

Kontrolle der Expression des Apoptoseregulatorgens *bcl-x*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
am Fachbereich
Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Christoph Charlé
aus Berlin

Berlin 1999

Tag der Disputation: 15. August 2000

1. Referent: Prof. Dr. B. Wittig

2. Referent: Prof. Dr. V. A. Erdmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Programmierter Zelltod und Apoptose	1
1.1.1. Tumorsuppressoren	3
1.1.2. Todesrezeptoren und Caspaseaktivierung	6
1.1.3. Regulatoren der Apoptose: Die Bcl-2 Familie	9
1.2. Bcl-x	13
1.2.1. Struktur und Lokalisation des <i>bcl-x</i> Gens	13
1.2.2. Der <i>bcl-x</i> Promoter und der Transkriptionsstart der <i>bcl-x</i> mRNA	14
1.2.3. Spleißvarianten der <i>bcl-x</i> mRNA	15
1.3. Kontrolle der Genexpression und Apoptose	17
1.3.1. Regulation der Translation durch lange, strukturierte 5'-NTRs	18
1.3.2. Regulation der Translation durch strangaufwärts gelegene offene Leserahmen (uORFs)	19
1.3.3. Regulation der Translation durch interne Ribosomeneintrittsstellen (IRES)	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Ergebnisse	24
2.1. Struktur des <i>bcl-x</i> Gens	24
2.1.1. Computergestützte Analyse der Sequenz des 5'-NCR des <i>bcl-x</i> Gens	24
2.1.2. Restriktionskartierung des <i>bcl-x</i> Gens	26
2.1.3. Sequenz des 5'-NCR und von Exon 1, 2 und 3 des humanen <i>bcl-x</i> Gens	28
2.2. Struktur der <i>bcl-x</i> mRNA	30
2.2.1. Isolierung eines mehrfach gespleißten cDNA-Fragments aus dem 5'-NCR des <i>bcl-x</i> Gens	30
2.2.2. Aufklärung der vollständigen Sequenz der <i>bcl-x_L</i> mRNA und Isolierung von zwei bicistronischen <i>bcl-x</i> mRNAs	32
2.2.3. Kartierung des Transkriptionsstarts des <i>bcl-x</i> Gens durch RT-PCR	34
2.2.4. Kartierung des Transkriptionsstarts des <i>bcl-x</i> Gens durch RNase-Protektionsassay	37
2.3. Expression des <i>bcl-x</i> Gens	40
2.3.1. Transkription des <i>bcl-x</i> Gens in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- γ und Cycloheximid	41
2.3.2. Translation der <i>bcl-x</i> mRNA in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- γ und Cycloheximid	44
2.3.3. Abhängigkeit des Transkriptionsstarts und der Spleißmuster der <i>bcl-x</i> mRNA von Zelldichte, INF- γ und Cycloheximid	48
2.3.4. Identifizierung der aktiv transkribierten <i>bcl-x</i> mRNA in Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 Zellen	51
2.3.5. Nachweis einer <i>bcl-x</i> antisense RNA in Kulturzellen	53
2.3.6. Nachweis von bicistronischen <i>bcl-x</i> mRNAs in Kulturzellen	54
2.4. Funktion des 5'-NTR der <i>bcl-x(MT)</i> mRNA	55
2.4.1. Abhängigkeit der Translation der <i>bcl-x</i> mRNA von einer 5'-CAP Struktur	56
2.4.2. Einfluß einer 5'-Haarnadelstruktur auf die Translation der <i>bcl-x</i> mRNA	58
2.4.3. Steuerung der Synthese des Bcl-x Proteins durch eine IRES	60
2.4.4. Der 5'-NTR der <i>bcl-x(MT)</i> mRNA ermöglicht einen einheitlichen Translationsstart	63
2.5. Inhibition der Bcl-x Translation durch Expression von sense- und antisense RNA in K562 Zellen	65
3. Diskussion	67
4. Zusammenfassung	78
5. Summary	80
6. Material	82
6.1. Bezugsquellen der verwendeten Materialien	82
6.2. Bezugsquellen der verwendeten Enzyme und Kits	83
6.3. Bezugsquellen der verwendeten Plasmidvektoren, Oligonukleotide und cDNA-Banken	84
6.4. Bezugsquellen der verwendeten Antikörper	84
6.5. Bezugsquellen der verwendeten Geräte	84
6.6. Verwendete Software	85
6.7. Verwendete Puffer und Lösungen	85
6.7.1. Elektrophoresepuffer	85
6.7.2. Blotpuffer	86

6.7.3.	Hybridisierungspuffer.....	86
6.7.4.	Allgemeine Lösungen.....	86
6.7.5.	SDS-PAGE-Lösungen.....	86
7.	Methoden	87
7.1.	Zellkultur	87
7.1.1.	Zelllinien.....	87
7.1.2.	Stimulierung von Kulturzellen.....	87
7.1.3.	FACS-Analysen.....	87
7.1.4.	Zählen von Zellen.....	88
7.1.5.	Ernten von Zellen.....	88
7.2.	Transfektion von Zellen	88
7.2.1.	Elektroporation von Kulturzellen.....	88
7.2.2.	Elektroporation von elektrokompenten E.coli Zellen.....	88
7.3.	Isolierung von Nukleinsäuren	89
7.3.1.	Isolierung von Plasmid DNA aus E.coli.....	89
7.3.2.	Isolierung von Phagen-DNA aus E.coli.....	89
7.3.3.	Isolierung von genomischer DNA aus Kulturzellen.....	89
7.3.4.	Isolierung von gesamt-RNA aus Kulturzellen.....	90
7.3.6.	Isolierung von polyA ⁺ -mRNA.....	90
7.3.5.	Isolierung von Kern-RNA und cytosolischer RNA.....	90
7.4.	Isolierung von Protein	91
7.4.1.	Isolierung von Gesamtprotein aus Kulturzellen.....	91
7.4.2.	Proteinbestimmung.....	91
7.5.	Reporterassays	91
7.5.1.	Luziferase Assay.....	91
7.5.2.	GFP-Messung.....	91
7.6.	Enzymatische Reaktionen	92
7.6.1.	Restriktionsverdau.....	92
7.6.2.	Verdau einzelsträngiger RNA (RNase Protection Assay).....	92
7.6.3.	Sequenzierung.....	92
7.6.4.	Synthese von cDNA.....	93
7.6.5.	Ligation.....	93
7.6.6.	Konstruktion von Haarnadelstrukturen.....	94
7.6.7.	<i>in vitro</i> Transkription.....	94
7.6.8.	<i>in vitro</i> Translation.....	94
7.6.9.	Synthese [³² P] markierter DNA durch „random priming“.....	95
7.6.10.	Synthese [³² P] markierter RNA durch <i>in vitro</i> Transkription.....	95
7.7.	PCR	96
7.7.1.	Analytische PCR.....	96
7.7.2.	Präparative PCR.....	96
7.8.	Elektrophorese	97
7.8.1.	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	97
7.8.2.	Agarosegelelektrophorese von RNA.....	97
7.8.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA.....	98
7.8.4.	Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA (Sequenziergel).....	98
7.8.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen.....	98
7.9.	Transfermethoden	99
7.9.1.	Southernblot.....	99
7.9.2.	Northernblot.....	99
7.9.3.	Westernblot.....	100
7.10.	Hybridisierung	101
7.10.1.	Hybridisierung immobilisierter DNA.....	101
7.10.2.	Hybridisierung immobilisierter RNA.....	101
7.10.3.	Hybridisierung von RNA in Lösung.....	102
7.11.	Autoradiographie	102
8.	Literatur	103
9.	Anhang	116
9.1.	PCR Primer	116
9.2.	Abkürzungsverzeichnis	117
9.3.	Danksagung	119
9.4.	Lebenslauf	120

1. Einleitung

1.1. Programmierter Zelltod und Apoptose

In mehrzelligen Organismen spielt der programmierte Zelltod, eine natürliche Form des Zelltodes, eine Schlüsselrolle beim Erhalt der Gewebe und der Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl in Geweben mit einer hohen Teilungsrate. Außerdem ist der programmierte Zelltod eine wirksame Verteidigung gegen genetisch beschädigte Zellen, die aufgrund ihres oncogenen Potentials für das Überleben des Organismus ein immenses Risiko darstellen. Die gezielte Eliminierung von virusinfizierten Zellen aus dem Organismus erfolgt durch cytotoxische Immunantworten, die letztendlich den programmierten Zelltod in den infizierten Zellen auslösen.

