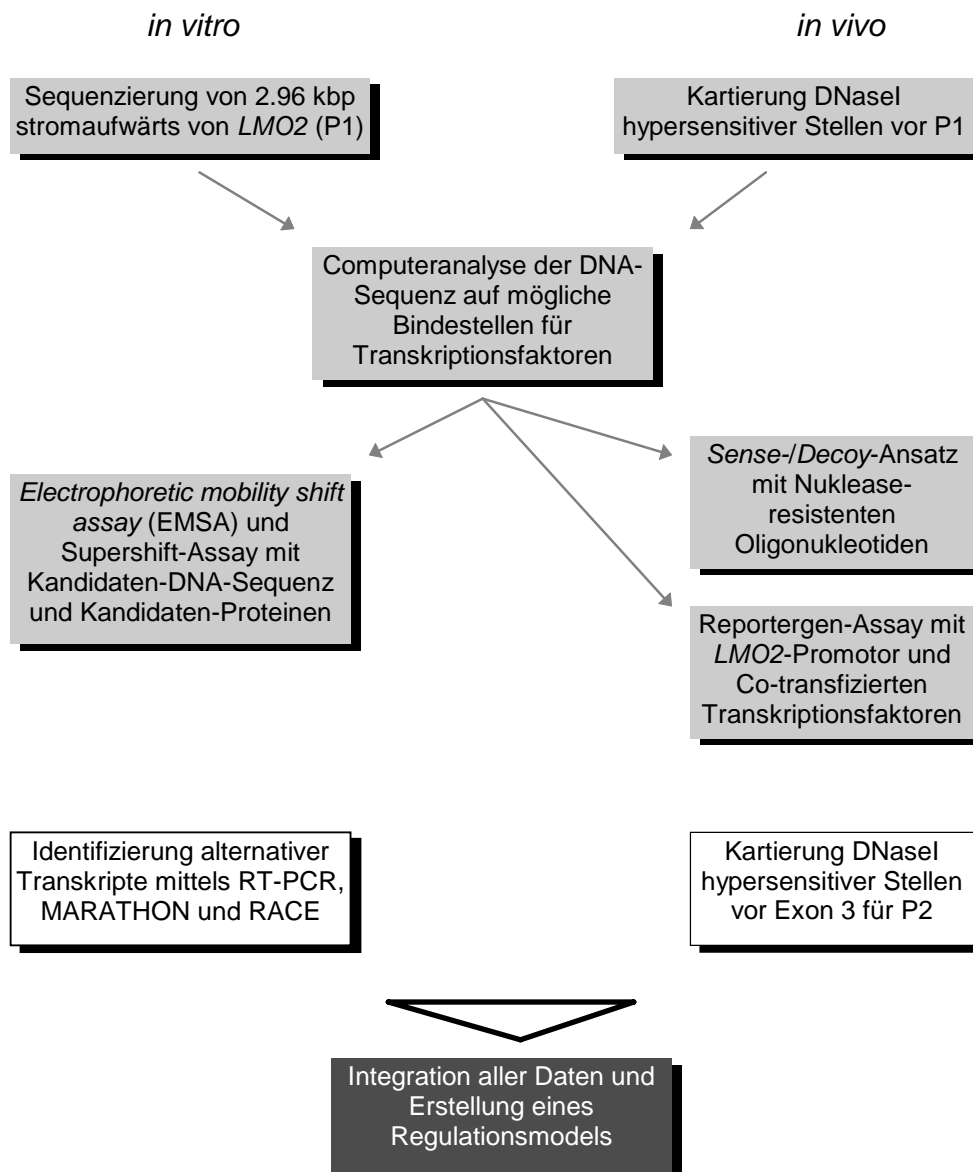


Abb. 4: Methoden-Schema zur Analyse der Transkriptionsregulation von *LMO2*