

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung und Verifizierung der Zelllinien

In dieser Doktorarbeit wurde ein geeignetes erythroides Zellsystem für *in vivo* Funktionsstudien an bestimmten exprimierten Genen etabliert. Zwei erythroide Zelllinien standen in unserem Labor zur Verfügung: die K562-Zelllinie (Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B.; 1975) und die humane erythroide Leukämie- (HEL-) Zelllinie (Martin, P. and Papayannopoulou, T., 1982).

4.1.1. Molekulargenetische Charakterisierung

Welche Zelllinie als Modell verwendet werden sollte, wurde als erstes durch Studie der Expression spezifischer Gene ermittelt. Sowohl das Gen *LMO2* selbst, als auch andere erythroid-spezifische Gene sollten exprimiert sein. Die K562-Zellen exprimieren phänotypische Marker, typisch für Zellen der erythroiden Linie (Andersson, L.C. et al., 1979), und auch die HEL-Zellen zeigen erythroide Charakteristika, wenngleich auch nicht-erythroide Marker zu beobachten sind (Martin, P. and Papayannopoulou, T., 1982).

Beide Zelllinien zeigen Charakteristika einer frühen Stufe der Differenzierung. Auch wenn Marker anderer hämatopoetischer Linien exprimiert werden, so lassen sich sowohl die K562- als auch die HEL-Zellen zur Differenzierung induzieren, beispielsweise mit Hemin-Chlorid, und zeigen dann Charakteristika späterer Stufen der erythroiden Reifung (Larson, A.E. and Papayannopoulou, T., 1985).

Beide Zelllinien wurden auf die Expression von *LMO2*, *GATA1*, ϵ -Globin und *c-Myc* im Northern Blot untersucht (Abb. 7). Zur Quantifizierung wurde die Aktin-mRNA verwendet.

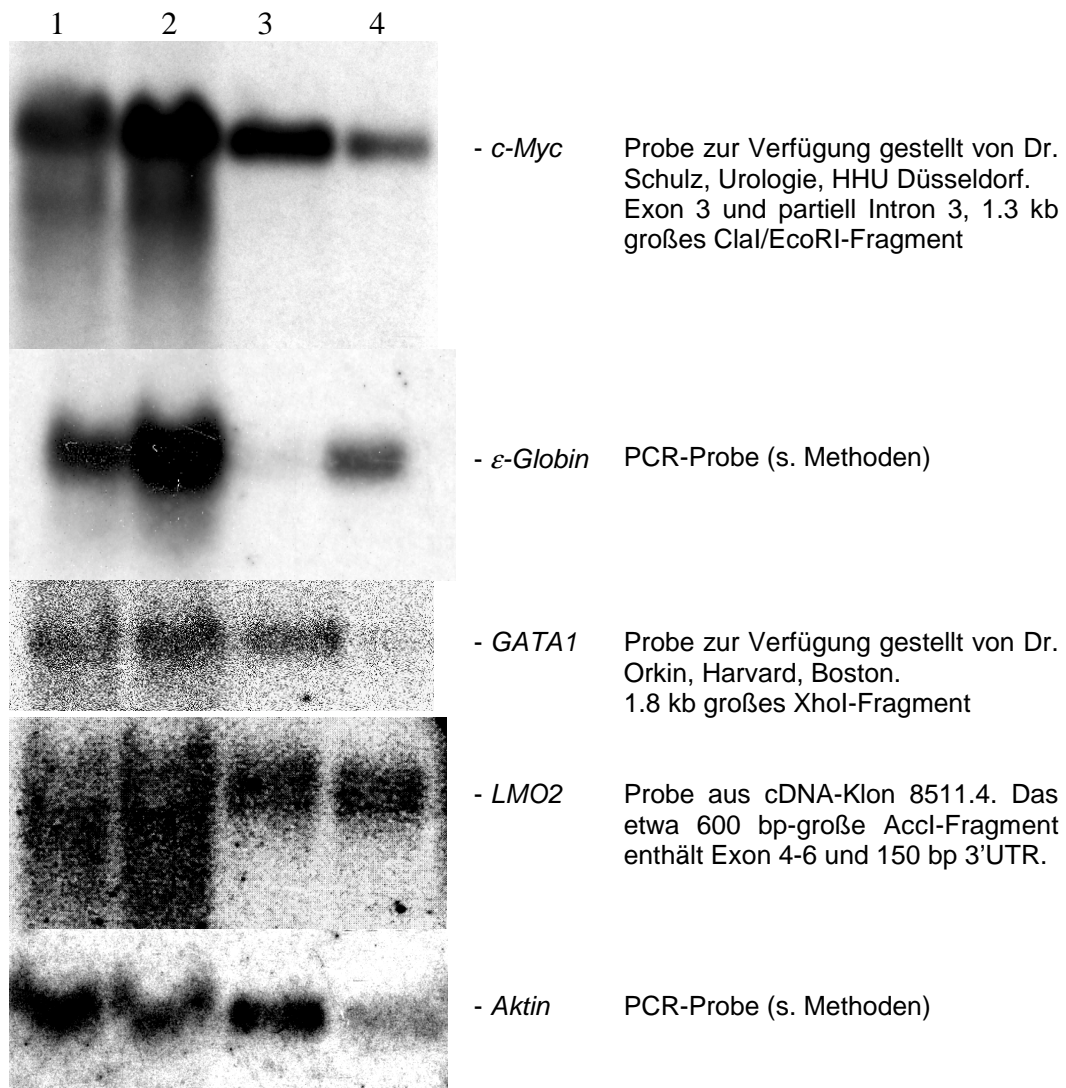


Abb. 7: Northern Blot von HEL- und K562-Zellen - Expression erythroider Gene. Bahn 1 = 10 µg Gesamt-RNA aus K562-Zellen, Bahn 2 = 10 µg Gesamt-RNA aus HEL-Zellen, Bahn 3 = 1 µg Poly(A)-RNA aus K562-Zellen, Bahn 4 = 1 µg Poly(A)-RNA aus HEL-Zellen.

In Abb. 7 ist zu erkennen, daß beide untersuchten Zelllinien *LMO2* exprimierten. Im Vergleich von Bahn 3 und 4 (Poly(A)-RNA aus K562- und HEL-Zellen) mit der *Aktin*-Expression konnte gezeigt werden, daß in HEL-Zellen mehr *LMO2* exprimiert wurde als in K562-Zellen. In den Bahnen 1 und 2, wo Gesamt-RNA der beiden Zelllinien aufgetragen wurde, ist ein deutlicher Schmier von *LMO2* nach unten zu kleineren Größen zu beobachten. Eine Degradation kann

ausgeschlossen werden, da die anderen Hybridisierungen keinen oder kaum einen Schmier zeigten. Möglicherweise ist ein heterogenes Poly(A)-oder 3'-Ende der Grund für diese Beobachtung, da die Poly(A)-RNA (Bahn 3 und 4) im Gegensatz zur Gesamt-RNA für *LMO2* keinen Schmier zeigt. Da die Poly(A)-RNA mittels Oligo(dT)-Cellulose (mit definierter Länge) präpariert wurde, sind dort auch nur mRNA-Moleküle mit Poly(A)-Schwanz oder zumindest definierter Poly(A)-Länge zu finden.

Die *GATA1*-Expression ist in HEL-Zellen (Bahn 4) und in K562-Zellen (Bahn 3) nach Vergleich mit der *Aktin*-Expression etwa gleich groß. Während die *c-Myc*-Menge mit der *Aktin*-Menge korreliert, war das *ε-Globin* sehr viel stärker in HEL-Zellen als in K562-Zellen exprimiert.

Die unterschiedlichen RNA-Präparationen aus K562-Zellen (Bahn 1 und 3) zeigten für die *ε-Globin*-Probe unterschiedliche Intensitäten. Während das *Aktin*-Signal etwa gleich stark ist, so ließ sich in der Poly(A)-RNA-Präparation aus K562-Zellen (Bahn 3) ein viel schwächeres Signal für *ε-Globin* detektieren als in der Gesamt-RNA-Präparation (Bahn 1). Die RNA-Präparationen aus HEL-Zellen zeigten solche Abweichungen nicht. Möglicherweise sind in K562-Zellen weniger *ε-Globin*-mRNA-Moleküle mit Poly(A)-Ende enthalten.

Für weitere Untersuchungen wurden daher HEL-Zellen verwendet, die eine stärkere Expression von *LMO2* und *GATA1* (Bahn 2 und 4) und keine Abweichungen in den unterschiedlichen Methoden zur RNA-Präparation zeigten.

4.1.2. Zytogenetische Verifizierung und Mycoplasmen-Detektion

Vor dem Beginn der Analysen wurde die HEL-Zelllinie auf chromosomale Veränderungen gegenüber der ursprünglich beschriebenen Linie untersucht. Sowohl die HEL-Zelllinie, wie auch jede andere Zelllinie, neigten zu chromosomalen Veränderungen in der Zellkultur, die ein artifizielles System darstellt (Heim, S. and Mitelman, F.; 1995). Mögliche Kontaminationen mit anderen Zellen sollten auch untersucht werden.

Die folgende zytogenetische Beurteilung der HEL-Zelllinie wurde von Frau Dr. Barbara Hildebrand im Düsseldorfer Institut für Humangenetik und Anthropologie durchgeführt. Mit ihrer freundlichen Genehmigung sind die Ergebnisse hier mit denen der ursprünglichen Charakterisierung durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig verglichen worden (Tabelle 1).

Untersucht wurden 100 Metaphasen, welche den sehr seltenen Marker $der(9)qdp(9)(p11p24)t(9;20)(p24;?q11)t(11;20)(q13;?q13)$ zeigten. In allen Präparationsqualitäten war diese Aberration zu finden.

In der untersuchten Population sind keine chromosomalen Marker für fremde Zellen (z.B. HeLa-Zell-Marker) gefunden worden, sondern ausschließlich HEL-Chromosomenmarker (Tab. 1). Es konnten keine Aussagen über Intrazellinien-spezifische Evolutionsschritte gemacht werden. Einige neue numerische oder strukturelle Aberrationen wurden gefunden, beispielsweise eine Metaphase mit dizentrischem Chromosom.

Die Aberration $der(9)qdp(9)(p11p24)t(9;20)(p24;?q11)t(11;20)(q13;?q13)$ wurde relativ stabil weitergegeben und der Großteil der Marker war in den verwendeten Zellen vorhanden. Frau Dr. Hildebrand bestätigte die verwendete Zelllinie als HEL-Linie.

DSMZ Beurteilung	Ergebnisse (Fr. Dr. Hildebrand)
hypotriploid	hypotriploid
2,3 % polyploid	partiell polyploid
63 (60-64) <3n> XYY	63 (60-64) <3n> XYY
-2, -9, -10, -10, -11, -14, -16, -16, -17, -19, +20, +21, +r	-9, -10, -10, -11, -14, -16, -16, -19
der(2)t(2;7)(q14;q32)	der(2)t(2;7)(q14;q32)
add(3)(p14/21.3)	N.d.
der(4)t(4;17)(q13.3;q12)	der(4)t(4;17)(q13.3;q12)
add(5)(q12)	add(5)(q12)
der(6)t(1;6)(p31.3;p23)	N.d.
der(6)t(3;6)(p21;q21)	N.d.
der(7)t(2;7)(q14;q32)t(7;?18)(p14;q21)	N.d.
der(9)qdp(9)(p11p24)t(9;20)(p24;?q11) t(11;20)(q13;?q13)	der(9)qdp(9)(p11p24)t(9;20)(p24;?q11) t(11;20)(q13;?q13)
add(17)(p21)	N.d.
add(20)(q11)	N.d.
r(20)(p11q11)	N.d.
dup(21)(qter;q11)	dup(21)(qter;q11)
add(22)(p11)	N.d.

Tabelle 1: Zytogenetische Überprüfung der HEL-Zelllinie. N.d. = Nicht detektiert in der untersuchten Metaphasen-Population, r = Ringchromosom, t = balancierte Translokation, dup = Duplikation, qdp = Quadruplikation, add = Zusätzliches Material unbekanntes Ursprungs, der = derivatives Chromosom.

Die Familie der Mycoplasmen (Mycobakterien) umfaßt verschiedene Bakterien, die verantwortlich sind für verschiedene Infektionskrankheiten (Allen, B.W., 1998). Sie stellen eine potentielle Kontamination von Säugerzellkulturen dar, die u. U. einige Untersuchungsergebnisse verfälschen können.

Für den Nachweis einer möglichen Mycoplasmen-Kontamination wurde der Mycoplasmen-PCR-Kit von Boehringer Mannheim verwendet. Mit ihm ließen sich etwa $\frac{3}{4}$ der heute bekannten Mycoplasmenarten nachweisen. Alle verwendeten Zelllinien sind auf eine mögliche Kontamination hin getestet worden (Abb. 8).

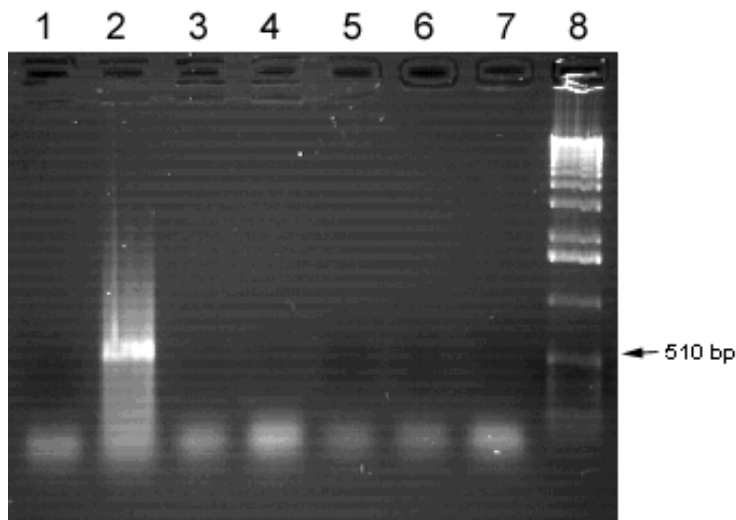


Abb. 8: Elektrophorese nach Mycoplasmen-PCR. Erwartetes PCR-Produkt der Positivkontrolle bei 510 bp. Bahn 1 = Wasserkontrolle, Bahn 2 = Positivkontrolle mit Mycoplasmen-DNA, Bahn 4 = NIH3T3-Zellen, Bahn 4 = HEK293-Zellen, Bahn 5 = COS-7-Zellen, Bahn 6 = HEL-Zellen, Bahn 7 = K562-Zellen, Bahn 8 = 1 kb-Marker.

Alle verwendeten Zelllinien (inkl. B-Zellen, Daten nicht gezeigt) zeigten keine Mycoplasmen-Kontamination (Abb. 8) und konnten daher für alle weiteren Experimente verwendet werden. Mit der im Kit enthaltenen Mycoplasmen-DNA (Positivkontrolle) ließ sich die erwartete 511 bp-Bande amplifizieren.