Der programmierte Zelltod ist ein aktiver Prozess, der durch bestimmte morphologische Änderungen der Zelle charakterisiert wird, die als Apoptose bezeichnet werden [1]. Im Verlauf der Apoptose ändert sich der Aufbau der Zellmembran, es kommt zu Membranausstülpungen („blebbing“), die genomische DNA wird durch Nukleasen zwischen den Nukleosomen gespalten, das Chromatin kondensiert und der Nukleus zerfällt in kleine Bruchstücke. Am Ende des Prozesses schrumpft die Zelle und zerfällt in kleine, membranumhüllte Fragmente, die apoptotischen Körper („apoptotic bodies“). Diese apoptotischen Körper können von Makrophagen und benachbarten Zellen des Gewebes leicht phagozytiert werden, so daß Zellen, die durch Apoptose sterben, effizient aus dem Gewebe entfernt werden können. Wenn Zellen mechanisch oder durch die Einwirkung von Chemikalien beschädigt werden, wird ein passiver Prozess, die Nekrose ausgelöst. Die Zellen schwellen, platzen und ergießen ihren Inhalt in den Extrazellularraum und lösen so inflammatorische Reaktionen aus.

Die Apoptose wird in Eukaryonten durch drei Genfamilien vermittelt, die durch Homologie mit Proteinen, die am programmierten Zelltod im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beteiligt sind, identifiziert werden konnten. Die Zerstörung einer Zelle wird in *C. elegans* durch CED-3 hervorgerufen, das durch CED-4 aktiviert wird. Das CED-9 Protein ist ein negativer Regulator der Apoptose (siehe Abb. 1.1.2.) [2, 3]. In Vertebraten wird die Apoptose über verschiedene Signaltransduktionswege ausgelöst, die im Cytosol zur Aktivierung einer CED-3 homologen Proteasefamilie, den Caspasen (Cystein-Aspartat Spezifische Proteasen) führt, die verschiedene Zielproteine im Zellkern und im Zytoplasma proteolytisch spalten und damit die morphologi-

schen Änderungen und den Tod der Zelle herbeiführen [4]. Die Aktivierung der Caspasen kann direkt durch sog. Todesrezeptoren, wie z.B. CD95 (FAS/ApoI), TNFR1 (CD 120a/p55) (siehe Abschnitt 1.1.2)[5] oder die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien der Zelle ausgelöst werden [6]. Im Rahmen einer cytotoxischen Antwort durch NK-Zellen oder CD8 (TKillerzellen) wird die Caspasekaskade durch die Protease Granzym B aktiviert [7, 8]. Die indirekte Auslösung der Apoptose erfolgt über Tumorsuppressoren, wie p53, Rb, BRCA1 oder das Adenovirusprotein E1A (siehe Abschnitt 1.1.1.), die durch Induktion von proapoptotischen Genen wie *bax* oder antiproliferativen Genen wie *p21^{Cip/Waf1}* die Freisetzung von Cytochrom c, bzw. eine Blockade des Zellzyklus auslösen [9]. Die Aktivierung der Tumorsuppressorproteine erfolgt im allgemeinen über eine Reihe von Proteinkinasen, die infolge einer Schädigung der DNA der Zelle aktiviert werden [9].

Die Apoptose wird in Vertebraten von der Familie der Bcl-2 Proteine kontrolliert [10], einer Proteinfamilie, die sich vom CED-9 Homolog Bcl-2 [11] ableitet. Einige Mitglieder der Bcl-2 Familie haben, wie CED-9, eine antiapoptotische Wirkung, andere haben eine proapoptotische Wirkung. Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie z.B. Bax können in der äußeren Mitochondrienmembran Poren bilden und Cytochrom c freisetzen [12], das mit dem CED-4 Homolog Apaf-1 assoziiert und die Aktivierung der Caspasen auslösen kann [13]. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und vor allem Bcl-x_L [14] verdienen hier besondere Aufmerksamkeit, da sie eine bereits erfolgte Aktivierung der Caspasen durch Freisetzung von Cytochrom c [15] oder durch die Aktivierung von CD95/FAS [16] unterbinden oder zumindest verzögern können und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindern können [17, 18, 19]. Die Auslösung der Apoptose durch Aktivierung der Caspasen wird durch Bcl-2 und Bcl-x_L kontrolliert, die daher ein hohes oncogenes Potential besitzen. Die Wichtigkeit dieser beiden antiapoptotischen Proteine, vor allem Bcl-x_L, läßt sich aus der Häufigkeit ableiten, mit der es bei malignen Entartungen von Zellen überexprimiert wird [20, 21, 22]. Diese Überexpression von Bcl-x_L führt unter anderem auch zu einer multiplen Drogenresistenz, die den Einsatz verschiedenster Cytostatika zur Tumortherapie weitestgehend wirkungslos macht [23, 24, 25, 26], da die meisten Cytostatika, oder auch die Tumortherapie mit Hilfe von γ -Strahlung in den zu therapierenden Zellen die Apoptose auslösen. Außerdem wird in einer Vielzahl von Zellen die Expression des antiapoptotischen Bcl-x_L durch Cytostatika induziert [27, 28, 29]. So ist für den korrekten Ablauf der Apoptose nicht nur die Interaktion der verschiedenen pro – und antiapoptotischen Proteine von entschei-

