

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsche Zusammenfassung

Das *LMO2*-Gen ist an der Entwicklung nahezu aller hämatopoetischen Linien, insbesondere der erythroiden Linie, involviert. *LMO2* ist ein Brückenmolekül, innerhalb multipler Transkriptionsfaktor-Komplexe in erythroiden und unreifen T-Zellen, das mittels seiner zwei LIM-Domänen mit anderen Proteinen interagieren kann. Im Menschen wurden zwei verschiedene Transkripte (*LMO2a* und *LMO2b*) identifiziert, die sich in der Länge der 5'-nicht-translatierten Region unterscheiden, aber für das gleiche Protein kodieren. Bei Leukämien mit der spezifischen Translokation t(11; 14)(p13; q11), die *LMO2* unterbricht, findet man eine Expression in T-Zellen, in denen es, ebenso wie im Thymus normalerweise nicht exprimiert ist. Das kürzere Transkript *LMO2b* läßt sich hier und in normalem adulten Nierengewebe detektieren. Mindestens zwei verschiedene Promotoren (P1 und P2) werden für die Regulation des Gens postuliert, wobei P1 vor Exon 1 bereits identifiziert wurde und P2 vor Exon 3 vermutet wird.

In dieser Dissertation wurde die erythroid-spezifische Transkriptionsregulation von *LMO2* über P1 mittels EMSA's (*Electrophoretic mobility shift assays*), Reporter-gen-Assays und Kartierung von DNaseI hypersensitiver Stellen (DHS) analysiert. Diese weisen auf transkriptionelle Aktivität im Chromatin hin. Zusätzlich wurden alternative Transkripte identifiziert und eine DHS-Kartierung vor Exon 3 in erythroiden, lymphoiden und embryonalen Nierenzellen durchgeführt.

Sequenziert wurden 2960 bp DNA stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Computerunterstützte Sequenzanalyse lieferte, zusätzlich zu den bereits bekannten Bindestellen für GATA1 und SP1 am Transkriptionsstart, sechs weitere mögliche Bindestellen für GATA1, eine CCAAT-Box und eine E-Box.

Eine nicht-linienspezifische (DHS2) und vier erythroid-spezifische DHS (DHS1, 3, 4, 5) sind identifiziert worden. Eine erythroid-spezifische Stelle (DHS1) wurde unmittelbar am Transkriptionsstart lokalisiert, wo sich GATA1- und SP1-Bindestellen befinden.

In vitro hat GATA1 große DNA-Fragmente (133 bp) des Promotors P1 und Oligonukleotide, die GATA1-Bindestellen enthalten, die im Bereich der kartierten erythroiden DHS1 lokalisiert sind, gebunden. Es wurde auch eine Affinität zu den Oligonukleotiden gezeigt, die der GATA1-Sequenz aus den Sequenzierungsdaten entsprachen und in dem Bereich der DHS3, DHS4 und DHS5 lokalisiert sind.

In Reportergergen-Assays zeigten Promotor P1-Konstrukte in erythroiden Zellen Aktivität. Welche Faktoren an der erythroid-spezifischen Regulation von *LMO2* beteiligt sind, wurde mittels Reportergergen-Assays in nicht-erythroiden NIH3T3-Zellen untersucht. Expressionsvektoren für GATA1, SP1 und FOG1 (Friend of GATA) wurden mit den Promotor P1-Konstrukten co-transfiziert. Verwendet wurde ein Wildtyp-Konstrukt, das zwei intakte GATA1- und eine SP1-Bindestelle enthält und ein Mutanten-Konstrukt, in dem beide GATA1-Bindestellen inaktiviert wurden. Beide Konstrukte allein zeigten keine Aktivität in NIH3T3-Zellen. Co-Transfektion von GATA1-Expressionsvektor führte zur 4-5-fachen Aktivierung des Wildtyp-P1-Konstruktes, während das Mutanten-P1-Konstrukt nicht aktiviert wurde. SP1 zeigte eine geringe Aktivierung, sowohl des Wildtyp- wie auch des Mutanten-P1-Konstruktes, aber schwächer als GATA1. GATA1 ist für die erythroid-spezifische Regulation von *LMO2* verantwortlich. Synergistische Effekte zwischen GATA1 und SP1 in der Regulation von *LMO2* waren nicht zu beobachten, während die Ergebnisse der Reportergergen-Assays auf eine Kooperation zwischen GATA1 und FOG1 hinweisen.

Durch *Sense-/Decoy*-Experimente mit Phosphothioat-Oligonukleotiden in HEL-Zellen wurde die Expressionskontrolle von *LMO2 in vivo* untersucht. GATA1 wurde *in vivo* abgefangen und eine Expressionsänderung von *LMO2* im Northern Blot untersucht. Eine sehr geringe Änderung der *LMO2*-Expression war mit dem Wildtyp-Oligo nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, daß GATA1 nicht der einzige Faktor ist, der die Regulation von *LMO2* steuert, oder das die Expression vom zweiten Promotor aus aktiv bleibt.