4.2. Genomische Sequenzierung der 5'-flankierenden Region

Um die 5'-flankierende Region von *LMO2* zu charakterisieren, wurde zunächst die genomische Sequenz innerhalb einer definierten Region, die den P1 enthält, bestimmt. Die Restriktionskarte von *LMO2* war bekannt (Royer-Pokora, B. und Drechsler, M., unveröffentlichte Daten) (Abb. 9A) und ein Teil des BamHI-6.7 kb-Klons wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit subkloniert und sequenziert. Für diesen genomischen Bereich, in dem sich auch Exon 1 und der Transkriptionsstart befindet, wurden vier verschiedene Subklone (Abb. 9A) angefertigt und diese sequenziert. Genau 3213 bp zwischen BamHI und einer zweiten BglII-Schnittstelle (inkl. Transkriptionsstart) wurden bestimmt (Abb. 10). Davon waren 2960 bp stromaufwärts liegende Sequenzen. Die Sequenzierung mit dem Li-Cor-Sequenzierer von MWG Biotech lieferte durchschnittlich 700 - 800 Basen (teilweise bis 1000 Basen) qualitativ auswertbare Sequenz.

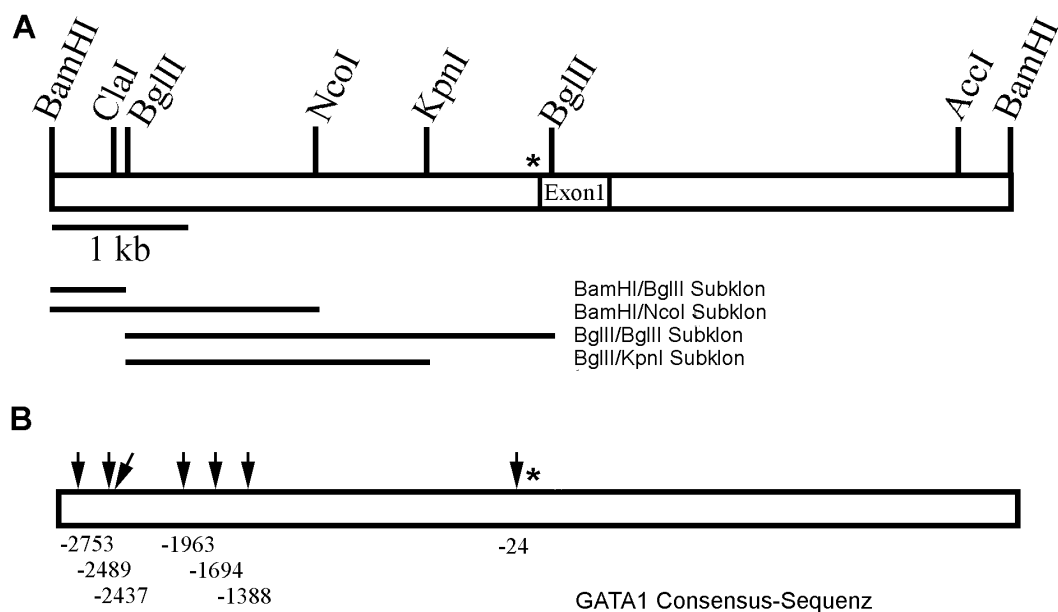


Abb. 9: Restriktionsfragment BamHI-6.7 kb mit Exon 1 von *LMO2* und Transkriptionsstart (markiert durch einen Stern). (A) Restriktionskarte (aus Pruess, M.M., in Vorbereitung; Drechsler, M., unveröffentlichte Daten). Subklone: BamHI/BglII = 0.5 kb, BglII/BglII = 2.7 kb, BamHI/NcoI = 1.8 kb, BglII/KpnI = 1.8 kb. (B) GATA1-Consensus-Sequenz innerhalb der sequenzierten Subklone, Positionsangaben relativ zum Transkriptionsstart (in kb), und durch einen Pfeil markiert.

In Abb. 9B sind die potentiellen Bindestellen für GATA1 mit Pfeilen markiert worden, die der Consensus-GATA1-Sequenz [(A/T)GATA(A/G)] entsprechen. Die Nukleotidsequenz (EMBL Acc. No.: AJ250281) ist in Abb. 10 dargestellt. Mit Hilfe des MatInspector-Programms (Quandt, K. et al., 1995) konnten potentielle Bindestellen für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Die möglicherweise relevanten Stellen wurden farbig hervorgehoben.

1	GATCCTGTA AAAACTATATTCTGACCATAGTCTGACACTCTGCATAATG
51	AACAATTAGCCGGGAAAACATAGTATTTGAACCTCCTTTGCAGAGAGGAA
101	ATTCTCACA ACTCCAAAGCAATAGTCAGCCACAGTCAATGCCATCTCAT
151	CACCCAGCCCAAGGCTCTGGCCTAAAACCTTCTAGAGGGTCTCACTCTAA
201	AGATAA CCCAAAGGCTCACAGTTCCTGGTTGCAAAAACGACAACAGGA
251	GCAGGAATTGAGACCTAAAGATCATTGGGTAGAAATGAGGAAAGAAATG
301	ACATGTTAAATGATGATTTTTCCCTAACTTGCCTTGTCTTTCTAGATGT
351	GGCTCAAGAACTTGCAGAGTTATGGTGGGATAATTGACTGATCAAATGC
401	TGAAAGTTTTCTATCGACTTCAAGGCTGTTCAAATCTCTATGTACTTG
451	AAGTCTGAGGCACA AGATAA TTTCCCAGAGATTCATGTTTCTATCGATGC
501	TAGGCTGGGCTGACAC AGATAA CCCCTCAAGAGGCCTTCCGAACTGCTG
551	TATAAACTGTCTGGGTCCAGCAATAAAGCAACTGTGTCATTATAGTTCT
601	CTGCCCTCAGAAGATCTGATCTTAATACCCTTCTTCTTTTTGTCCCT
651	CTGATTTTCATCAAATTTGTTGCCATTCTGGGTGTTTCTCCTTCTCTCCCT
701	GACTTTTTCTACTTCAGATCAAAGAACTTCCCCTTTTTCCCACTTTTGA
751	TTTGCGCCCTGGAGGACAACGCAAGGTTAACTTCCCTCCCACCTCCTCTT
801	GTAGGCACACAGGGTGCCCTTAGCCAGCGAAATCTCCGCGCCCGAGATC
851	CTCTCACAATTTCAGGCTGGTGAATTGTAGTAGGAGACATGGTTTAGTTT
901	GATGTGGGTTAAGTCAGTCATCATGGCATCTTCGTACCCTCAGCCCCAAA
951	CCGCTCTCTACTCATCACCCCTCACTTTTCAATTTCTTTGGAT TATCTT TCA
1001	TCGGCTTACCACCAGCCTTACAGCCTCACCCAAGGCTGAAGCAGGGCTA
1051	GCAGGGTGGTGC GTTTCCCTTCCCTGTTGAGCTGGT GACTGCTGTGGGTA
1101	AGCAGGTCCAATGTGAACTCAATTTTACATTGAGAAAAGAGAAAGCAAGAG
1151	TGAGTGGGCTGCTAAGACTGTTGCTTCATGGTTTCCCCTAAGCCCCAGAA
1201	ATAGAAAGGCAGACTTCCGACTGGCAGAGCCCGTATGCTAACCACCAGAC
1251	CACACTGCC AGATAA GAAAAATGTTGATTGTGTCATACT CCCTCATTG
1301	GCTCCAGT GTCTGAAAATGGCCCTGAATTTAGAGAGTCTTACCATGACC
1351	CAGGGATTTAGAGAGGATCGAAGAGGGAGGACAAAGGAATCAGGCACCTT
1401	CTCTCTCTTTTTCTGGGGTAAATTTATTTTCAACCACAAAAGTAAAGGA
1451	AAGAAAAAGTCACAACAGATGAGTTATGAGCTAAC TTTCTGATTGCACA
1501	TGTAAGAGAAAGAAATGAACTGGATATCATTACACATTGAGAAAGGGAGT

1551	CAGGTTTTTTCAATTTATCTTCGGCCTTTTTGATTTACACGTGTTTATT
1601	TATGAGTACCTGCTGTGTGCCAGGGTACTACGAACCACGACGGTTAAGTT
1651	TCTCTTTATTCTGTGGAGGAACGTTTCACTCTTCCGTCTTGATCTAAGTC
1701	TAAGTGGATCTAAAGTTGAGAACACGAGTCCGGTGGTGGTGGTACCT
1751	TTGTTAAAACGAACTGAGAGGGGCGCGTCCGGCGCCGTCCGCACACACAAC
1801	AGTCTGTGACGTCCTTCTCACTACCGGACCCACAACGTCCGAGGATTAA
1851	CCTCCATCCTCCACGGTGGTCTCTAGTCGATATTTTCTATAGAAACCTG
1901	ACCCACCCGACGATTACGAACCTTCTCTGAACACCCACTCCGGGCCACT
1951	CGACAGTGGAGCCTTAACCCGGAACGGGTCGTCTGTCTGTACGTACGCC
2001	CCTCCATCGACTGTCTGTCCCCGCGTACCCCTTCGTCCGTAAGGTCTCTT
2051	GACGTTGTCGTCTAACGTTTGGTCTGAAGTCTGAGTCTCGCCCTGTTC
2101	CTTCTCTCGGATATCACCGGGTTTCGGGTCCAGTCTCCGTCCCGGT
2151	CCTCTCGTCGACTGTTCTCGAAATACCATTCTGTTTTCTTCTTGTCTCGG
2201	CCTCAGAGGAAAATAAGTCGAGTATTTCTGGGTTGAAGACAGTGAATAT
2251	TGACAAGTCTGGGACTCCCCAAGTTTTTTTCTTGGCACAATCCTCTTAAG
2301	TTATAAATTAATTCTCTACTAGTCTAGGCACGTGGCTTAATAACGACCC
2351	ATTCTGTTATGACACACACAATGTATCGTAACCTTGAATCCTTTCGAGAA
2401	AGGAACACAACAAATTAATTAGGTGAGTTGTTGGGACGTTTCACCCATG
2451	GTAACAGGGACAAAAATACTTACTCCCCACTCCACGACTCTTCGACAC
2501	ATGCAATAAACTCAAACAGACCGATCAGTCACCGACTCGGTTCAAGGTTA
2551	GGTCCAGTACACTCGGAGACTTGAAAGACTATTTGGACGTCTGGGGGAA
2601	TTGACCCTATTATATCAGTACGTAATTCGTTCTTCTCTTCAATTTATGTC
2651	CGACTACCACATCCCCTCTTTAAGTTTCCCTCTTCCGGATCCTCCCTCTC
2701	CCTCGATACACACTTGTCTTGGTTTCTACCGGAGACCCTTAACCTTCCAG
2751	AGAACCCTAAGCAGGTTTGACTCCTAGTGTTCAGAGGTGTAAGACTCATC
2801	CTCCTACTCCCAGACTCAATCCTAAACCCAGGACGTCCCGAACGATTCTC
2851	TAGGGGACTACCGGATCCTAAGGTGCGTCTCGTGTAGACCACACTCTCTC
2901	GAGCGACGTTCCCACTTCGAGGCGGGATAGTCTATCTGTTGGTCCGGTGG
2951	TTCTCCGGGTCGGGAGGTTTGGGACCTAAACGTTGTAGGAGTTTCTTGTCT
3001	GTTGCCCGGAACCTCGTCTTAACTCTTCTTTATGGGGGTGGACGGGAGTCT
3051	GGCAATTCACCCCTAACGATAAGTGTTCCTCCGGAGACCCACAGGACTGTCT
3101	CTCCCTCTACCGTGTCCGTGGTCCACGATCCACGGTCCCGGAGGGGCTC
3151	TTCTTGTCCACGTTTCGTCCGTTAATCGGGTCTTCCATAGGCACCCCGT
3201	CCGTCCGATCTAG

Abb. 10: Genomische Sequenz stromaufwärts von *LMO2*. GATA1-Bindestellen in rot, SP1-Bindestelle in blau, GATA1- und SP1-Überlappung in violett, CCAAT-Box in grün, E-Box ist doppelt unterstrichen; Exon 1 ist punktiert unterstrichen.

Die GATA1-Consensus-Sequenz AGATAA (rot hervorgehoben in Abb. 10) wurde sechsmal in der stromabwärts liegenden Region gefunden (-1388 bp, -1694 bp, -1963 bp, -2437 bp, -2489 bp und -2753 bp relativ zum Transkriptionsstart), zusätzlich zu den bereits früher publizierten zwei GATA1-Stellen (-24 und -32 bp relativ zum Transkriptionsstart) und einer SP1-Stelle (-37 bp relativ zum Transkriptionsstart) (Royer-Pokora, B. et al., 1995) unmittelbar am Transkriptionsstart. Weiterhin wurde eine Consensus-CCAAT-Box (Mantovani, R., 1998) (-1651 bp relativ zum Transkriptionsstart) und ein E-Box-Motiv (Wadman, I. et al., 1997) (-1386 bp relativ zum Transkriptionsstart) gefunden. Das E-Box-Motiv ist eine Bindestelle u. a. für E47 (Hsu, H.L. et al., 1991) und ist oft in der Nähe von anderen DNA-Bindemotiven (z. B. GATA1) lokalisiert, wo sie zusammen ein sog. *bipartit*-DNA-Bindemotiv bilden, die durch 9 bp voneinander getrennt sind (Wadman, I. et al., 1997). In der stromabwärts liegenden Sequenz von *LMO2* ist das in Abb. 10 dargestellte E-Box-Motiv 17 bp stromaufwärts einer GATA1-Stelle lokalisiert worden und entsprach nicht exakt dem DNA-Bindemotiv, wie es für erythroid-spezifische DNA-Komplexe, bestehend aus Tal1, E47, GATA1, NLI und LMO2 (Wadman, I. et al., 1997), beschrieben wurde. Das CCAAT-Motiv (-1651 bp relativ zum Transkriptionsstart; in Abb. 10 grün hervorgehoben) ist eine potentielle Bindestelle für das NF-Y-Protein und befindet sich meist 50 - 100 bp vom Transkriptionsstart entfernt, wobei es auch Promotoren gibt, deren CCAAT-Box weit über 1000 bp stromaufwärts lokalisiert ist (Mantovani, R., 1998). Ob die in der sequenzierten Region identifizierte CCAAT-Box tatsächlich eine funktionelle Bedeutung hat, ließ sich aus der Sequenz allein nicht ableiten.

4.3. Kartierung von DNaseI hypersensitiven Stellen

Eine frühere Studie (Boehm, T. et al., 1989) beschrieb im BamHI-6.7 kb-Restriktionsfragment, in dem später Exon 1 von *LMO2* identifiziert worden ist (Royer-Pokora, B. et al., 1995), eine DNaseI hypersensitive Stelle (DHS) in B-Zellen. Untersucht wurde jetzt, ob sich weitere DHS im Promotor P1 von *LMO2* befinden und ob sich Muster-Unterschiede in verschiedenen erythroiden und nicht-erythroiden Blutzelllinien nachweisen lassen. Weiterhin wurde geprüft, ob sich ein postulierter zweiter Promotor P2 (Royer-Pokora, B. et al., 1995) im BamHI-8.7 kb-Restriktionsfragment befindet. DHS-Kartierung für P1 und P2 wurden in HEL-Zellen und immortalisierten B-Zellen durchgeführt (Abb. 11 und 12), für P2 zusätzlich noch in HEK293-Zellen (embryonale Nierenzellen) (Abb. 13).