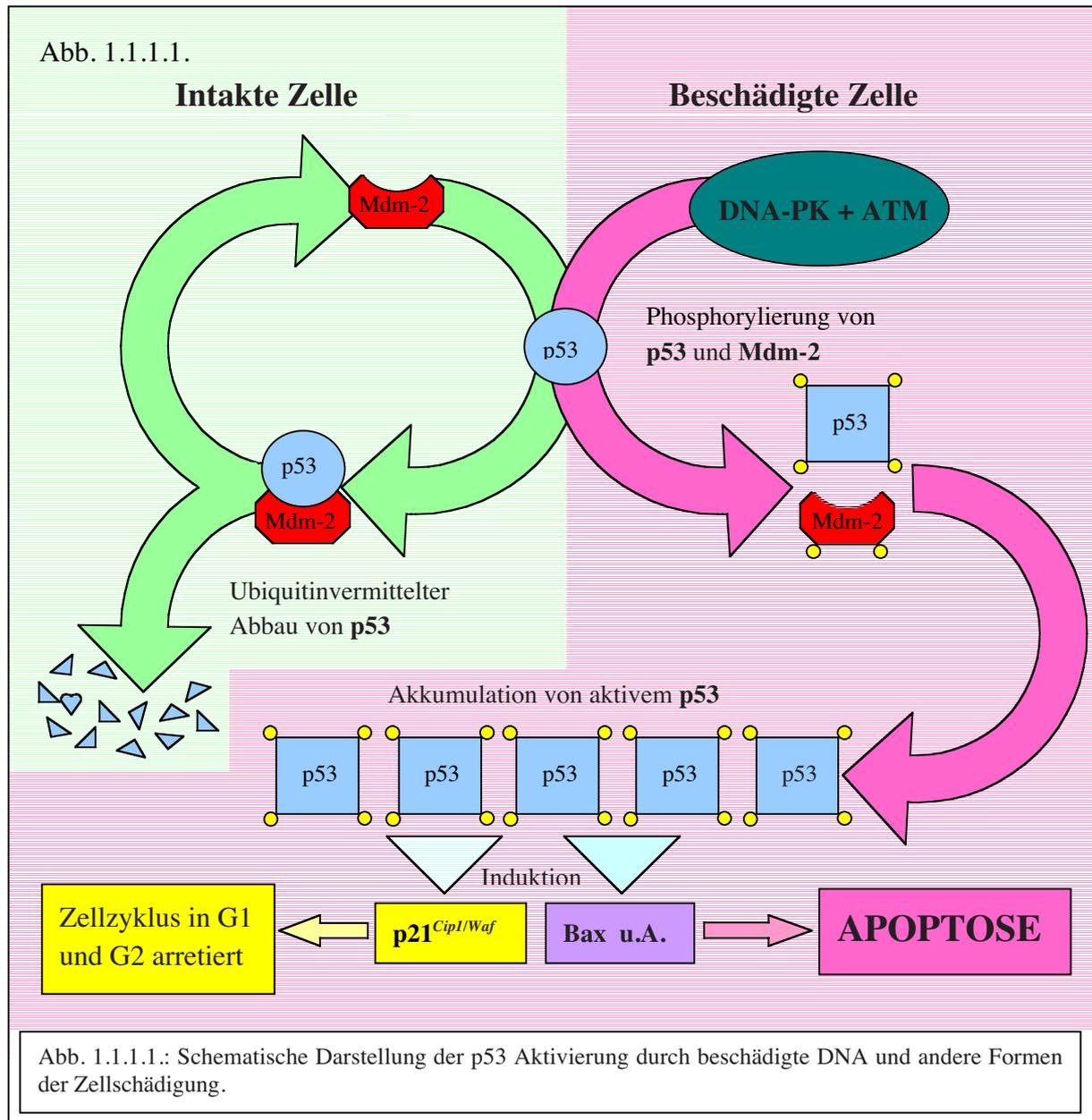
dender Bedeutung, sondern auch die Regulation der Expression von Genen, die für diese Proteine kodieren.

1.1.1. Tumorsuppressoren

Mutationen von an der Regulation des Zellzyklus, der Zelladhäsion oder der Apoptose beteiligten Genen können der Auslöser für neoplastische Veränderungen der Zellen sein. Die Vernichtung einer genetisch beschädigten Zelle ist für den mehrzelligen Organismus der einzige Weg, die Entwicklung einer neoplastischen Autonomie dieser Zelle zu blockieren. Allerdings ist es vom replikativen Potential, dem Ausmaß der DNA-Schädigung und dem Typ der geschädigten Zelle abhängig, ob die DNA repariert wird, der Ablauf des Zellzyklus blockiert, oder ob in der Zelle die Apoptose initiiert wird. Hat eine Zelle nur ein niedriges replikatives Potential, wie die postmitotischen Zellen der Eingeweideepithelien oder der Haut, so wird eine DNA-Schädigung lediglich repariert. Mutierte Zellen mit einem hohen replikativen Potential werden durch Einleitung der Apoptose oder Blockierung des Zellzyklus vernichtet [9]. Proteine, die als Antwort auf einen anomalen Zellzyklus oder Mutationen den Zellzyklus blockieren, die Apoptose einleiten oder auf andere Weise eine Replikation der Zelle verhindern, werden im allgemeinen als Tumorsuppressoren bezeichnet. Es kann sich dabei um virale Proteine wie das Adenovirus E1A Protein [33], die Produkte bestimmter zellulärer Oncogene oder spezielle Tumorsuppressorproteine wie p53 [9], BRCA1 [32] oder Rb [34] handeln. Die Bedeutung, die Tumorsuppressoren wie p53, BRCA1 oder Rb für die Antwort der Zelle auf Beschädigungen haben, wird durch die Häufigkeit unterstrichen, mit denen sie in den verschiedensten Tumorzellen mutiert sind[30].

Die Antwort auf eine Beschädigung der DNA wird in Vertebraten unter anderem durch eine Reihe von Proteinkinasen vermittelt, deren Prototypen die Proteinkinasen ATM und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) sind. Ein Hauptziel von ATM und gegebenenfalls DNA-PK ist der Tumorsuppressor p53, ein Transkriptionsfaktor. In niedrigen Konzentrationen wird p53 durch Interaktion mit dem Mdm-2 Protein, das selbst ein Ziel für DNA-PK ist [9], durch Degradation inaktiviert [31]. Eine durch DNA-Schädigung induzierte Phosphorylierung von p53 und auch Mdm2 blockiert die p53-Mdm-2 Interaktion. Sie verhindert zum einen den Abbau von p53 und bewirkt zum andern, daß aktives p53 in der Zelle vorliegt (siehe Abb. 1.1.1.1). Die Aktivierung von p53 löst zwei zelluläre Antworten aus: Die irreversible Blockade des

Zellzyklus in den Stadien G1 und G2 und die Apoptose [30]. Die durch p53 vermittelte Blockierung des Zellzyklus wird im wesentlichen durch die Induktion eines Inhibitors der Cdk (Cyclin Dependent Kinase), p21^{Cip1/Waf1}, ausgelöst [9, 35]. Die Mechanismen, mit deren Hilfe p53 die Apoptose auslöst, sind weniger eindeutig beschrieben, beinhalten aber im wesentlichen die Induktion von Genen, die die Apoptose und nicht eine Blockade des Zellzyklus auslösen [36]. Das am besten charakteri-



sierte apoptoseauslösende Protein, dessen Expression durch p53 induziert wird, ist der Bcl-2 Antagonist Bax [37]. Weitere proapoptotische Gene, die durch p53 induziert werden, sind *FAS/Apo1*, *Killer/DR5*, *IGF-1R* („Insulin like growth factor-1“ Rezeptor) und *IGF-BP3* (IGF-bindendes Protein), Komponenten des Renin-Angiotensin Systems und Proteine, die die Angiogenese regulieren (Übersicht: [36]). Darüber hinaus kann