Alternative Transkripte (*LMO2c* und *LMO2d*) wurden in fötaler Leber beobachtet, sie codieren wahrscheinlich für kein Protein und ihre biologische Aktivität ist fraglich.

Mehrere GATA1-Bindestellen in der Kontrollregion von *LMO2* könnten auf ein erythroid-spezifisches Enhancer-Elemente hinweisen. Die T-ALL-Translokationen trennen die Kontrollregion von *LMO2* ab, und ein kurzes Transkript wird von einem putativen Promotor P2 exprimiert. DNaseI hypersensitive Stellen konnten im Bereich des bisher bekannten 5'-Endes des kürzeren Transkriptes im BamHI-8.7 kb-Fragment in erythroiden, lymphoiden und embryonalen Nierenzellen nicht kartiert werden.

6.2. Englische Zusammenfassung (Summary)

The *LMO2* gene is involved in the development of nearly all hematopoietic lineages, especially the erythropoietic lineage. *LMO2* is a bridging molecule in complexes of erythroid specific or immature T-cell specific transcription factors. The LIM-motifs are responsible for the protein interactions.

LMO2 is detectable in nearly all fetal tissues with the exception of mature T-cells and thymus. Two different transcripts (*LMO2a* and *LMO2b*) were identified in humans, differing in the length of the 5'-untranslated region, but encoding the same protein. In leukemias a specific translocation t(11; 14)(p13; q11) disrupts *LMO2* and leads to an expression in T-cells, where it is normally not expressed. The shorter transcript *LMO2b* was identified in adult kidney and T-cell leukemia samples with the specific translocation. Two different promoters (P1 and P2) were postulated for the gene, P1 is located upstream of exon 1 and P2 may be located upstream of exon 3.

The erythroid specific regulation of the *LMO2* transcription via P1 was analysed in this thesis with EMSA's (Electrophoretic mobility shift assays), reporter gene assays and DNaseI hypersensitive sites (DHS) mapping. Transcriptional active chromatin is indicated by DHS. Additionally alternative transcripts were identified and DHS mapping upstream of exon 3 were performed in erythroid, lymphoid and embryonal kidney cells.

2960 bp upstream of the transcription start were sequenced and transcription factor binding sites were predicted by computer programs. Additionally to the known GATA1 and SP1 sites very close to the transcription start, six further GATA1 binding sites, a CCAAT-box and an E-box were identified.

One non-specific site (DHS2) and four erythroid specific sites (DHS1, 3, 4 and 5) were found. One erythroid specific site is located very close to the transcription start, where GATA1- and SP1-binding sites are present. In EMSA experiments GATA1 bound to a 133 bp P1 fragment containing two GATA sites and oligonucleotides representing the promoter P1 fragment, where one erythroid specific DHS was mapped.

Furthermore GATA1 bound to oligonucleotides, representing GATA1 binding sites, which were covered by DHS3, 4 and 5.

In reporter gene assays the promoter P1 constructs showed activity in erythroid cells. The factors involved in the erythroid specific regulation of *LMO2* were analysed by reporter gene assays in non-erythroid NIH3T3 cells.

Expression vectors for GATA1, SP1 and FOG1 (Friend of GATA1) were co-transfected with the promoter P1 constructs. A wildtype construct with two GATA1 and one SP1 site and a mutant construct, where both GATA1 binding sites were inactivated was used. Both constructs alone showed no activity in NIH3T3 cells. The wildtype construct was activated 4-5 fold by co-transfection with GATA1 expression vector, but not the mutant construct. SP1 showed a weak activation of 1.5 - 2 fold of the wildtype construct.

GATA1 was identified as the erythroid specific regulator of *LMO2*. Synergistic effects between GATA1 and SP1 in the regulation of *LMO2* was not observed. In contrast, a co-operation between GATA1 and FOG1 may be possible from the results of the reporter gene assays.

Decoy experiments with phosphorothioate oligonucleotides (PTO) in HEL cells were used to study the control of the *LMO2* expression. *LMO2* expression was analysed after PTO addition by northern blots. A small reduction of the *LMO2* expression was detected with wildtype PTOs.

New alternative transcripts (*LMO2c* and *LMO2d*) were found in fetal liver, but they do not encode a protein and their biological activity is unknown.

It is postulated that erythroid specific enhancers and/or T-cell specific silencers exist, which regulate the expression of *LMO2*. The controlling region is disrupted by the translocation and a shorter transcript (*LMO2b*, starts with Exon 3) is probably expressed by an so far unknown promoter P2. DHS upstream of Exon 3 in the BamHI-8.7 kb fragment could not be identified in erythroid, lymphoid and fetal kidney cells.