Zur Optimierung der DNaseI-Behandlung von HEL-Zellen wurden DHS-Kartierungen in der stromaufwärts liegenden Region des ϵ -Globin-Gens durchgeführt (Daten nicht gezeigt), wie sie bereits von Grosveld, F. et al., 1987 beschrieben wurden. Die DNA ließ sich nach der DNaseI-Behandlung mit Asp718 (Boehringer Mannheim) schneiden und wurde nach einem Southern Blot mit einer ϵ -Globin-Probe (Exon 2, 240 bp, mittels PCR) hybridisiert. Nach der Hybridisierung waren die erwarteten Banden (Grosveld, F. et al., 1987) zu sehen. Zusätzliche Banden sind auf einen unvollständigen Verdau mit Asp718 zurückzuführen, möglicherweise spielte dabei die Methylierungssensitivität des Enzyms eine Rolle, da für diese Experiment nicht-klonierte genomische DNA eingesetzt wurde. Dennoch ließen sich die Parameter für den DNaseI-Verdau wie DNA-Konzentration, DNaseI-Konzentration und Inkubationszeit ermitteln.

Für die HEL-Zellen waren die optimalen Parameter: 40 μ g DNA, 5 Units DNaseI (Totalverdau ab 50 U) und eine Inkubationszeit von 20 min. bei 37°C. Für B- und HEK293-Zellen verlängerte sich die Inkubationszeit auf 40 min.

DHS (HEL-Zellen)	DHS (B-Zellen)	Bandengröße (BamHI/ClaI) [kb]	Bandengröße (BamHI/AccI) [kb]	relative Entfernung zum Trans- kriptionsstart [kb]	Position von Bindestellen in der DNA-Sequenz [kb]
1	---	2.9 - 3.0	*	0 - -0.1	-24 -32
2	2	1.3 - 1.4	5.3 - 5.4	1.6 - 1.7	-1651 -1694
3	---	0.8 - 0.9	*	2.1 - 2.2	-1963
4	---	0.6 - 0.7	*	2.3 - 2.4	-2437
5	---	0.4 - 0.5	*	2.5 - 2.6	-2489 -2753

Tabelle 2: DHS-Kartierung. Dargestellt sind die Bandengrößen im Southern Blot (hybridisiert mit dem BamHI/ClaI- und BamHI/AccI-Fragment) und die entsprechenden Entfernungen relativ zum Transkriptionsstart [kb]. Zum Vergleich sind die Positionen der GATA1-Consensus-Sequenzen relativ zum Transkriptionsstart [kb] aufgeführt worden.

* = Nicht gezeigt, oder konnte elektrophoretisch nicht aufgetrennt werden. Rot = GATA1-Bindestelle, grün = CCAAT-Box-Motiv. GATA1-Bindestelle in Position -1388 bp relativ zum Transkriptionsstart wurde nicht in der Tabelle berücksichtigt.

Für die Hybridisierungen der Southern Blots wurden Endproben vom BamHI-6.7 kb-Fragment benutzt (BamHI/ClaI und BamHI/AccI, s. Abb. 11). Fünf DHS (DHS1, 2, 3, 4 und 5) in HEL-Zellen und eine DHS in B-Zellen ließen sich im BamHI-6.7-Fragment identifizieren (Abb. 11). Die DHS2 in HEL-Zellen entsprach der Größe nach der DHS in B-Zellen (Position -1.7 kb zum Transkriptionsstart) und ist wahrscheinlich die bereits früher (Boehm, T. et al., 1989) beschriebene. Diese DHS wurde im folgenden ubiquitäre oder auch nicht-linienspezifische DHS2 genannt. Die anderen vier DHS (DHS1, 3, 4 und 5) in HEL-Zellen wurden im weiteren Verlauf als erythroid-spezifisch identifiziert. Eine Stelle befand sich unmittelbar am Transkriptionsstart (DHS1), die anderen drei waren über 2 kb entfernt (DHS3, -2.1 kb; DHS4, -2.3 kb; DHS5, -2.5 kb) (Abb. 11 und Tabelle 2).

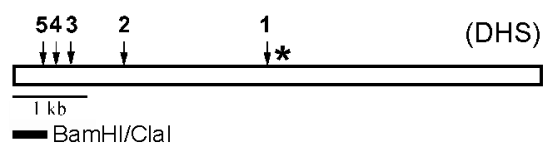
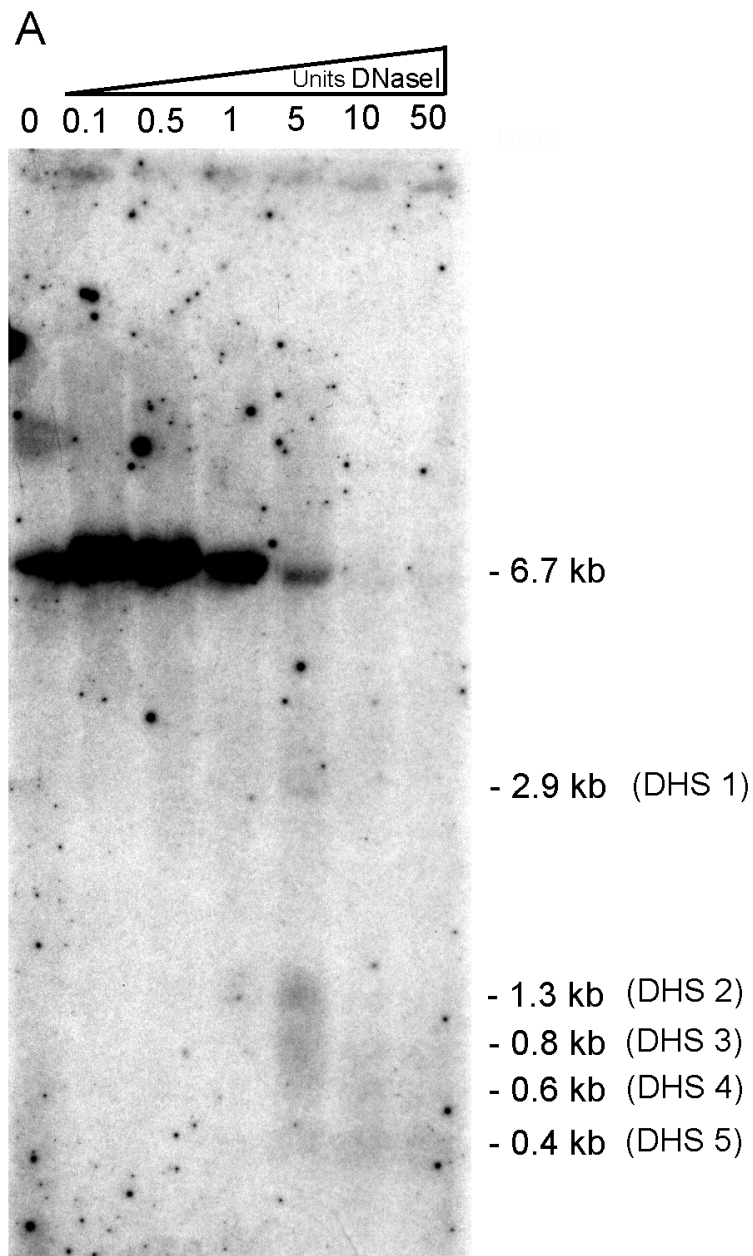


Abb. 11A: DHS-Kartierung in HEL-Zellen für den Promotor P1-Bereich. Southern Blot mit DNA aus HEL-Zellen und mit steigenden Mengen (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 und 50 U) DNase I behandelt. Hybridisiert mit einer BamHI/Clal-Probe aus dem BamHI-6.7 kb-Fragment (Position eingezeichnet). Größen der Banden und ihre entsprechenden DHS sind dargestellt. Transkriptionsstart ist mit einem Stern markiert.

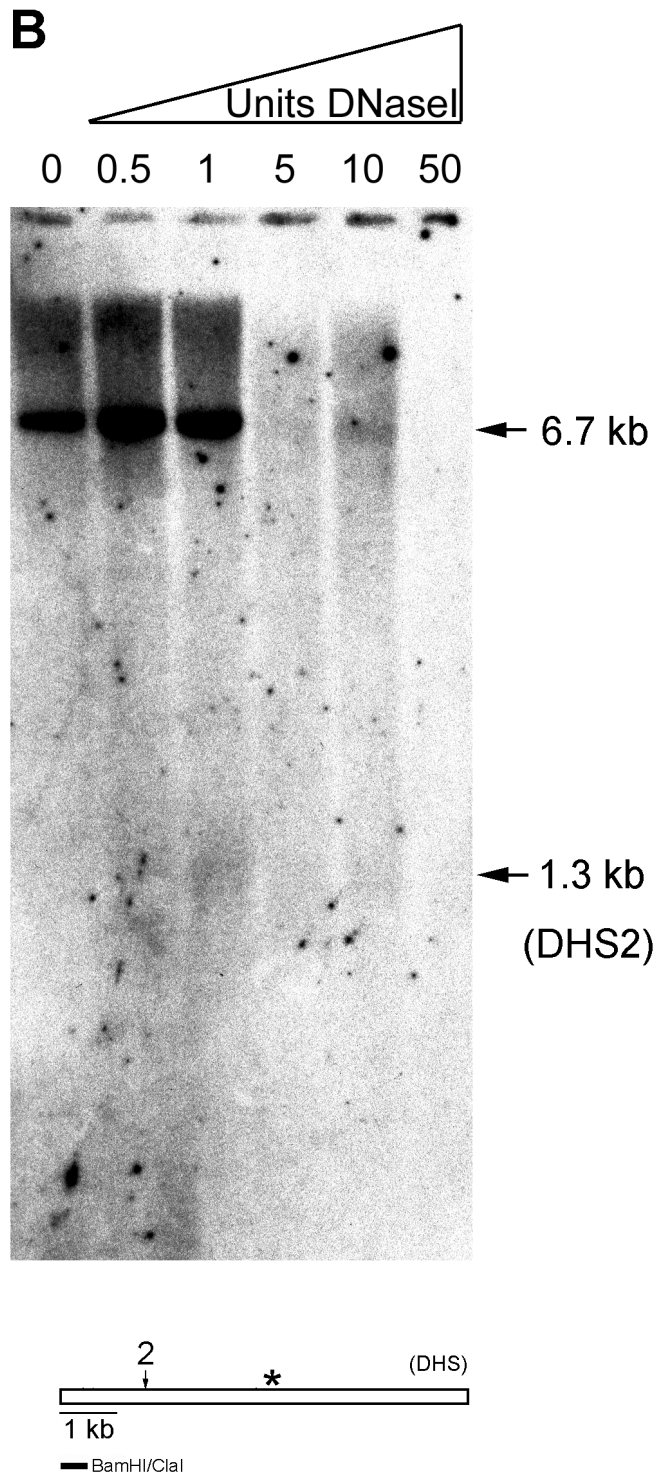


Abb. 11B: DHS Kartierung in B-Zellen für den Promotor P1-Bereich. Southern Blot mit DNA aus B-Zellen und mit steigenden Mengen (0, 0.5, 1, 5, 10 und 50 U) DNaseI behandelt. Hybridisiert mit einer BamHI/ClaI-Probe aus dem BamHI-6.7 kb-Fragment (Position eingezeichnet). Größen der Banden und ihre entsprechenden DHS sind dargestellt. Transkriptionsstart ist mit einem Stern markiert.

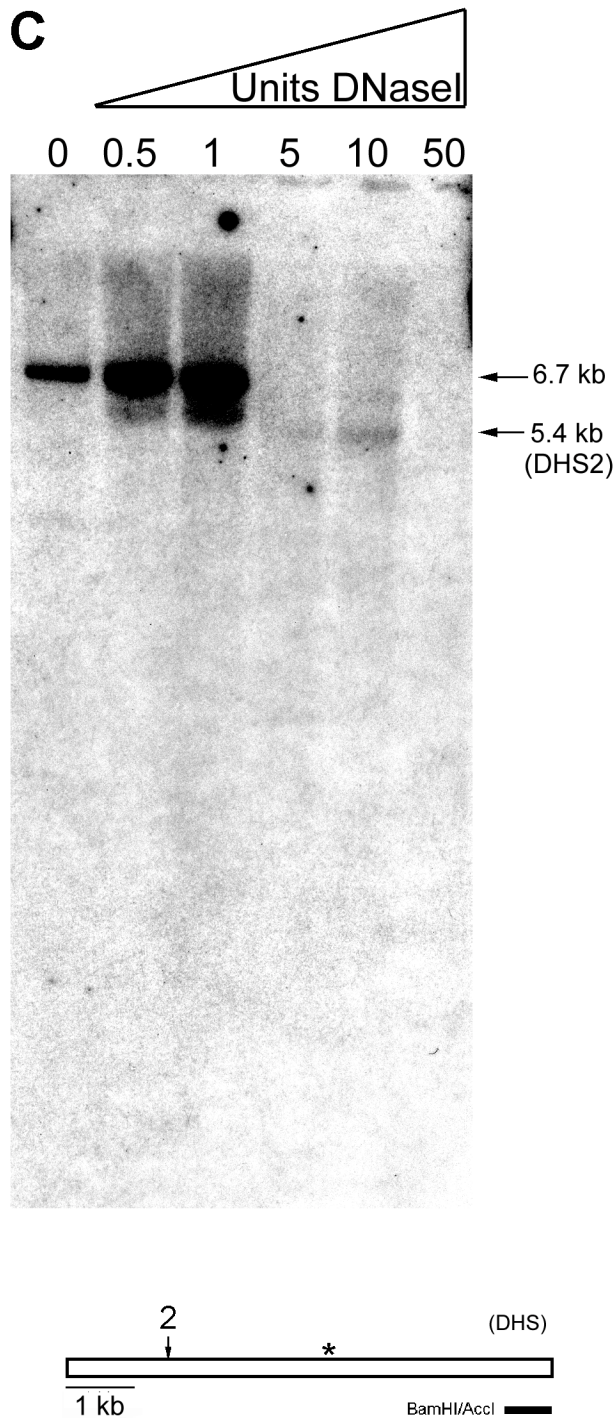


Abb.11C: DHS Kartierung in B-Zellen für den Promotor P1-Bereich. Southern Blot mit DNA aus B-Zellen und mit steigenden Mengen (0, 0.5, 1, 5, 10 und 50 U) DNase I behandelt. Hybridisiert mit einer BamHI/AccI-Probe aus dem BamHI-6.7 kb-Fragment (Position eingezeichnet). Größen der Banden und ihre entsprechenden DHS sind dargestellt. Transkriptionsstart ist mit einem Stern markiert.

Die erythroid-spezifischen Stellen DHS1, 3, 4 und 5 kartierten in Regionen, wo sich potentielle GATA1-Sequenzen (Abb. 10) in der genomischen DNA befanden (Tabelle 2). DHS2 wiederum kartierte in eine Region, in der sich eine potentielle CCAAT-Box befand (Abb. 10 und Tabelle 2).

Eine Hybridisierung von DNA aus HEL-Zellen mit der BamHI/AccI-Probe wurde nicht durchgeführt, da die zu erwartenden Banden (6.3 kb, 6.1 kb und 5.9 kb) im Southern Blot nicht aufzutrennen sind. Mit der Probe vom anderen Ende gibt es kleinere Banden (s. Abb. 11A), die zwar diffuser als die Großen waren, dafür ließen sie sich jedoch elektrophoretisch auftrennen und im Southern Blot nachweisen.