die Aktivierung von p53 zur Repression der Transkription antiapoptotischer Gene wie *bcl-2* und *relA* führen [36]. p53 ist außerdem an zellulären Reaktionen auf eine Reihe von schädlichen Einflüssen beteiligt, die den Metabolitenentzug, physikalische Beschädigung, Hitzeschock, Hypoxie oder die Expression von Oncogenen wie *c-myc* oder E1A [9] umfassen. Der Tumorsuppressor BRCA1 kann direkt mit p53 assoziieren und die p53 abhängige Transkription von p21^{Cip1WAF1} und *bax* verstärken. BRCA1 und p53 können also kooperativ die Apoptose induzieren [39]. BRCA1 kann auch unabhängig von p53 die Transkription von p21^{Cip1WAF1} aktivieren und neben seiner Rolle als Transkriptionskoaktivator kann BRCA1 die Proteine BIP1, BAP1, c-Myc, p53, Rad51, CtIP, PCNA, EHA und RNA Pol.II binden, die an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt sind [40, 41]. Der Tumorsuppressor Rb kann verschiedene Transkriptionsfaktoren binden und agiert so als Korepressor oder Koaktivator der Transkription von Genen wie *TGF-β1*, *TGF-β2*, *c-myc*, *c-jun* und *cdc2*, die an der Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums beteiligt sind [35]. Der wichtigste Transkriptionsfaktor, der an Rb bindet, ist E2F. Er wird durch Bindung des adenoviralen Oncoproteins E1A an Rb freigesetzt und stimuliert den Eintritt in die S-Phase [35, 38]. Außerdem reguliert Rb die Stabilität von p53 durch Bindung von Mdm2. Der Rb-Mdm2-p53 Komplex liegt als Trimer vor. Die p53 anhängige Transkription ist weiterhin inhibiert, aber der Komplex ist dazu in der Lage, die p53 vermittelte Repression verschiedener Gene auszuüben [42, 43]. Das Adenovirusprotein E1A ist das wachstumsfördernde Oncoprotein schlechthin. Die Untersuchung von Adenovirusmutanten mit Defekten im E1B-Gen, die eine schnelle Zerstörung der Wirtszelle und den folgenden Zelltod auslösten, gab einen Hinweis auf das cytotoxische Potential von E1A [38]. Weitere Untersuchungen ergaben, daß E1A ein sehr potenter Auslöser der Apoptose ist, dessen letale Wirkung durch die antiapoptotischen Produkte des E1B Gens aufgehoben werden muß, um eine effiziente Virusreplikation zu ermöglichen [33]. Sowohl die wachstumskontrollierenden als auch die apoptotischen Funktionen befinden sich in der NH₂-terminalen Region von E1A, die die Bindung von Rb, den transkriptionellen Korepressoren p300, CBP, TBP und dem TATA-Box-bindenden Protein des Transkriptionsfaktors TFIID an das E1A Protein ermöglicht [43]. Die Interaktion mit Rb, p300, CBP oder beiden Proteinen ist für E1A unerlässlich, um die Proliferation oder die Apoptose auszulösen [33]. Die wachstumskontrollierenden, d.h. transformierenden Funktionen der N-terminalen Region des E1A Proteins können durch Bindung eines zellulären Proteins, CtBP („C-terminal binding protein“), an die C-terminale Region inhibiert werden [43, 44, 45]. C-terminal bindende Proteine mit einer hohen Ähnlichkeit zu CtBP wurden un-

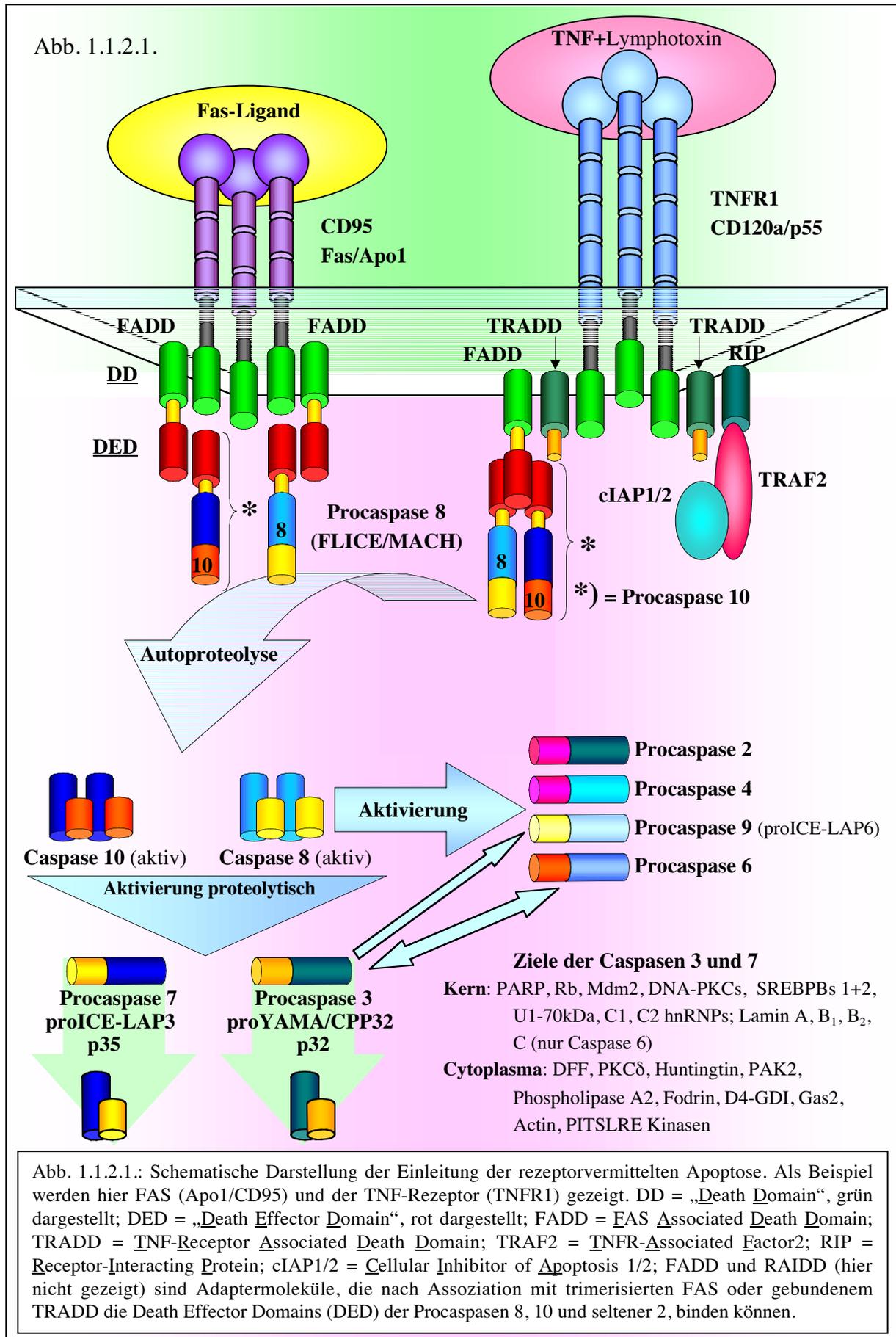
ter anderem auch in *Drosophila melanogaster* und in Maus nachgewiesen, wo sie ebenfalls die Funktion eines Transkriptionsrepressors erfüllen [46, 47, 48]. Ein zelluläres Protein, das an CtBP binden kann, CtIP (CtBP Interacting Protein), wurde vor kurzem identifiziert, aber dessen Rolle bei der Kontrolle der E1A Wirkung muß noch geklärt werden [45]. CtIP bindet unter anderem an Rb [50] und BRCA1 [51, 52], wobei CtIP/Rb eine eigene Domäne zur Bindung von Rb [50], eine Domäne zum Binden von E1A oder CtBP (das PLDLS Motiv) [50] und vermutlich eine Extradomäne zur Assoziation mit den BRCT Domänen von BRCA1 besitzt. Durch die Bindung von CtIP an BRCA1 wird ein Komplex mit CtBP gebildet, der die Transkription von p21^{Cip1/Waf1} verhindert. Da der Komplex nach Behandlung der Zellen mit UV-Licht, γ -Strahlen oder Adriamycin zerfällt kann die Transkription von p21^{Cip1/Waf1} auf diesem Wege wieder ermöglicht werden [52].

Die Wirkung einzelner Tumorsuppressoren oder kooperative Wirkung mehrerer Tumorsuppressorproteine führt zur Aktivierung der Caspasen und zur Apoptose. Ob die Aktion der einzelnen Tumorsuppressorproteine durch CtIP oder CtBP koordiniert wird, muß wie der Mechanismus, der zur Auslösung der Apoptose durch die Tumorsuppressoren führt, noch erforscht werden.

1.1.2. Todesrezeptoren und Caspaseaktivierung

Die Wirkung von cytotoxischen T-Zellen und von NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) des Immunsystems besteht darin, daß sie in antigenpräsentierenden Zellen die Apoptose auslösen. Die cytotoxischen Zellen setzen nach Bindung der antigenpräsentierenden Zelle Perforin und Granzym B enthaltende Granula frei [8]. Perforin bildet Poren in der Zielzelle und so kann Granzym B, eine Protease, in diese Zellen eindringen und dort Procaspase 9 durch Proteolyse aktivieren [7] (siehe 1.1.). Die Regulation der cytotoxischen Aktivität von NK-Zellen erfolgt über die MHC-1 Moleküle HLA-B, C und E auf der Membran der Zielzelle [53]. Präsentieren zum Beispiel die HLA-E Moleküle der Zielzelle die Signalpeptide anderer MHC-1 Moleküle, so wird der inhibitorische Rezeptor CD94/NKG2 der NK-Zelle gebunden, der die Sekretion von Perforin und Granzym B verhindert [54, 55, 56]. Signalisiert die Zelle durch fehlende oder nicht beladene MHC-1-Moleküle (HLA-B, C, E), daß das TAP-System [57, 58] gestört ist, oder daß die Proteinbiosynthese durch eine virale Infektion gestört ist, wird die cytotoxische Antwort der NK-Zelle ausgelöst. Der Mechanismus, der zur Sekretion der Perforin/Granzym B Granula führt, ist noch nicht auf-

geklärt. Auf CD8⁺, auf Cd4⁺ T-Zellen und auf NK-Zellen werden aktivierende Rezeptoren (NKAR) exprimiert, die ebenfalls MHC-I Moleküle auf den Zielzellen erkennen und die Sekretion von Cytokinen, vor allem INF- γ induzieren [59]. Durch INF- γ wird neben der Expression von HLA-E die Expression von Genen induziert, die für die Zellteilung, die Differenzierung, die Regulation der Immunantwort und antivirale Aktivitäten verantwortlich sind [8, 60]. NK-Zellen und CD8⁺ T-Killerzellen exprimieren außerdem noch den FAS-Liganden und TNF- α [8, 61, 62, 63], die an die Todesrezeptoren CD95/Fas/Apo1 bzw. TNFR1/CD120a/p55, die auf der Oberfläche von Zielzellen exprimiert werden, binden und somit die Apoptose in den Zielzellen auslösen [5, 8]. Diese Todesrezeptoren gehören zur Tumor-Nekrosefaktor (TNF) Rezeptorgen Superfamilie. Sie haben ähnliche, extrem cysteinreiche extrazelluläre Domänen und eine cytoplasmatische Todesdomäne („death domain“ DD), die ein typisches Strukturmerkmal der Todesrezeptoren ist. Die bisher am besten charakterisierten Todesrezeptoren sind CD95 (Fas/Apo) und sein Ligand CD95L/FASL, der im wesentlichen von NK-Zellen und cytotoxischen T-Zellen exprimiert wird und TNFR1 (p55/CD120a) und sein Ligand TNF (Tumor-Nekrosefaktor) und Lymphotoxin-a, die von aktivierten Makrophagen und T-Zellen als Antwort auf eine Infektion exprimiert werden. Die Todesrezeptoren DR3 (Apo3/WSL-1/TRAMP/LARD), DR4 und DR5 (Apo2/TRAIL-R2/TRICK2/KILLER), sowie die Liganden Apo3-Ligand (Apo3L/TWEAK) und Apo2-Ligand (Apo2-L/TRAIL), der an DR3 bzw. DR4 und DR5 bindet, sind noch nicht so umfassend charakterisiert worden wie CD95/CD95L und TNFR/TNF [5]. Die Bindung von FASL/CD95L an CD95/FAS/Apo1 führt zur Assoziation von drei Rezeptormolekülen. Durch die Trimerisierung können die cytoplasmatischen Todesdomänen (DD) der Rezeptormoleküle die Todesdomänen der Adaptermoleküle FADD (Fas associated death domain) binden, an deren Todeseffektordomänen (DED = death effector domain) die DED von Procaspase8 und Procaspase10 binden. An das Rezeptortrimer binden zwei Moleküle FADD, die zwei Moleküle Procaspase 8 bzw. 10 binden, deren Konformation durch die Bindung an FADD geändert wird, so daß sie durch Autoproteolyse aktiviert werden. Der Komplex aus CD95(FAS/Apo1)-Trimer, FADD und Procaspasen wird als Todesinduzierender Signalkomplex („death inducing signaling complex“ = DISC) bezeichnet [4, 5, 64, 65]. Die Caspasen 8 und 10 werden als Initiatorcaspasen bezeichnet, da ihr Zielsubstrat die Procaspasen 2, 3, 4, 6, 7 und 9 sind, die zur Aktivierung von Caspase 8 oder 10 proteolytisch gespalten werden.



Die Caspasen 3 und 7 werden als Effektorcaspasen bezeichnet, deren Substrat verschiedene zelluläre Proteine sind (siehe Abb.1.1.2.1.) [66]. Die Procaspasen 6 und 9 können auch von Caspase 3 gespalten werden und in ihrer aktiven Form ihrerseits Procaspase 3 spalten. Dies stellt vermutlich einen Verstärkungsschritt in der Caspaseaktivierung dar [64]. Unabhängig von einem Rezeptor kann die Aktivierung von Procaspase 9 durch Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien der Zelle erfolgen [6], die durch Bax induziert wird [12] (siehe Abschnitt 1.1.2.). Die aktivierte Caspase 9 aktiviert die Procaspasen 3 und 7, wobei Caspase 3 auch Procaspase 9 spalten kann. Caspase 3 aktiviert Procaspase 6 und 2; Caspase 6 aktiviert die Caspasen 8 und 10 [67]. Die Aktivierung der Procaspase 9 wird im Abschnitt 1.1.3. genau besprochen.

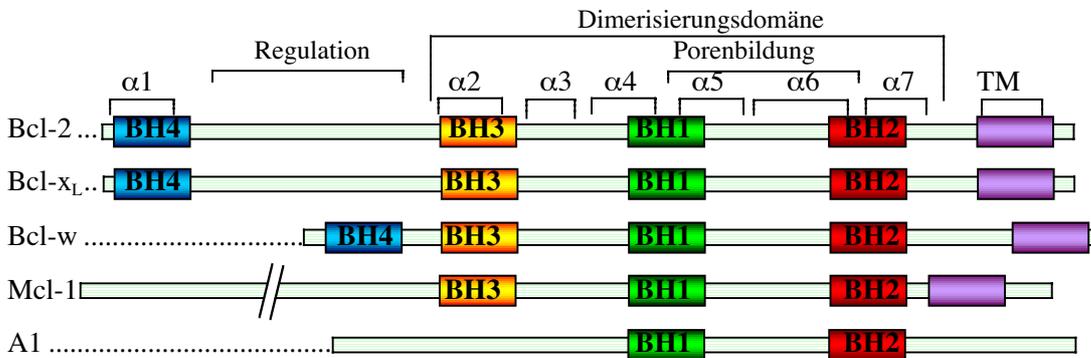
1.1.3. Regulatoren der Apoptose: Die Bcl-2 Familie