Für Southern Blots aus B-Zellen wurden die Hybridisierungen mit beiden Endproben des BamHI-6.7 kb-Fragmentes (BamHI/ClaI (Abb. 11B) und BamHI/AccI (Abb. 11C)) durchgeführt. Sie lieferten eine DHS (DHS2), die der DHS in der bereits publizierten Arbeit von Boehm, T. et al., 1989, entsprach. Die Entfernung vom *LMO2*-Transkriptionsstart betrug etwa 1.7 kb und sie kartierte in eine Region, in der eine CCAAT-Box lokalisiert wurde.

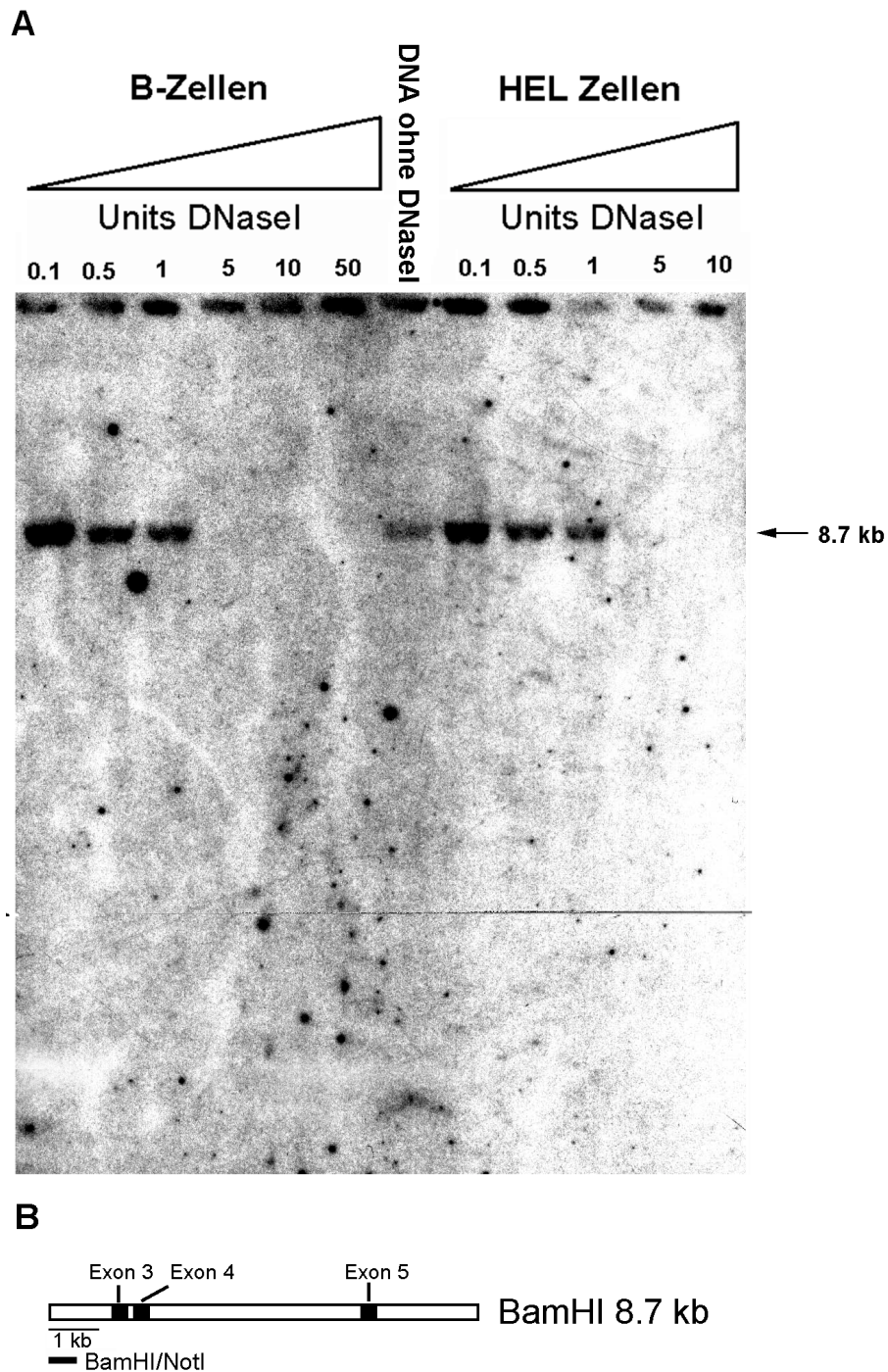


Abb. 12: DHS-Kartierung in HEL- und B-Zellen für Promotor P2. (A) Southern Blot von B-Zellen (links) und HEL-Zellen (rechts) mit steigenden Mengen DNaseI behandelt. Als Positivkontrolle wurde in der Mitte genomische DNA ohne DNaseI-Behandlung aufgetragen. (B) Genomisches Fragment BamHI 8.7 kb. Die Hybridisierungsprobe BamHI/NotI und Exon 3-5 von *LMO2* sind dargestellt.

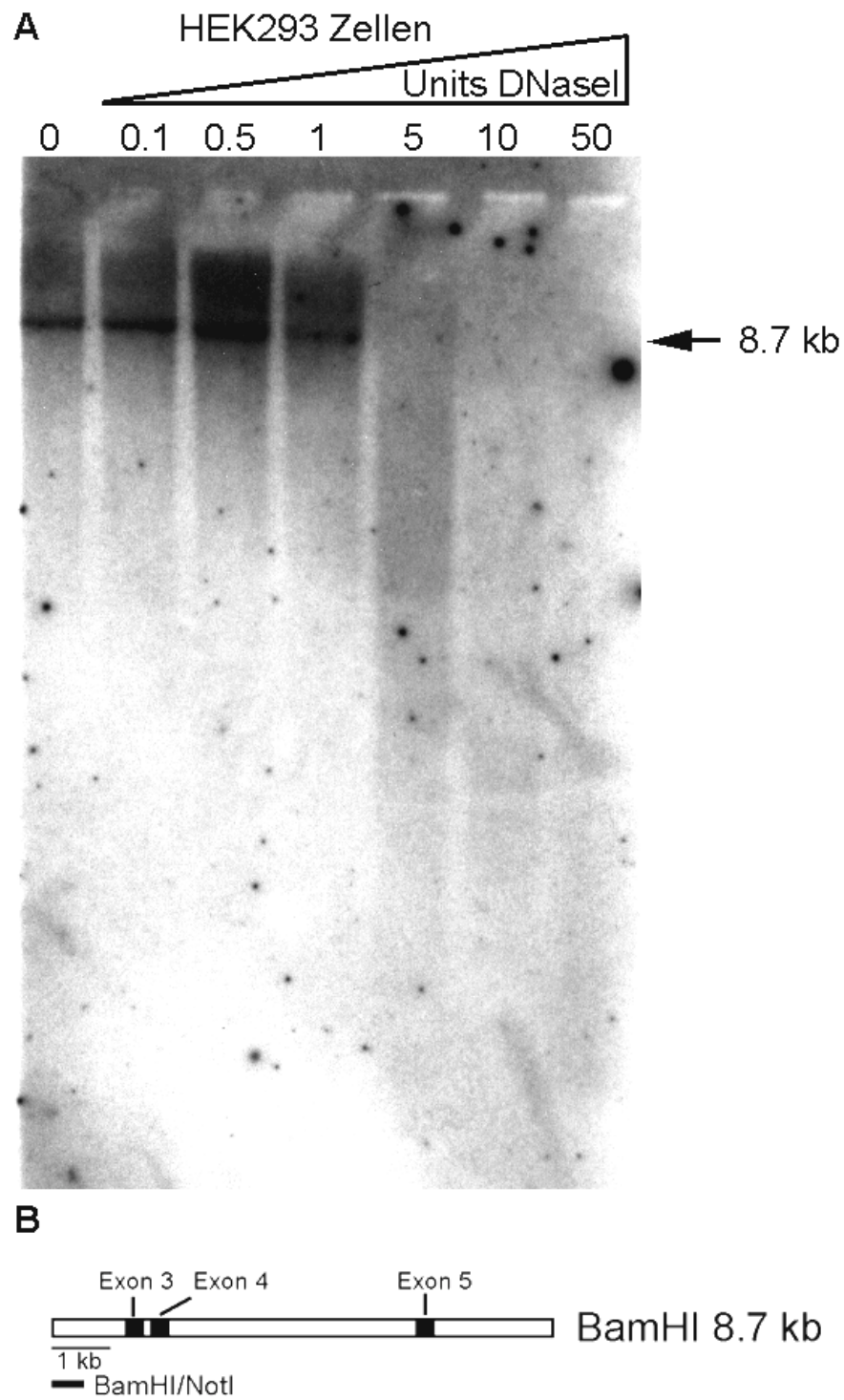


Abb. 13: DHS-Kartierung in HEK293-Zellen für Promotor P2. (A) Southern Blot HEK293-Zellen mit steigenden Mengen DNaseI behandelt. Als Positivkontrolle wurde links genomische DNA ohne DNaseI-Behandlung aufgetragen. (B) Genomisches Fragment BamHI 8.7 kb. Die Hybridisierungsprobe BamHI/NotI und Exon 3-5 von *LMO2* sind dargestellt.

Im Bereich des BamHI-8.7 kb-Fragmentes, in dem Exon 3-5 von *LMO2* lokalisiert ist, ließen sich keine DHS in erythroiden (HEL-Zellen), lymphoiden (B-Zellen) (Abb. 12) oder embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) (Abb. 13) detektieren. Falls ein putativer Promotor P2 dort lokalisiert ist, könnte er in diesen Zellen abgeschaltet sein. Ist er jedoch aktiv, so müssen nicht unbedingt in dem untersuchten Fragment DHS lokalisiert sein. DHS sind möglicherweise in den untersuchten Zelllinien gar nicht mit dem P2 assoziiert, oder sie sind viel weiter entfernt, als untersucht wurde.

4.4. EMSA und Supershift-Assay

Der Promotor P1 von *LMO2* enthält unmittelbar an dem Transkriptionsstart zwei GATA1-Stellen und eine SP1-Stelle (Royer-Pokora, B. et al., 1995), deren Bindungsaffinität zu GATA1 und SP1 in EMSAs in dieser Arbeit nachgewiesen wurde.

Frühere Studien (Royer-Pokora, B. und Drechsler, M., unveröffentlichte Daten) zeigten, daß Oligonukleotide, die die GATA1- und SP1-Bindestellen aus dem Promotor P1 enthalten, GATA1 und SP1 binden.

In dieser Arbeit wurde ein 133 bp großes DNA-Fragment, amplifiziert über PCR innerhalb eines Eco0109I-Restriktionsfragmentes (Abb. 14A), verwendet, um die Bindung von GATA1 und SP1 nachzuweisen. Zusätzlich wurden Kernextrakte aus HEL-Zellen, in denen GATA1 exprimiert ist, für die EMSAs eingesetzt.

In Abb. 14B ist ein EMSA mit einem 133 bp Promotor P1-Fragment und verschiedenen Proteinextrakten dargestellt. Ein spezifischer Shift für GATA1 war in Bahn 4 zu sehen, in der pGATA1 transfizierte COS-7 Extrakte verwendet wurden. Im Vergleich dazu Bahn 3, wo nur COS-7 Extrakte verwendet wurden. Dort konnte ein schwacher Shift eines unspezifischen und/oder unbekanntes Faktors beobachtet werden, der elektrophoretisch etwas weiter aufgetrennt wurde als der GATA1-Shift in Bahn 4. Mit HEL- und COS-7-Zellextrakt ließ sich dieser Shift auch detektieren (Bahn 2, 3 und 4). HEL-Extrakte sind in Bahn 2 verwendet worden, hier war ein Shift zu beobachten, der auf gleicher Höhe wie GATA1 in Bahn 4 lief. SP1-spezifische Shifts wie in Bahn 5 sind mit HEL-Extrakten (Bahn 2) oder COS-7-Extrakten (Bahn 3 und 4) nicht beobachtet worden. Vorarbeiten (Royer-Pokora, B. und Drechsler, M., unveröffentlichte Daten) zeigten, daß in manchen COS-7-Extrakten ein SP1-spezifischer Shift zu sehen war. Die Heterogenität der COS-Zellen ist möglicherweise eine Erklärung für diese Beobachtung.

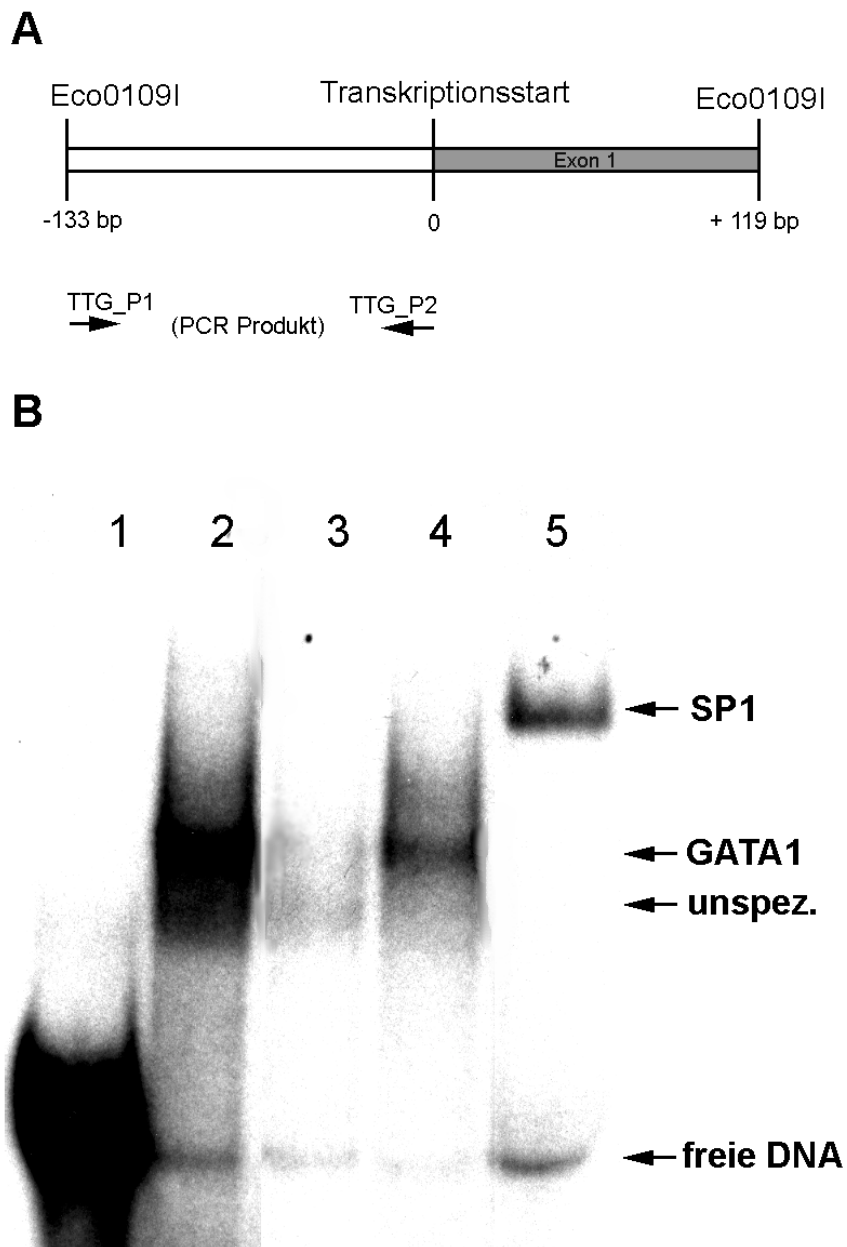


Abb. 14: EMSA mit 133 bp Promotor P1-Fragment. (A) Amplifizierung der DNA (-133 bp bis zum Transkriptionsstart) innerhalb eines Eco0109I-Fragmentes über PCR. (B) EMSA: Bahn 1 = DNA ohne Proteinextrakt, Bahn 2 = DNA + 10 µg HEL-Extrakt, Bahn 3 = DNA + 10 µg COS-7-Extrakt, Bahn 4 = DNA + 10 µg Extrakt aus COS-7-Zellen transfiziert mit GATA1-Expressionsvektor, Bahn 5 = 15 ng gereinigtes SP1-Protein. Unspez. = Shift eines unspezifischen und/oder unbekanntes Faktors.

Ein spezifische Shift mit pGATA2-transfizierten COS-7-Zellen für GATA2 war nicht zu beobachten (nicht gezeigte Daten).

Um nachzuweisen, daß die Proteine der geshifteten Banden tatsächlich den GATA1- und SP1-Proteinen entsprechen, wurden Supershift-Experimente mit Antikörper gegen die entsprechenden Proteine durchgeführt.

Ein Supershift mit SP1-Antikörper und gereinigtem SP1-Protein (Abb. 15) ist mit dem 133 bp Promotor P1-Fragment identifiziert worden (Bahn 3), während SP1 allein (Bahn 2) weiter im Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

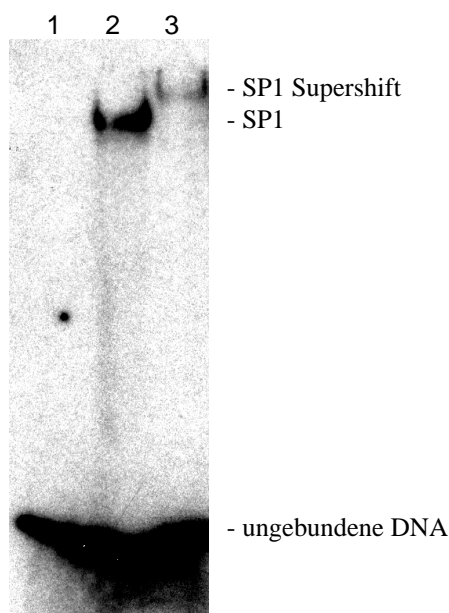


Abb. 15: Supershift mit 133 bp Promotor P1-Fragment. Bahn 1 = DNA ohne Proteine, Bahn 2 = DNA + 15 ng gereinigtes SP1-Protein, Bahn 3 = DNA + 16 ng gereinigtes SP1-Protein + 10 µl SP1-Antikörper-Lösung.

Um weitere Faktoren zu identifizieren, die möglicherweise in einem typisch hämatopoetischen Komplex (Orkin, S.H., 1995b; Wadman, I.A. et al., 1997; Sieweke, M.H. and Graf, T., 1998) an den Promotor P1 binden, wurde mittels Antikörper für LMO2, NLI, GATA1 und SP1 die Beteiligung der zugehörigen Proteine in einem Supershift-Assay analysiert (Daten nicht gezeigt). Supershifts mit GATA1-, NLI- oder LMO2-Antikörper konnten nicht beobachtet werden, weder in HEL-Zellen noch mit pGATA1-transfizierten COS-7-Zellextrakten.

Mit dem von der Firma Santa Cruz gelieferten GATA1-Antikörper konnte im Westernblot in HEL-Zellen keine spezifische Bande nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte an einer zu geringen Spezifität (die GATA1-Antikörper wurden gemäß Herstellerinformationen mit einem GATA1-Peptid hergestellt) oder geringen Menge an GATA1-Protein in diesen Zellen liegen. Deshalb war es nicht unerwartet, daß diese Antikörper möglicherweise keinen Supershift zeigten.

Die Qualität der Antikörper schwankte innerhalb verschiedener Aliquots. Die NLI- und LMO2-Antikörper waren zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht biochemisch charakterisiert.

In der genomischen Sequenz (EMBL Acc. No.: AJ250281) stromaufwärts von *LMO2* sind sechs GATA1-Consensussequenzen AGATAA identifiziert worden (Abb. 10), zusätzlich zu den bereits bekannten zwei unmittelbar am Transkriptionsstart (Royer-Pokora, B. et al., 1995). Um die Bindung dieser neuen GATA-Sequenzen zum GATA1-Protein *in vitro* nachzuweisen, wurden EMSAs mit vier Oligonukleotiden, die vier der sechs identifizierten GATA-Bindesequenzen enthielten, durchgeführt. Die Sequenzen und ihre Positionen relativ zum Transkriptionsstart wurden in Abb. 16A dargestellt.

Oligonukleotide für die GATA1-Consensussequenzen in den Positionen -2759 bp und -1394 bp relativ zum Transkriptionsstart (Abb. 10) wurden nicht verwendet, da eine Bande im Southern Blot zur DHS-Kartierung, die der GATA1-Stelle in Position -2759 entsprechen hätte, nicht identifiziert wurde (Abb. 11). Diese erwartete Bande, mit etwa 200 bp, ist wahrscheinlich zu klein und ist möglicherweise aus dem Gel gelaufen. Eine Bande im Southern Blot zur DHS-Kartierung, die der GATA1-Stelle in Position -1394 entsprechen könnte, wurde ebenfalls nicht identifiziert.

Oligonukleotide für die vier anderen GATA1-Bindestellen, die im Bereich der kartierten DHS oder in der Nähe lokalisiert sind, binden GATA1 (Abb. 16B), sowohl in pGATA1-transfizierten COS-7-Zellextrakten, als auch in HEL-Zellen, in denen GATA1 exprimiert wird. Festzustellen war, daß die Oligonukleotide (1) und (2) in Abb. 16A fast exakt in dem Bereich lokalisiert sind, in dem zwei (DHS 4 und DHS 5) der erythroid spezifischen DHS kartiert wurden.

Das Oligonukleotid (3) ist etwa 100 - 150 bp von der erythroid spezifischen DHS (DHS 3) entfernt. Oligonukleotid (4) ist im Bereich der nicht-linien-spezifischen DHS (DHS 2) lokalisiert, in dem eine potentielle CCAAT-Box identifiziert wurde (Abb. 10).

Da die Größenbestimmung im Southern Blot relativ ungenau ist, könnten diese GATA-Bindestellen tatsächlich den erythroid-spezifischen DHS entsprechen.

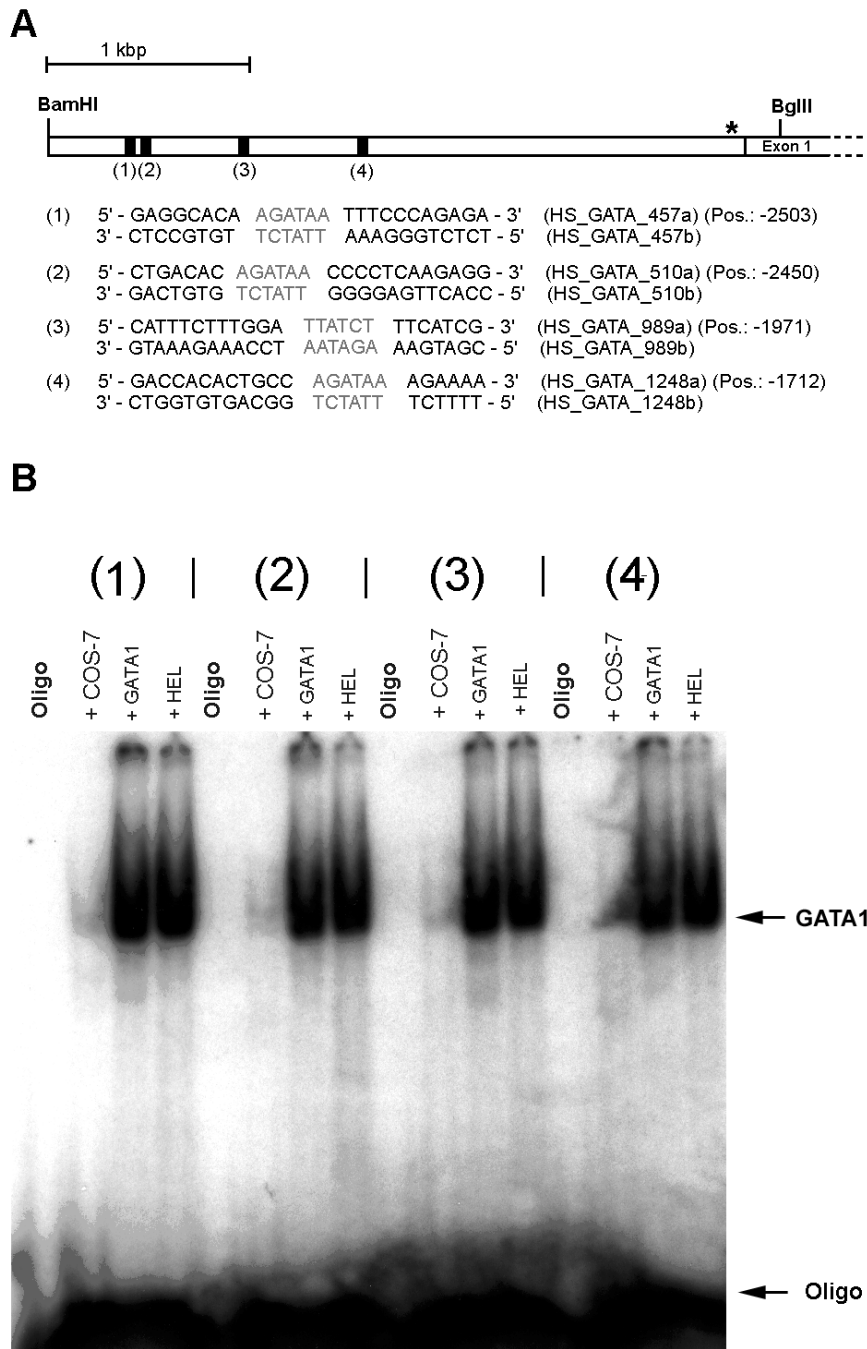


Abb. 16: EMSA mit Oligonukleotiden aus dem Bereich der kartierten DHS. (A) Genomische Region stromabwärts von *LMO2* zwischen BamHI-Schnittstelle und Transkriptionsstart (markiert durch Stern). Die verwendeten Oligonukleotide (1-4) für die EMSAs und ihre Lage in der Region wurden dargestellt. Die Position relativ zum Transkriptionsstart ist in Klammern angegeben. Die GATA1-Bindestellen wurden grau hervorgehoben. (B) EMSAs mit den vier doppelsträngigen Oligonukleotiden (1-4). Inkubiert jeweils allein, mit 10 µg Kernextrakten aus COS-7-Zellen, aus pGATA1-transfizierten COS-7-Zellen oder aus HEL-Zellen.

4.5. In vivo Funktionsanalysen

4.5.1. *Sense-/Decoy-Assay* mit PTOs

Ein möglicher Einfluß des erythroid-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-1 auf die Genexpression von *LMO2* ist mit einem sogenannten *Sense-* oder *Decoy-*Experiment untersucht worden. Hierbei wurden doppelsträngige Oligonukleotide verwendet, die einen Teil des Promotors P1 von *LMO2* repräsentierten und potentielle Bindestellen für das GATA-1 Protein enthielten.

Bringt man solche Oligonukleotide (Lockvögel) in die Zellen und den Zellkern ein, so können Transkriptionsfaktoren daran binden und werden abgefangen, so daß sie für die Regulation ihrer Zielgene nicht mehr zur Verfügung stehen (Bielinska, A. et al., 1990).

Für ein solches Experiment wurden Phosphothioat-(PTO)-Analoge der Oligonukleotide verwendet. In der α -, β - oder γ -Phosphatgruppe jedes Nukleotids läßt sich selektiv ein Sauerstoffatom gegen ein Schwefelatom austauschen (Eckstein, F., 1979). Die so erhaltenen modifizierten Nukleotide lassen sich zur Synthese von PTOs verwenden. Sie sind gegenüber Nukleasen weniger anfällig.

Bei Untersuchungen zum Metabolismus der PTOs wurden Halbwertszeiten von mehreren Stunden bis Tagen gemessen, während nicht-modifizierte Oligonukleotide in den Zellen Halbwertszeiten von wenigen Minuten oder Sekunden aufwiesen (Chu, B.C.F. and Orgel, L.E., 1992; Bijsterbosch, M.K. et al., 1997; Gilar, M. et al., 1997).

Eine Science-Publikation (Bielinska, A. et al., 1990) beschrieb das Szenario innerhalb einer Zelle und machte eine Schätzung. Etwa 10^7 bis 10^8 Moleküle der zugeführten PTOs erreichten das Zellplasma, wenn 5×10^5 Zellen mit einer $10 \mu\text{M}$ PTO-Lösung inkubiert wurde. Mehr als 75% aller Zellen enthielten dann diese Menge PTOs. Wenn nur 10% den Zellkern erreichten und man davon ausging, daß etwa 10^3 - 10^4 Proteine einer Transkriptionsfaktor-Spezies anwesend waren, wären die PTOs immer noch im 1000-fachen Überschuß vorhanden.

Verschiedenste *Sense-/Decoy*-Ansätze wurden bereits erfolgreich durchgeführt, beispielsweise für die Faktoren NFκB (Tanaka, H. et al., 1994; Sharma, H.W. et al., 1996; Morishita, R. et al., 1997), bFGF (Guvakova, M.A. et al., 1995) oder E2F (Morishita, R. et al., 1995; Maeshima, Y. et al., 1998).

GATA-1 soll mit Hilfe der PTOs in LMO2-exprimierenden erythroiden Zellen abgefangen werden. Reguliert GATA-1 die *LMO2* Genexpression, so könnte sich eine Änderung, möglicherweise Verminderung der *LMO2* Expression im Northern Blot nachweisen lassen.

Ein mögliches *Antisense*-Experiment als Alternative zu dem beschriebenen *Sense-/Decoy*-Ansatz kommt für das *GATA1*-Gen aus folgendem Grund nicht in Frage: Bei dieser Art der Expressionsstudie werden einzelsträngige PTOs verwendet, die in ihrer Sequenz komplementär zu einer Ziel mRNA sind, diese binden können und ihre Übersetzung in ein Protein verhindern (Wagner, R.W., 1994). Den größten Erfolg zeigen *Antisense*-Konstrukte, die den Translationsstart direkt überlappen (Dr. Georg Sczakiel und Dr. Edgar Grienstein, pers. Mitteilung). Das *GATA1*-Gen hat mindestens zwei alternative Translationsstartstellen (Calligaris, R. et al., 1995), deshalb müßten mehrere *Antisense*-Konstrukte entworfen werden, was die Durchführung des Experimentes sehr aufwendig und teuer machen würde.

In Vorversuchen wurden die verwendeten doppelsträngigen PTOs (PTO-LMO2_P1wt und PTO-LMO2_P1mut) vor dem Einsatz in den HEL-Zellen *in vitro* auf ihre Bindungsfähigkeit hin mittels EMSAs und Konkurrenzexperimenten überprüft (Abb. 17). Dafür sind Kernprotein-Extrakte aus erythroiden Zellen (K562- und HEL-Zellen) verwendet worden.