In Zellen von Säugetieren wurden bisher fünfzehn verschiedene, an der Steuerung der Apoptose beteiligte Proteine identifiziert, die alle nicht nur eine strukturelle, sondern auch eine funktionelle Ähnlichkeit mit dem Apoptoseinhibitor [10, 11] Bcl-2 haben. Die Sequenz aller Bcl-2 verwandten Moleküle enthält wenigstens eines der folgenden vier konservierten Sequenzmotive, die Bcl-2-Homologiedomänen BH1, BH2, BH3 und BH4 (siehe Abb. 1.1.3.1.) [10, 68]. Alle Bcl-2 Verwandten mit antiapoptotischer Wirkung enthalten als Minimalausstattung die Domänen BH1 und BH2 und die Bcl-2 ähnlichsten enthalten alle vier BH-Domänen. Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie werden in zwei Gruppen unterteilt. Die Proteine der Bax-Gruppe sind Bcl-2 sehr ähnlich und haben eine BH1-, eine BH2- und eine BH3-Domäne. Die Mitglieder der BH3 Gruppe haben nur eine kurze, 9 bis 16 Aminosäuren lange, zentrale BH3-Domäne. Sie haben nur eine sehr geringe oder gar keine Ähnlichkeit mit Bcl-2 (siehe Abb. 1.1.3.1.) [10]. Die BH3-Domäne ist für die Funktion der proapoptotischen Proteine wesentlich [10, 69, 70, 71]. Die pro- und antiapoptotischen Familienmitglieder können mit Hilfe ihrer BH1-, BH2- und BH3-Domänen Homodimere und Heterodimere bilden, wobei ihre relative Konzentration einen „Schalter“ für das Suizidprogramm darstellt [72, 73]. Die Aufklärung der Kristallstruktur von Bcl-x [74, 75, 76] ermöglichte eine Erklärung für die Wirkung der BH-Domänen. Die Zusammenlagerung der α -Helices der BH1, BH2 und BH3 Regionen von Bcl-x erzeugt eine lange hydrophobe Spalte, an die eine amphipathische BH3- α -Helix binden kann. Die Bindung von BH3- α -Helices an die hydrophobe Spalte, die

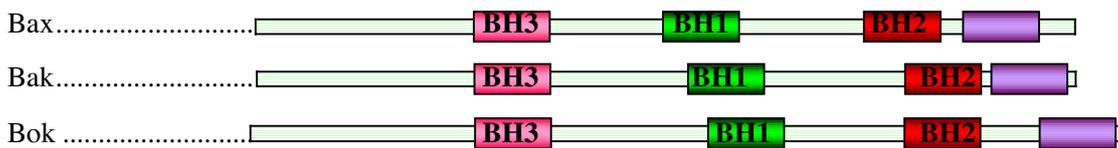
an eine Rezeptor-Liganden Bindung erinnert, ist wahrscheinlich der Grund für alle Dimerisierungen innerhalb der Bcl-2 Familie. Inwieweit die Heterodimerisierung

Abb. 1.1.3.1.

Bcl-2 Gruppe der antiapoptotischen Proteine



Bax-Gruppe der proapoptotischen Proteine



BH3-Gruppe der proapoptotischen Proteine

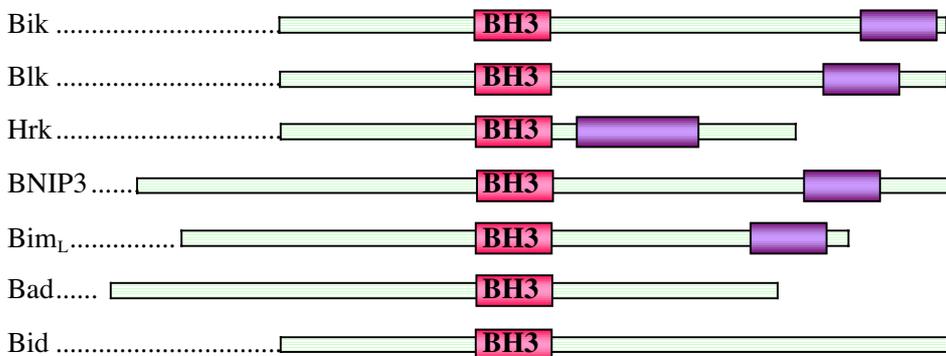


Abb. 1.1.3.1.: Schematische Darstellung der Mitglieder der Bcl-2 Familie der pro- und antiapoptotischen Proteine. Die konservierten BH1-, BH2-, BH3- und BH4-Domänen sind grün, rot, orange bzw. blau dargestellt, die Transmembrandomäne (TM) violett. Die BH3-Domänen der Apoptoseagonisten der Bax- und der BH3 Gruppe sind rosa dargestellt, da sie bei diesen Proteinen eine Ligandenfunktion ausüben.

bzw. die Homodimerisierung zwischen einzelnen pro –bzw. antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie unter physiologischen Bedingungen für die Kontrolle der Apoptose eine Relevanz hat, ist Gegenstand einer Kontroverse, da die Bcl-2-Verwandten Proteine unter Einfluß von Detergentien oder saurem pH, die bei der Zellyse verwendet werden, Homo –bzw. Heterodimere bilden [77, 78]. Ein großer Teil der Bcl-2 Verwandten trägt am Carboxyterminus eine hydrophobe Domäne, die als Membrananker dienen kann [10].

In der Zelle ist der Hauptanteil von Bcl-2 und Bcl-x auf der cytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und ein geringer Anteil am endoplasmatischen Retikulum, der Kernhülle und im Cytosol [79, 80]. Bax ist, bevor die Zelle einen apoptotischen Stimulus erhält, ausschließlich im Cytosol lokalisiert [81, 82, 83]. Obwohl die carboxyterminale, hydrophobe Domäne von Bcl-2 als Membrananker fungiert, wird durch ihre Deletion die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 nicht verändert [84]. Durch die Deletion der C-terminalen Transmembrandomäne verliert Bcl-x_L die Fähigkeit, Hefezellen vor der Bax-induzierten Apoptose zu schützen [85]. Die Struktur von Bcl-x_L, speziell seine $\alpha 5$ und $\alpha 6$ Helices, erinnern an die Membraninsertionsdomänen von bakteriellen Toxinen [74, 75, 76]. Diese strukturelle Auffälligkeit stützt die Hypothese, daß Mitglieder der Bcl-2 Familie mit einer BH1 und einer BH2 Domäne, also die Bcl-2 und die Bax Gruppe, die Funktion haben, in Organellen wie den Mitochondrien Poren zu bilden. In vitro können Bax, Bcl-2 und Bcl-x_L Kanäle in Lipid-Doppelschichten bilden. Die durch Bax und Bcl-2 gebildeten Kanäle haben unterschiedliche Eigenschaften, die eine schwache Ionenselektivität beinhalten [12, 86, 87]. Zumindest für das antiapoptotische Protein Bax ist *in vivo* nachgewiesen worden, daß eine apoptotischer Stimulus seine Translokation vom Cytosol in die äußere Mitochondrienmembran verursacht, wo Bax das Membranpotential stört und die Freisetzung von reaktivem Sauerstoff und Cytochrom c aus der mitochondrialen Matrix bzw. dem Intermembranraum ins Cytosol bewirkt [12, 88, 89, 90]. *Schizosaccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, die weder Bcl-2, Bcl-x_L oder ähnliche Proteine, noch CED-4 oder Caspasen exprimieren, werden beide durch Bax- oder Bak-Überexpression getötet [84, 85]. Die Wirkung von Bax und Bak wird hier durch Bcl-2 aufgehoben, das offensichtlich die Mitochondrienzerstörung verhindert. Die Deletion der BH3-Domäne von Bax verhindert eine mögliche Homodimerisierung und die damit verbundene Toxizität für die Zelle [91]. Diese Ergebnisse scheinen auf eine Form des Zelltodes hinzudeuten, der den Caspasen vorangeht, aber immer noch in Säugetieren existiert. Sogar in Gegenwart eines Caspaseinhibitors führt die Überexpression oder die verstärkte Homodimerisierung von Bax- verwandten Proteinen in Säugerzellen zur DNA-Kondensation und Membranänderungen, d.h. zum Zelltod ohne Caspasewirkung oder DNA-Fragmentierung [88]. Bax und seine direkten Verwandten können also durch ihre kanal- bzw. porenbildenden Eigenschaften die Permeabilität der Mitochondrienmembran drastisch ändern und somit einen caspaseunabhängigen Zelltod hervorrufen. Auch in *E.coli* führt die Expression von Bax durch Bildung von Membranporen zum Tod der Zellen, und die Koexpression von Bcl-x_L neutralisiert die Wirkung von Bax [92]. Diese Ergebnisse

können als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, daß Bax Homodimere bzw. Homomultimere und somit Membranporen bilden kann, die bis zu 30 Bax-Monomere enthalten [93].

Alle oben aufgeführten Modelle für die Funktion der Proteine der Bcl-2 Familie sind mit Hilfe von Experimenten entwickelt worden, die auf der verstärkten oder sogar der Überexpression der oben aufgeführten pro –und antiapoptotischen Proteine basieren. Die physiologische Relevanz dieser Modelle muß noch erforscht werden, da die Überexpression von Bcl-2-Verwandten, wie bereits beschrieben, sehr schnell zu einer Multimerisierung führt [77, 78]. Die proapoptotische Wirkung der Proteine der BH-3 Gruppe wird durch Bindung ihrer BH-3 Domäne an die hydrophobe Spalte auf der Oberfläche der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine vermittelt. Durch die Bindung eines BH3 Proteins an ein Bcl-2 verwandtes Protein wird die Wirkung des antiapoptotischen Proteins aufgehoben [10, 94, 95]. Der Wirkungsmechanismus der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L wurde in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht. Sie können die Wirkung der proapoptotischen Proteine der BH-3 Gruppe durch Bindung der BH-3 Gruppen unterbinden (siehe oben), wobei es von der Konzentration des antiapoptotischen Bcl-2 bzw. Bcl-x_L abhängt, ob die Zelle überlebt oder der programmierte Zelltod ausgelöst wird. Die Funktion der antiapoptotischen Proteine besteht in der direkten Inhibition der caspaseaktivierenden Wirkung von CED-4 und dessen Homolog in Vertebraten, Apaf-1 („apoptotic protease activating factor“). CED-9, Bcl-2 und Bcl-x_L können CED-4/Apaf1 binden, welches seinerseits CED-3, das Procaspase 9 Homolog, binden und seine Aktivierung stimulieren kann [2, 13, 67, 96, 97]. Für die Bindung von Bcl-x_L an CED4/Apaf-1 und seine antiapoptotische Funktion wird die BH-4 Domäne benötigt, die CED4/Apaf-1 direkt binden kann. Gleichzeitig bindet Procaspase 9 an die aminoternale CARD-Domäne („caspase recruitment domain“) von CED4/Apaf-1. In diesem ternären Komplex ist die Aktivierung der Procaspase 9 nicht möglich [97], da die Aktivierung von Procaspase 9 durch CED4/Apaf-1 eine durch Cytochrom c und dATP vermittelte Oligomerisierung von Apaf-1 voraussetzt [98, 99]. Bcl-x_L kann die Bildung eines funktionellen Apoptosoms, d.h. des multimeren Komplexes aus Apaf-1 und Cytochrom c, durch Bindung an Apaf-1 verhindern und somit die Caspase-9 Aktivierung unterbinden. Das für die Bildung des Apoptosoms benötigte Cytochrom c wird durch Bax aus den Mitochondrien freigesetzt [12]. Die Freisetzung des Cytochrom c aus den Mitochondrien kann durch Bcl-x_L zum einen durch Bindung des Cytochrom c [19] und zum anderen durch Bildung von Bax-Bcl-x_L Heterodimeren verhindert werden [93]. Die Bindung von Bcl-x_L an Apaf-1 kann durch die Bindung der Apoptoseantagonisten

Bik oder Bid, die der BH-3 Familie angehören, unterbunden werden [94, 95], wobei noch nicht geklärt ist, ob Bik oder Bid unter physiologischen Bedingungen einen bereits bestehenden Bcl-x_L- Apaf-1 Komplex auflösen können. Die Mikroinjektion von Cytochrom c führt in Zellen, die Bcl-x_L überexprimieren, nicht zur Auslösung der Apoptose [15], was einerseits als Hinweis auf die Cytochrom c bindenden Eigenschaften von Bcl-x_L [19], andererseits als Inhibition der Cytochrom c bindenden Eigenschaften von Apaf-1 durch die Interaktion mit Bcl-x_L [97] gedeutet werden kann. Die Bindung von Procaspase 9 an die CARD-Domäne des Apaf-1-Apoptosoms ermöglicht die autoproteolytische Aktivierung der Caspase, die von der Menge an frei verfügbarem Apaf-1 und Cytochrom c abhängig ist. Zum Teil kann die Aktivität der Proteine der Bcl-2 Familie durch eine proteinkinaseabhängige Phosphorylierung moduliert werden, die durch verschiedene Cytokine und Cytostatika beeinflusst wird [10, 100].

1.2. Bcl-x

1.2.1. Struktur und Lokalisation des *bcl-x* Gens

Die Struktur und die Sequenz des Maus-*bcl-x* Gens wurde vor kurzem aufgeklärt [101]. Bcl-x_L ist das dem Bcl-2 ähnlichste Protein aus dem antiapoptotischen Zweig der Bcl-2 Familie und hat eine fast identische Genstruktur.

Das *bcl-2* Gen gilt als das Ursprungsgen der gesamten Bcl-2 Familie von pro- und antiapoptotischen Genen [10]. Die Struktur des *bcl-2* Gens wurde im Genom der Maus aufgeklärt [11], bevor die entsprechende Struktur im Menschen nachgewiesen wurde. Das Gen besteht aus drei Exons, wovon das erste Exon nicht kodiert, sondern lediglich den 5'-nichttranslatierten Bereich (5'-NTR) der *bcl-2* mRNA zur Verfügung stellt, der eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Expression von Bcl-2 spielt [11, 137, 140, 146] (siehe Abschnitt 1.3.2.). Im zweiten Exon befindet sich, etwas stromabwärts vom Beginn des Exons gelegen, der kodierende Bereich des *bcl-2* Gens, der die BH4, BH3, BH1 und einen Teil der BH2 Domäne enthält. Das dritte Exon beinhaltet die zweite Hälfte der BH2 Domäne und den Membrananker. Das zweite Intron, das Exon2 und Exon 3 voneinander trennt, hat eine Länge von ca. 225 kb [11].