Das Wachstumsverhalten von HEL-Zellen, die mit PTOs behandelt wurden, wurde zusätzlich studiert.

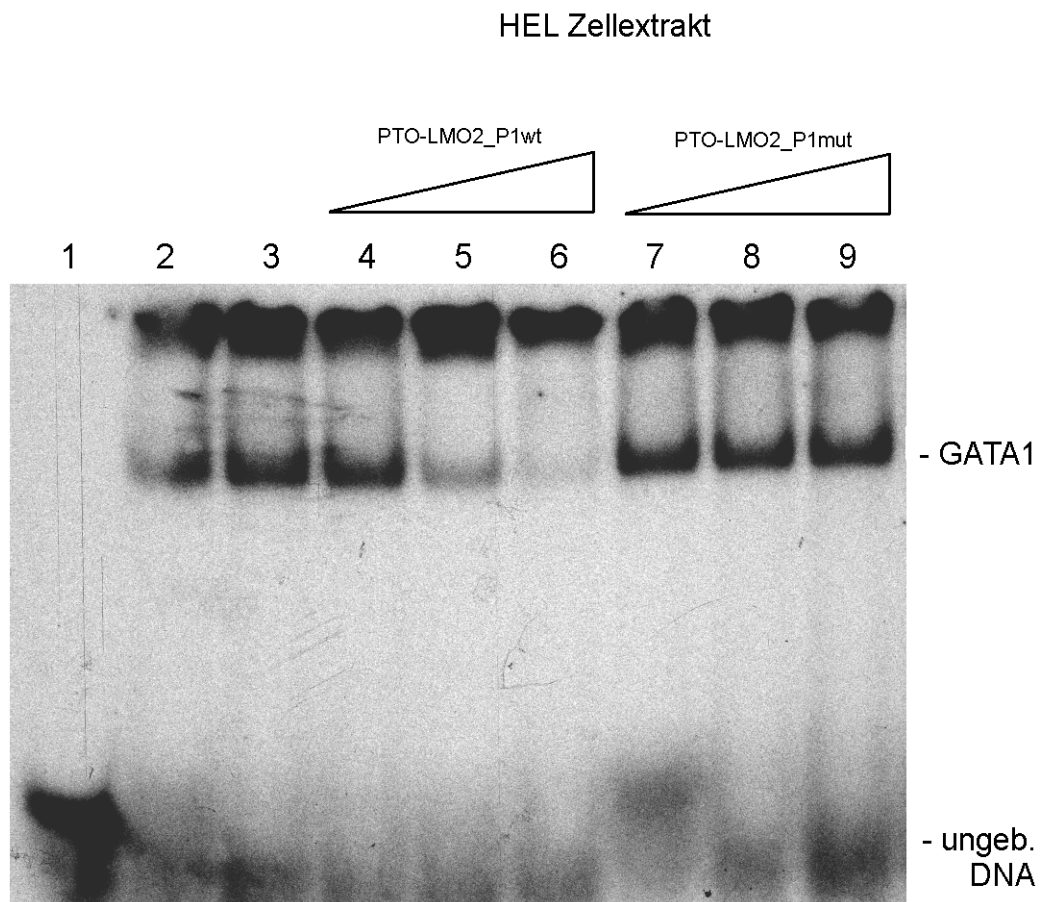


Abb. 17: Bindungsstudien und Konkurrenzexperiment mit PTOs und Kernprotein - Extrakten aus erythroiden (K562- und HEL-) Zellen. Als DNA wurde das 133 bp P1-Fragment (Position -133 bis zum Transkriptionsstart) verwendet. Bahn 1 = DNA ohne Proteine, Bahn 2 = DNA + 10 µg Kernprotein-Extrakt aus K562-Zellen, Bahn 3 - 9 = DNA + 10 µg Kernprotein-Extrakt aus HEL-Zellen, Bahn 4 - 6 = zusätzlich steigende Mengen nicht-markiertes Oligonukleotid PTO-LMO2_P1wt (10 ng, 50 ng, 100 ng), Bahn 7 - 9 = zusätzlich steigende Mengen nicht-markiertes Oligonukleotid PTO-LMO2_P1mut (10 ng, 50 ng, 100 ng).

Ein spezifischer Shift in Bahn 2 und Bahn 3 war zu erkennen. Es handelte sich hierbei wahrscheinlich um einen GATA1-spezifischen Shift, wie er auch in Abb. 14 zu sehen war. Mit steigenden Mengen (10, 50 und 100 ng) nicht-markiertem PTO-LMO2_P1wt-Oligonukleotid (Bahn 4 - 6) ließ sich der spezifische Shift aus Bahn 2 und 3 verdrängen. Mit steigenden Mengen (10, 50, 100 ng) PTO-LMO2-P1mut Oligonukleotid (Bahn 7 - 9) ließ sich der Shift nicht verdrängen. Bei diesen

Oligonukleotiden sind die GATA1-Bindestellen mutiert und GATA1 konnte nicht binden. Eine Kompetition fand nicht statt. Die PTO-modifizierten Oligonukleotide besaßen die Fähigkeit, das GATA1-Protein *in vitro* zu binden. Eine Studie zum Wachstumsverhalten von HEL-Zellen nach Zugabe von PTOs wurde in Abb. 18 dargestellt.

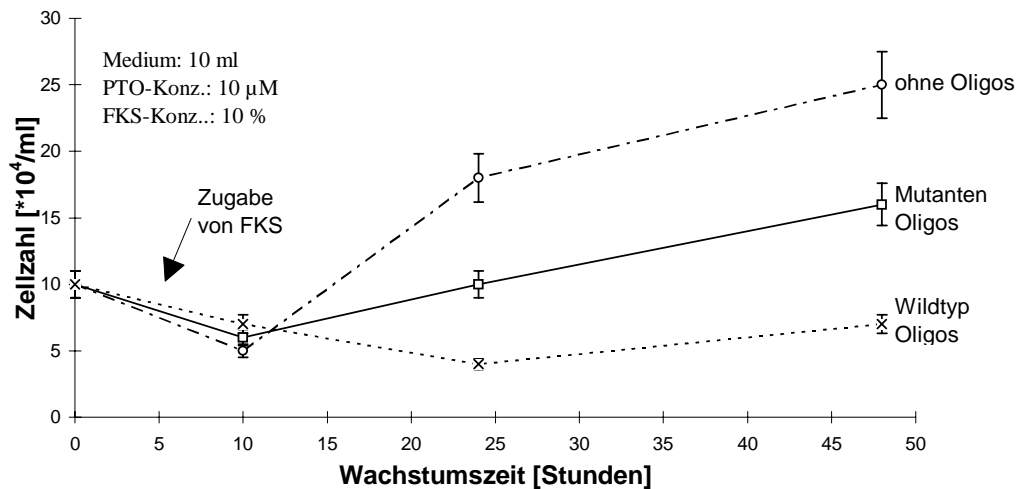


Abb. 18: Wachstumskurven von HEL-Zellen nach PTO-Behandlung. Das Ansatzvolumen betrug 10 ml RPMi-Medium, die PTO-Konzentration: 10 μM Endkonzentration und nach 5 Std. wurde fötales Kälberserum, 10 % (v/v), zugesetzt. Die Daten wurden gemittelt aus mehreren Ansätzen. Wildtyp-Oligos = PTO-LMO2_P1wt, Mutanten-Oligos = PTO-LMO2_P1mut

Nach Zugabe der verschiedenen PTOs zeigten HEL-Zellen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. HEL-Zellen, die nicht mit PTOs behandelt wurden, verdoppelten bis verdreifachten sich nach zwei Tagen. Bei den HEL-Zellen, die mit Mutanten-PTOs behandelt wurden, stieg die Zellkonzentration von $10^4/\text{ml}$ auf $1,5 \times 10^4/\text{ml}$ an. HEL-Zellen, die mit dem PTO-LMO2_P1wt-Oligonukleotid behandelt wurden, starben teilweise ab oder vermehrten sich kaum in dem Untersuchungszeitraum. Nach PTO-Behandlung der HEL-Zellen war ein schlechteres Wachstumsverhalten zu beobachten. Der Effekt mit PTO-LMO2_P1wt-Oligonukleotid war dabei größer als mit PTO-LMO2_P1mut-Oligonukleotid.

Um verschiedene Transfektionsreagenzien für eine optimale Transfektion zu testen, und um die Transfektionseffizienz zu ermitteln, wurden Transfektionen mit Fluoreszenz-markierten PTOs (freundlicherweise von Dr. Hans-Dieter Royer zur Verfügung gestellt) durchgeführt. Im Fluoreszenzmikroskop sind die transfizierten Zellen ausgezählt worden (Abb. 19 und Tabelle 2).

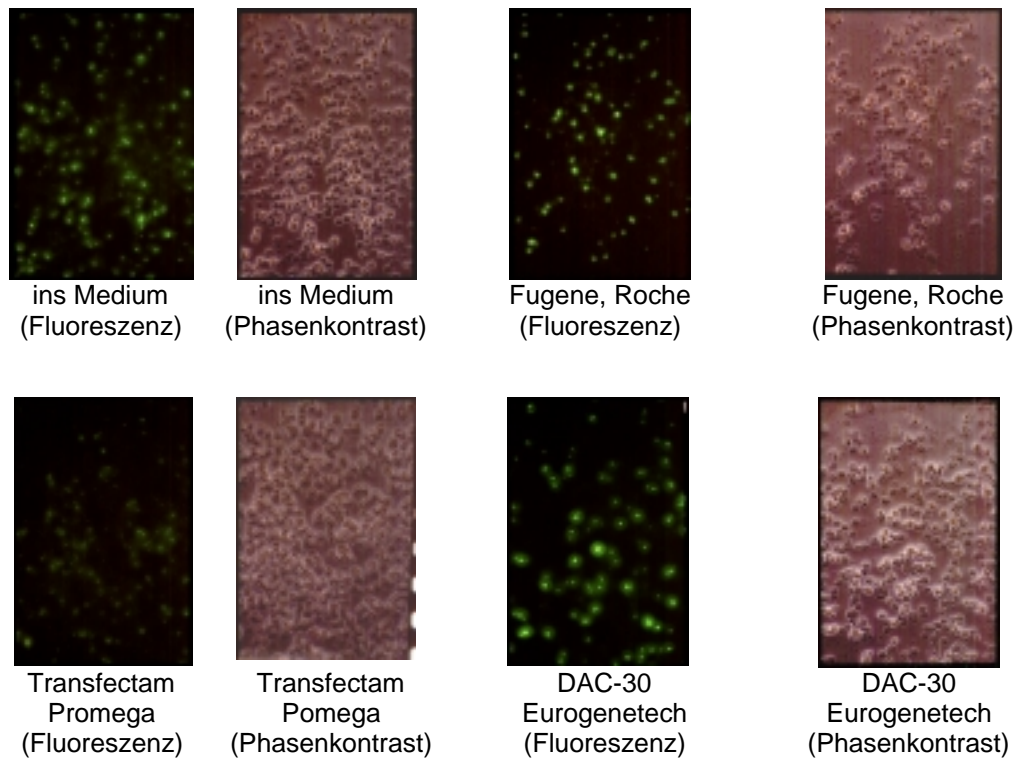


Abb. 19: Transfektionsreagenzien zum Transfizieren von HEL-Zellen im Vergleich. Nicht-transfiziert HEL-Zellen zeigten keine oder kaum Eigenfluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

Methode	Zellzahl im Phasenkontrast	Zellzahl im Fluoreszenzlicht	Effizienz
ins Medium	330 - 370	140 - 160	43 ± 3 %
Fugene (Roche)	150 - 170	95 - 105	63 ± 3 %
Transfectam (Promega)	240 - 260	35 - 45	16 ± 2 %
DAC-30 (Eurogenetech)	250 - 280	90 - 100	36 ± 2 %

Tabelle 3: Auswertung des Transfektionstests mit HEL-Zellen. Im Phasenkontrast und im Fluoreszenzlicht wurden mindestens zwei verschiedene Objektträger ausgezählt. Die Effizienz wurde aus dem Quotienten der Zellzahl im Phasenkontrast und der Zellzahl im Fluoreszenzlicht ermittelt.

Die Transfektion mit Fugene (Roche) war mit einer Effizienz von etwa $63 \pm 3 \%$ am günstigsten. Während die Effizienz mit anderen Transfektionsreagenzien etwa genauso groß (DAC-30, Eurogenetech) oder sogar geringer (Transfectam, Promega) war als die Zugabe der PTOs direkt ins Medium.

Nach Abschluß aller Vorversuche wurden die HEL-Zellen mittels Fugene (Roche) mit den PTOs (PTO-LMO2_P1wt, PTO-LMO2_P1mut und PTO-LMO2_P13mut) transfiziert und die mögliche Änderung der *LMO2*-Expression auf einem Northern Blot analysiert (Abb. 20).

Innerhalb der untersuchten Inkubationszeit und der angegebenen Konzentration (10 μ M Endkonzentration) waren keine oder nur geringfügige Änderungen der *LMO2*-Expression zu beobachten (Abb. 20). Vergleicht man die Aktin-Konzentrationen, so kann beim wt-Oligo nach 10 Stunden, 20 Stunden und 30 Stunden eine geringe Reduzierung gegenüber dem Experiment ohne Oligos festgestellt werden. Dagegen ist kein Effekt mit mut- oder mut3-Oligo innerhalb des Untersuchungszeitraumes festzustellen.

Verschiedene Konzentrationen bis 20 μ M Endkonzentration und maximal 48 Stunden Inkubationszeit wurden ausgetestet. Als Hybridisierungsprobe ist eine cDNA-Probe mit Exon 4 - 6 aus *LMO2* verwendet worden. Eine Unterscheidung zwischen *LMO2a* und *LMO2b* (Royer-Pokora, B. et al., 1995) war durch die Northern Blot-Analyse allein nicht möglich. Wenn eines der beiden Transkripte nach PTO-Behandlung nicht mehr exprimiert wird, kann dies mit dieser Methode allein nicht differenziert werden. In Zukunft müßten für diese Fragestellung Transkript-spezifische Primer in einer RT-PCR eingesetzt werden, um die Transkripte zu unterscheiden.

Da die bisherigen Experimente darauf hinwiesen, daß es einen zweiten Promotor gibt, ist eine komplette Abschaltung des Gens möglicherweise nicht zu erwarten. Das bedeutet, daß mit Hilfe des *Sense-/Decoy*-Ansatzes möglicherweise die erythroide Regulation durch GATA1 nicht nachgewiesen werden kann.

Andere Ansätze, wie beispielsweise Reporter-gen-Assays, bieten nicht nur die Möglichkeit, die Aktivität von Promotoren zu untersuchen, sondern auch gezielt die Beteiligung von speziellen Faktoren zu analysieren.

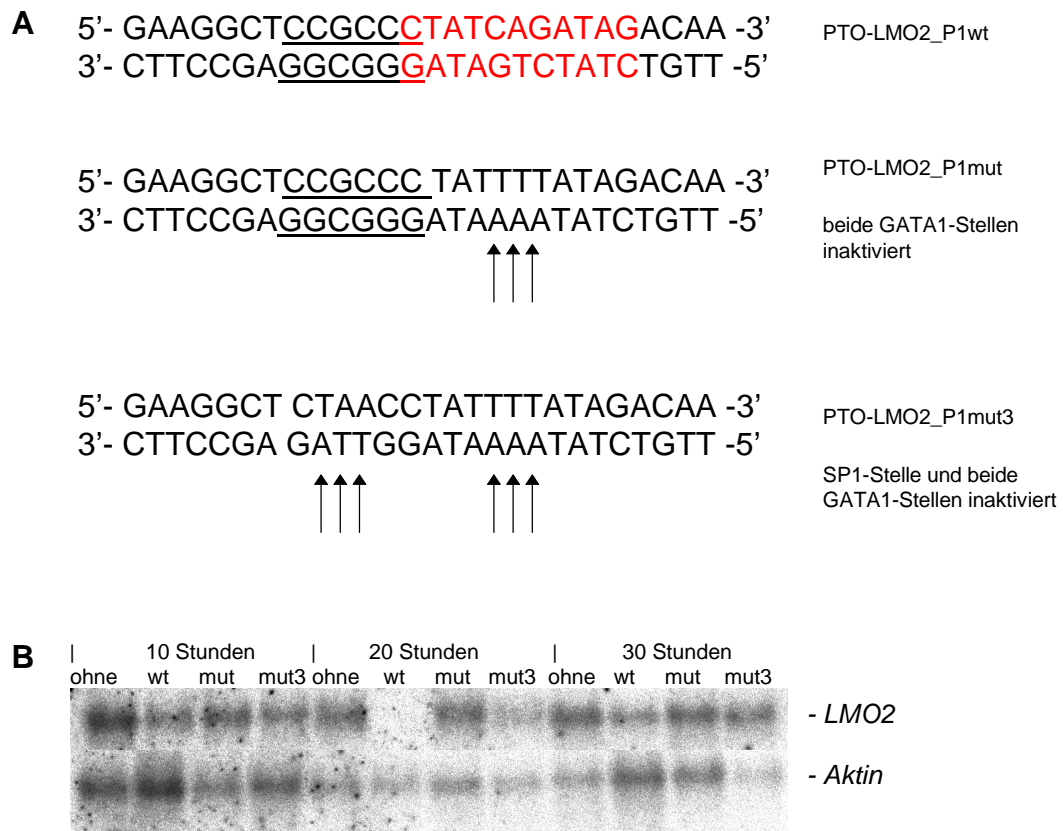


Abb. 20: Northern Blot von HEL-Zellen nach PTO-Behandlung. (A) Sequenz der eingesetzten PTOs, beide GATA1-Bindestellen in rot, SP1-Bindestelle unterstrichen, Mutationen durch Pfeile markiert. (B) Zeitintervall bis zur RNA-Präparation betrug 10, 20 und 30 Stunden. Die eingesetzte PTO-Endkonzentration betrug 10 μ M. Abkürzungen: wt = PTO-LMO2_P1wt, mut = PTO-LMO2_P1mut, mut3 = PTO-LMO2P1mut3.

4.5.2. Reportergen/Luciferase-Assay

Um den Promotor P1 von *LMO2* funktionell *in vivo* zu analysieren, wurde ein Reportergen/Luciferase-Assay durchgeführt. Dafür sind 162 bp stromaufwärtsliegende Sequenz und 79 bp des ersten Exons von *LMO2* in ein Konstrukt mit Luciferase-Gen und SV40-Enhancer (pGL2e) kloniert worden (Royer-Pokora, B. et al., 1995). Neben dem so erhaltenen pGL2SK *wildtype*-Konstrukt wurde eine Mutante hergestellt (pGL2SK *mutant*), bei der beide GATA1-Bindestellen genauso, wie die bei den EMSA-Mutanten-Oligonukleotiden beschrieben, inaktiviert wurden (Drechsler, M., unveröffentlichte Daten; Pruess, M.M. et al., in Vorbereitung). In Abb. 21A wurden neben den erwähnten Wildtyp- und Mutanten-Konstrukten auch die Negativkontrolle (pGL2e) ohne Promotor und die Positivkontrolle (pGL2e (SV40p)) mit SV40-Promotor dargestellt. In Abb. 22 ist eine Autoradiographie des Sequenzgels zur Überprüfung der Mutation des pGL2SK *mutant*-Konstrukts abgebildet. Die Mutation inaktivierte beide GATA1-Stellen. Es erfolgte eine Substitution von CAG nach TTT.

Das pGL2SK *wildtype*-Konstrukt zeigte Promotor-Aktivität in erythroiden Hühnerzellen (Royer-Pokora, B. et al., 1995) und erythroiden K562-Zellen (Drechsler, M., unveröffentlichte Daten; Pruess, M.M. et al., in Vorbereitung). Um zu analysieren, welche Faktoren an der erythroid-spezifischen Regulation von *LMO2* über P1 involviert sind, wurden Co-Transfektionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und den P1-Konstrukten in nicht-erythroiden NIH3T3-Zellen durchgeführt. Expressionsvektoren für GATA1 (pGATA1) und SP1 (pSP1) sind verwendet worden, da Erkennungssequenzen für beide Proteine in der P1-Region vorhanden waren (Royer-Pokora, B. et al., 1995; + Abb. 10) und beide Proteine Bindungsaffinität zur P1-DNA *in vitro* besaßen (Drechsler, M., unveröffentlichte Daten; + Abb. 14 und 15). FOG1 ist ein Co-Faktor von GATA1 (Tsang, A.P. et al., 1997; Fox, A.H. et al., 1999) und seine mögliche Beteiligung an der Regulation von *LMO2* wurde im Reportergen-Assay ebenfalls analysiert.

Promotor Vektor	Co-transf. Vektor	Luci Aktivität	β -Gal [mU]	Luci Aktivität / β -Gal [mU]	\emptyset Luci Aktivität / β -Gal [mU]	Standardabweichung σ
pGL2e	---	1237	1,75	707	908	201
		4660	4,20	1109		
pGL2e (SV40p)	---	97708	4,05	24125	27386	3261
		101131	3,30	30646		
pGL2SK wildtype	---	4088	3,05	1340	1378	58
		4728	3,25	1455		
pGL2SK mutant	---	2731	2,55	1071	1046	25
		2808	2,75	1021		
pGL2SK wildtype	1 μ g pGATA1	1615	1,7	950	951	1
		1948	2,05	951		
pGL2SK wildtype	5 μ g pGATA1	7785	2,6	2994	2953	41
		8007	2,75	2912		
pGL2SK wildtype	10 μ g pGATA1	7814	1,7	4592	4433	160
		6410	1,5	4273		
pGL2SK wildtype	1 μ g pSP1	4252	2,5	1701	1674	28
		4527	2,75	1646		
pGL2SK wildtype	5 μ g pSP1	4670	2,1	2224	1803	421
		4215	3,05	1382		
pGL2SK wildtype	10 μ g pSP1	3960	2,1	1886	1921	35
		4887	2,5	1955		
pGL2SK mutant	1 μ g pGATA1	2621	2,4	1092	1062	31
		2113	2,05	1031		
pGL2SK mutant	5 μ g pGATA1	1021	0,9	1134	1230	96
		1258	0,95	1325		
pGL2SK mutant	10 μ g pGATA1	700	0,7	1000	1083	83
		1046	0,9	1166		
pGL2SK mutant	1 μ g pSP1	5998	3,3	1817	1744	74
		5965	3,6	1670		
pGL2SK mutant	5 μ g pSP1	2005	1,2	1670	1949	279
		10694	4,8	2227		
pGL2SK mutant	10 μ g pSP1	4302	2,4	1626	2012	386
		3774	1,7	2397		
pGL2SK wildtype	5 μ g pGATA1	1424	0,5	2847	2627	220
	5 μ g pSP1	1444	0,6	2407		
pGL2SK wildtype	5 μ g pGATA1	4210	2,2	1913	1981	68
	5 μ g pFOG1	5534	2,7	2050		

Tabelle 4: Reportergen/Luciferase Assay. Luci = Luciferase, β -Gal = β -Galaktosidase, Standardabweichung wurde errechnet nach folgender Formel: $\sigma = (\sqrt{(n \times \sum x^2) - (\sum x)^2}) / n^2$, x = Zahlenwert, n = Anzahl der Werte. Die Luciferasewerte sind gemittelt aus 5-10 Werten, die β -Galaktosidase Werte wurden doppelt bestimmt und gemittelt.

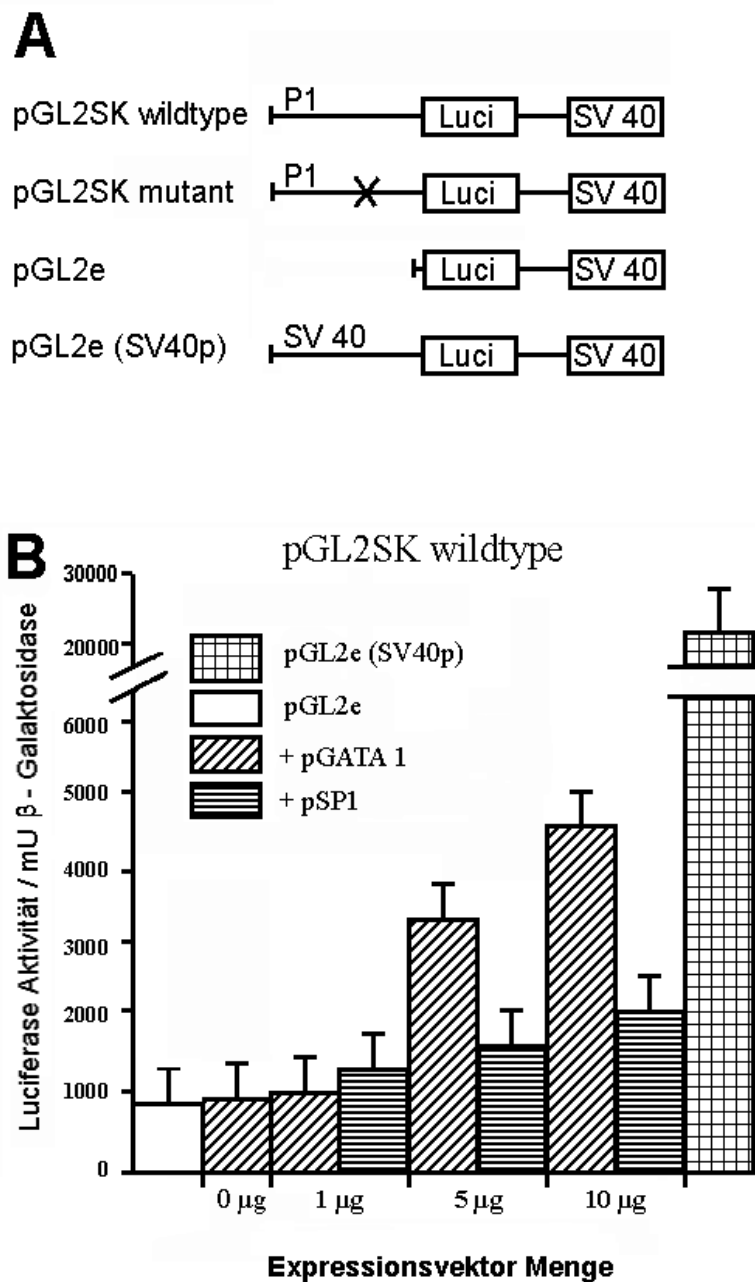


Abb. 21A+B: Reportergen / Luciferase Assay mit P1 von *LMO2* in NIH3T3 Zellen.

(A) Verschiedene Promotor-Konstrukte sind schematisch dargestellt. Alle Konstrukte enthalten das Luciferase-Gen (Luci) und einen SV40-Enhancer (SV40). pGL2SK *wildtype* enthält den P1 von *LMO2*, im pGL2SK *mutant*-Konstrukt sind die beiden GATA-Stellen mutiert worden (gekennzeichnet durch ein Kreuz), pGL2e ist die Negativkontrolle ohne Promotor und pGL2e (SV40p) enthält als Positivkontrolle einen SV40-Promotor. Von den vier Promotor-Konstrukten wurde 10 μg DNA transfiziert. In (B) wurde das pGL2SK *wildtype*-Konstrukt mit steigenden Mengen (1 μg, 5 μg und 10 μg) GATA1- und SP1-Expressionsvektor co-transfiziert

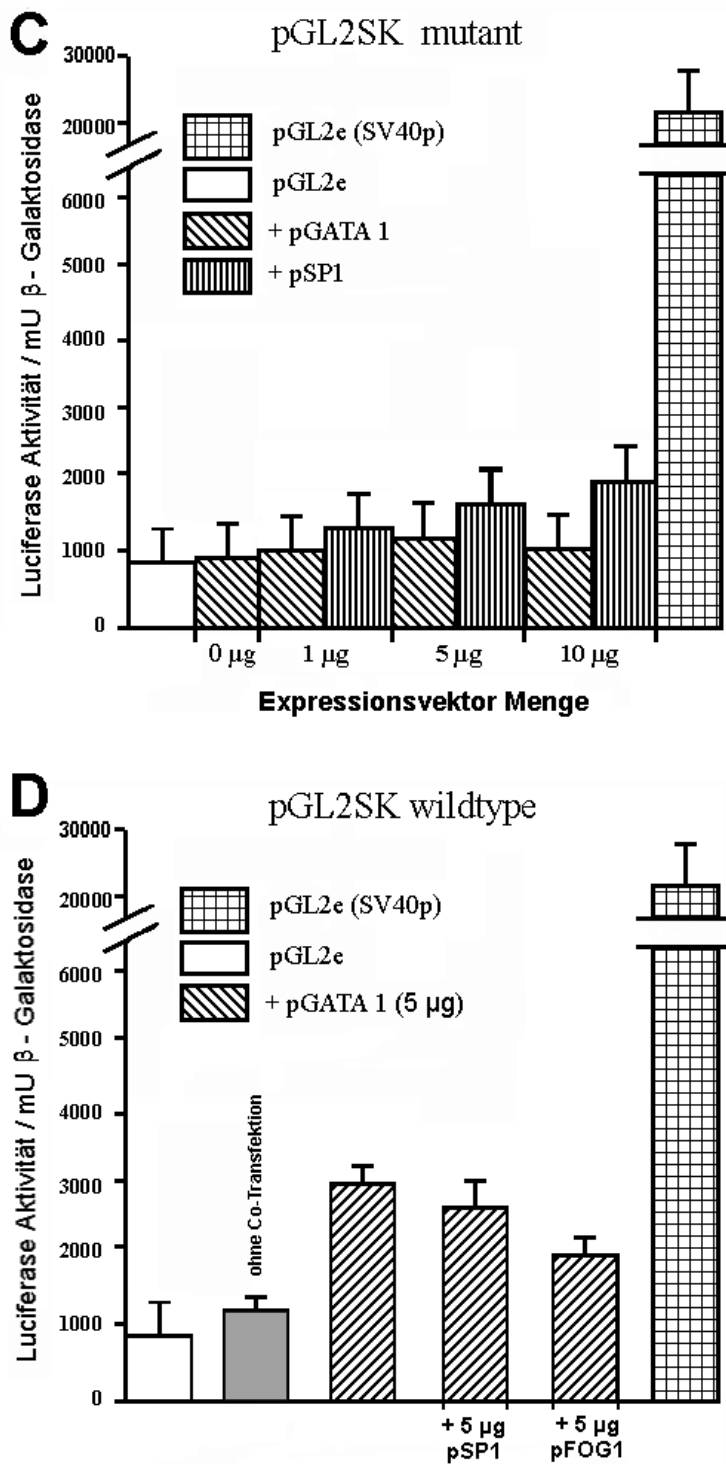


Abb. 21C+D: Reporteragen / Luciferase Assay mit P1 von *LMO2* in NIH3T3 Zellen.

In (C) wurde das pGL2SK *mutant*-Konstrukt mit steigenden Mengen (1 μ g, 5 μ g und 10 μ g) GATA1- und SP1- Expressionsvektor co-transfiziert. In (D) wurde das pGL2SK *wildtype*-Konstrukt mit 5 μ g pGATA1 allein und in Kombination mit 5 μ g pSP1 oder 5 μ g pFOG1 co-transfiziert.

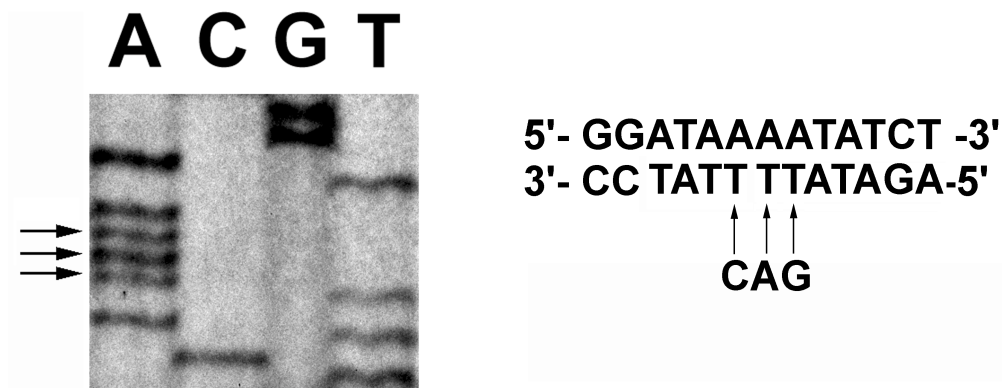


Abb. 22: Sequenzierung von pGL2SK *mutant* (Drechsler, M., unveröffentlichte Daten). Mutation von CAG nach TTT (AAA auf dem Sequenzgel) konnte gezeigt werden.

In Tabelle 4 sind die Meßwerte aus den Reporter-Gen/Luciferase-Assays aufgeführt worden. Die Luciferasewerte wurden aus 5 - 10 Einzelwerten und die β -Galaktosidase-Werte doppelt bestimmt. Die Durchführung der Experimente erfolgte mindestens zweimal mit unterschiedlichen DNA-Präparationen (CsCl-gereinigte DNA, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Matthias Drechsler, und DNA, gereinigt mit dem Qiagen-Endofree Maxi-Prep-Kit). Die Luciferase-Aktivität pro β -Galaktosidase-Aktivität [mU] wurde angegeben, um die Transfektionseffizienz beurteilen zu können. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte nach angegebener Formel (Tabelle 4).

In Abb. 21 B - D wurden die Ergebnisse aus den Reporter-Gen-Assays mit den in Abb. 21 A dargestellten Konstrukten in den nicht-erythroiden NIH3T3-Zellen gezeigt. Sowohl das Wildtyp-Konstrukt (Abb. 22B) als auch das Mutanten-Konstrukt (Abb. 21C) zeigten in NIH3T3-Zellen keine signifikante zusätzliche Promotoraktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (pGL2e).

Steigende Mengen co-transfizierter GATA1-Expressionsvektor-DNA (1 µg, 5 µg und 10 µg) führten beim Wildtyp-Konstrukt zum Anstieg der Promotor-Aktivität (Abb. 21 B) um etwa das Vier- bis Fünffache (Tabelle 4). Das Mutanten-Konstrukt zeigte auch bei hohen Mengen (10 µg) co-transfizierte GATA1-Expressionsvektor-DNA keinen signifikanten Anstieg in der Promotor-Aktivität (Abb. 21 C). GATA1 ist somit in der Lage das *LMO2* Promotor P1-Konstrukt in nicht-erythroiden Zellen zu aktivieren.

Co-Transfektionen mit SP1-Expressionsvektor-DNA (1 µg, 5 µg und 10 µg) führten zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität um das Eineinhalb- bis Zweifache, sowohl mit dem P1-Wildtyp-Konstrukt (Abb. 21 B) als auch mit dem P1-Mutanten-Konstrukt (Abb. 21 C). Die Standardabweichungen für die Co-Transfektionen mit pSP1 sind teilweise größer als 10 % (Tabelle 4), während sie für die pGATA1 Co-Transfektionen darunter lagen.

Eine Co-Transfektion von dem Wildtyp-Konstrukt mit 5 µg pGATA1 und 5 µg pSP1 (Abb. 21 D) führte zu keiner signifikanten Veränderung in der Luciferase-Aktivität im Vergleich mit 5 µg pGATA1 allein. Ein synergistischer Effekt zwischen SP1 und GATA1 (Merika, M. and Orkin, S.H., 1995; Gregory, R.C. et al., 1996), in der Aktivierung von P1 von *LMO2*, konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Co-Transfektion von dem Wildtyp-Konstrukt mit 5 µg pGATA1 und 5 µg pFOG1 dagegen wurde eine Abnahme der Luciferase-Aktivität beobachtet. Sie betrug etwa Zweidrittel des Luciferase-Wertes von 5 µg pGATA1 allein. Die Standardabweichung der gemessenen Luciferase-Aktivität pro β-Galaktosidase-Aktivität für dieses Transfektionsexperiment lag bei etwa 3 - 4 % (Tabelle 4).

4.5. Transkriptanalysen

Mit Hilfe des Marathon-Ready™ cDNA Kits (Clontech) wurde versucht, ein alternatives 5'-Ende zu dem bereits bekannten Exon 1 von *LMO2* zu identifizieren. Zwei verschieden lange Transkripte sind von *LMO2* beschrieben worden (Royer-Pokora, B. et al., 1995; Neale, G.A.M. et al., 1995a). Ein langes Transkript, das alle sechs Exons enthält, und ein kurzes, das partiell Exon 3 und Exon 4-6 aufweist (Royer-Pokora, B. et al., 1991). In den T-ALL Proben war ein kurzes Transkript, ebenso wie in normalem adulten Nierengewebe, zu finden (Royer-Pokora, B. et al., 1991). Ein Marathon-Ready™ cDNA Kit mit cDNAs aus normalem adulten Nierengewebe wurde daher zur Identifizierung eines alternativen Transkripts ausgewählt.

Mit dem *LMO2*-spezifischen Primer MMP2 in Kombination mit dem Anker-Primer AP2 ließen sich in einer PCR (siehe Kit-Anleitung) spezifische Banden amplifizieren, die ausgeschnitten, gereinigt (Qiagen Extraction Kit II), kloniert und sequenziert wurden. Eine Darstellung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt in Abb. 23.

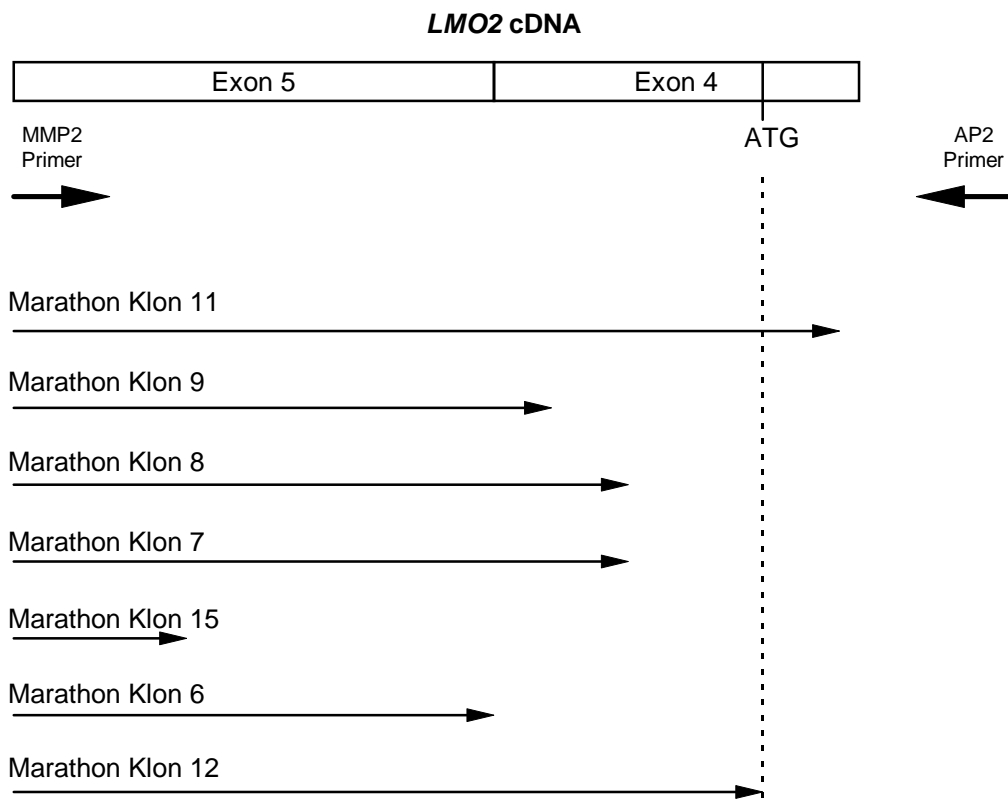


Abb. 23: *LMO2* cDNA-Klone aus normalem adulten Nierengewebe, mittels Marathon RACE. Die cDNA von *LMO2* ist partiell (Exon 4 und 5) dargestellt. AP2 = Anker-Primer, MMP2 = *LMO2*-spezifischer Primer, ATG = Translationsstartcodon,

Alle cDNA-Klone, die untersucht wurden, stammten von einer *LMO2*-mRNA, bei der die 5'-Enden verkürzt oder abgetrennt waren (Abb. 23). Somit lieferten sie kein neues 5'-Ende, sondern zeigten bereits bekannte Sequenzen. Die im Marathon-Ready™-cDNA-Kit mitgelieferte cDNA war deshalb unbrauchbar für diese Untersuchung.

Möglicherweise waren die GC-reichen Sequenzen im Bereich von Exon 4 und 3 dafür verantwortlich, diese könnten die reverse Transkription stören. Deshalb wurde mit einer RNA aus HEL-Zellen eine reverse Transkription in Anwesenheit von Trehalose (Carninci, P. et al., 1998) bei 60°C bzw. 55°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollten, durch GC-reiche-Sequenzen verursachte Sekundärstrukturen, unterbunden werden. Adaptoren wurden mittels des SMART™ PCR *cDNA Amplification* Kits angehängt, und mit den mitgelieferten

Primern sind PCR-Reaktionen durchgeführt worden.

Für diese Versuche wurde als mRNA-Ausgangsmaterial 10 µg Gesamt-RNA aus HEL-Zellen und 10 µg Gesamt-RNA aus fötaler Leber verwendet.

Mit Hilfe von zwei *LMO2*-spezifischen Primern (MR12 für Exon 4 und MR10 für Exon 6) und cDNA aus fötaler Leber ließ sich in einer Test-PCR-Reaktion eine *LMO2*-spezifische Bande amplifizieren, welche die errechnete Größe von etwa 300 bp aufwies. Sequenzierung dieser Bande ergab, daß *LMO2* in der verwendeten cDNA anwesend war (nicht gezeigte Daten). Dabei handelte es sich nur um eine qualitative Aussage, da zwischen *LMO2a* und *LMO2b* mittels PCR über Exon 4 bis Exon 6 nicht differenziert werden konnte. In HEL-Zellen wurde *LMO2* mittels Northern Blot identifiziert (Abb. 7).

Primer-Kombinationen aus Exon 1 (MR5) und Exon 6 (MR10) führten zu multiplen Banden in der PCR, die nach Klonierung und Sequenzierung zu den alternativen Transkripten *LMO2c* (Exon 1, 5 und 6) und *LMO2d* (Exon 1, 2, 5 und 6) führten (Abb. 24). Beide Transkripte zeigten das bereits bekannte 5'-Ende von *LMO2* und sind wahrscheinlich Spleißing-Varianten. Ihnen fehlt Exon 4, in dem sich der Translationsstart von *LMO2* befindet.

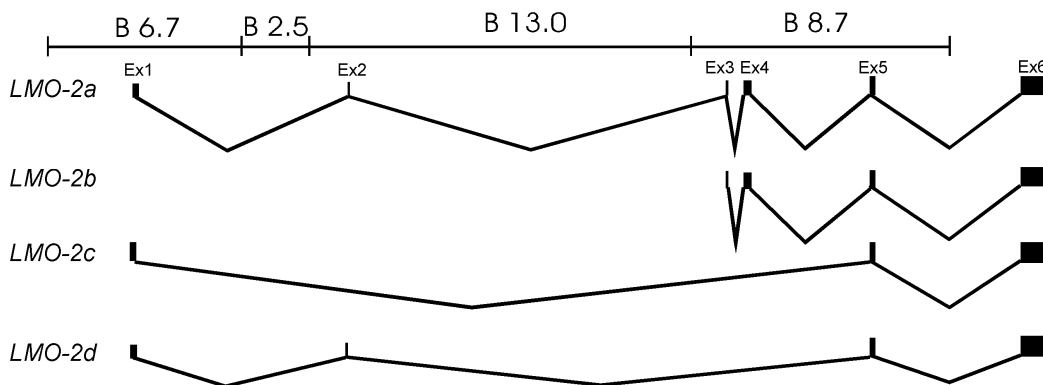


Abb. 24: Alternative *LMO2* Transkripte in fötaler Leber. B = BamHI, Ex = Exon. Die genomische Region von *LMO2* ist dargestellt. Die BamHI-Restriktionsfragmente sind in kb angegeben.

Mit verschiedenen *LMO2*-spezifischen Primern (MMP2_long, MR10, MMP1_long), in Kombination mit den RACE-Anker-Primern, ließen sich keine alternativen Transkripte oder 5'-Enden in HEL-Zellen oder fötaler Leber amplifizieren und identifizieren.

Die im Methoden-Teil genau erläuterten Variationen der PCR-Bedingungen führten zu keinem Amplifikat, das in einem Gel oder auf einem Southern Blot detektiert werden konnte.

Diese Experimente zeigten, daß die PCR-Amplifikation des extrem G/C-reichen 5'-Bereichs des *LMO2*-Gens schwierig und unter den angegebenen Bedingungen unmöglich ist. Deshalb müßten neue PCR-Ansätze etabliert werden, unter denen das lange G/C-reiche 5'-Ende fehlerfrei amplifiziert wird, bevor dieselben Experimente mit RNA aus normalem adulten Nierengewebe, welche hauptsächlich das kürzere Transkript exprimieren, durchgeführt werden.

Der SMART™ PCR *cDNA Amplification* Kit funktioniert mit β -Aktin- (EMBL Acc. N.: AF053356) und *Cathepsin D*- (EMBL Acc. No.: M11233) spezifischen Primern in Kombination mit den Anker-Primern (nicht gezeigte Daten). Festzustellen ist, daß das *LMO2*-Transkript in den cDNA-Pools vorhanden war, jedoch konnten unter den durchgeführten Bedingungen keine normalen *LMO2*-Transkripte mit korrektem 5'-Ende identifiziert werden.