Auch beim *bcl-x* Gen ist die kodierende Region auf Exon2 und Exon3 lokalisiert, während Exon1 nichtkodierend ist und von Exon2 durch ein 283 bp langes fakultatives Intron getrennt ist. Das 672 bp lange Exon2, das die konservierten BH4, BH3, BH1 und einen Teil der BH2 Domänen kodiert, ist von Exon3 durch ein mehr als 9kb

langes Intron getrennt. Das Maus-*bcl-x* Gen liegt auf dem Chromosom 2 bei ungefähr 89 cM zwischen dem Thbd (84 cM) und dem Top Locus (93cM). Die Analyse der Chromosomenhomologien zwischen Maus und Mensch ermöglichte die theoretische Lokalisation des humanen *bcl-x* Gens in der perizentrischen Region von Chromosom 20 [101, 102]. Vom humanen *bcl-x* Gen ist bisher nur ein Teil der 5'-nichtkodierenden Region in Exon 1 (5'-NCR) und ein Teil von Exon2 sequenziert worden [103]. Ein Vergleich der 5'-nichttranslatierten Regionen des *bcl-x* Gens und der mRNAs aus Mensch, Maus und Ratte zeigt eine Sequenzähnlichkeit von mehr als 80% [101].

1.2.2. Der *bcl-x* Promoter und der Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA

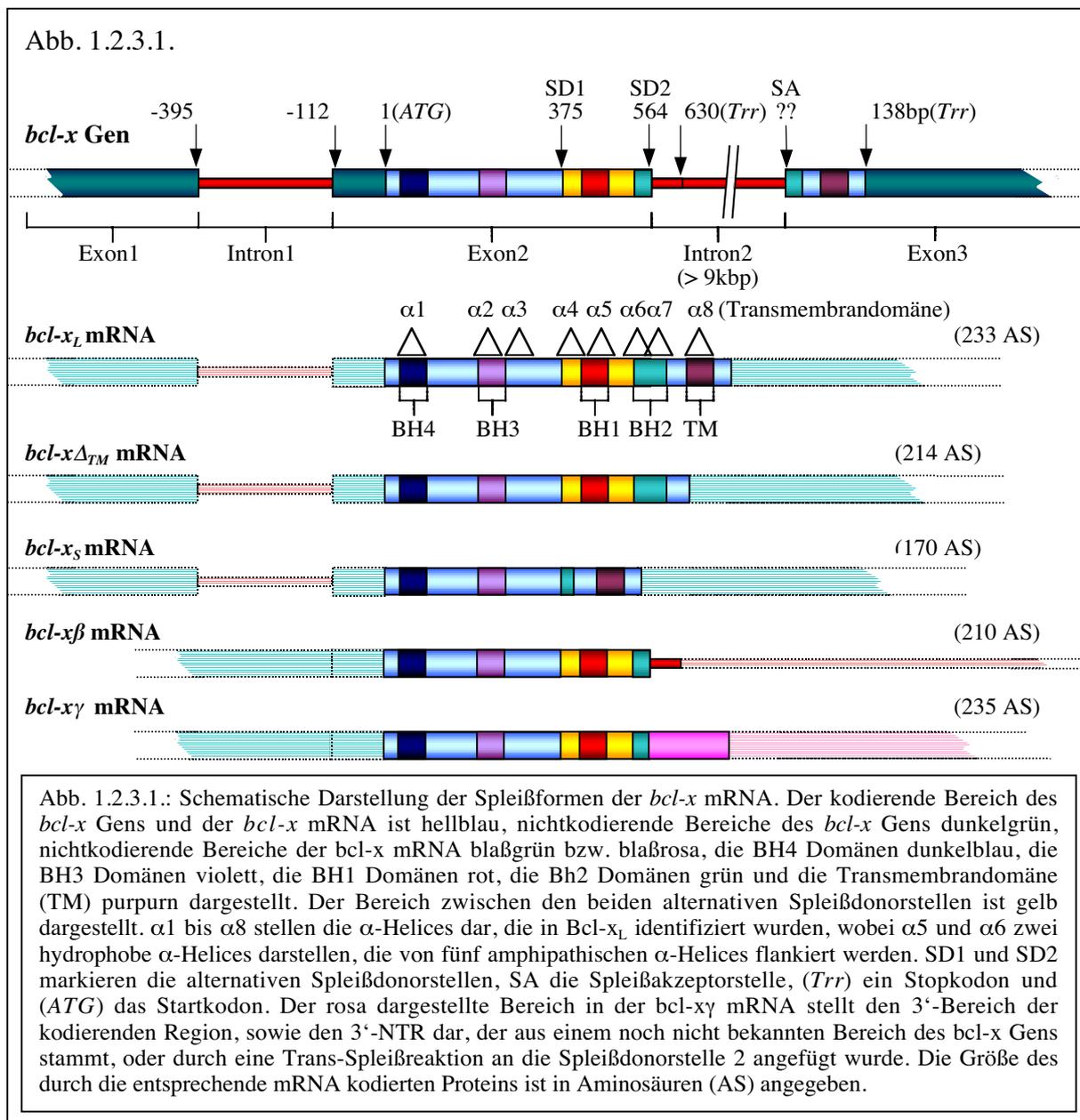
Das *bcl-x* Gen der Maus weist zwei voneinander unterscheidbare Promoterregionen auf. Direkt stromaufwärts vom Startkodon, in Position -154 bis -94 relativ zum ersten Startkodon der *bcl-x* mRNA, befindet sich eine 57 bp lange Region, die eine starke Promoteraktivität aufweist. Der Haupttranskriptionsstart der *bcl-x* mRNA in humanen K562-Zellen und FL5.12-Zellen aus der Maus wurde in diesem Bereich kartiert. Bisher wurde weder die Struktur noch die mögliche Funktion des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA einer systematischen Untersuchung unterzogen. Die 57bp lange Promoterregion im 5'-NCR des *bcl-x* Gens der Maus enthält keine kanonische TATA-Box. Die Analyse dieser Region zeigte das Konsensus-Initiator Element YYANT/AYY (*Inr*) in Position -149 bis -142. *Inr* Elemente sind an der Initiation der Transkription von TATA-losen Promotoren beteiligt, wobei die Startstelle mit der *Inr* Stelle übereinstimmt. Im allgemeinen ist die erste Base einer RNA, die von einer *Inr*-Stelle aus transkribiert wird, ein Adenin [104]. Das *Inr* Element ist an der Initiation der Transkription des *bcl-x* Gens wahrscheinlich nicht beteiligt, da die Lage des Haupttranskriptionsstarts in dieser Region nicht mit der Position der *Inr*-Konsensussequenzen übereinstimmt. Eine weitere, nicht genauer untersuchte Promoterregion liegt weiter stromaufwärts von Exon 1. Diese Region ist sehr GC-reich und enthält einige Konsensus-Bindungsmotive für den Transkriptionsfaktor Sp1. Im *bcl-x* Gen der Maus sind zwei Haupttranskriptionsstartstellen in dieser GC-reichen Region identifiziert worden. Im Gehirn liegt der Haupttranskriptionsstart bei Position -727 und im Thymus bei Position -655 vor dem Initiationskodon in Exon 2 [80, 105]. Zusätzlich zu diesen Hauptinitiationsstellen der Transkription existieren noch mehrere Nebeninitiationsstellen im Promoterbereich des *bcl-x* Gens. Beim *bcl-2* Gen wurden bereits vor einiger Zeit unterschiedliche Promotoren und Transkriptionsstarts nachgewiesen [106]. Ob sich im 5'-NCR des menschlichen *bcl-x* Gens verschiedene Pro-

moterregionen befinden, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Hauptpromoteraktivität des 5'-NTR des humanen *bcl-x* Gens wurde zwischen Position -639 und Position -161 kartiert [107], während der Transkriptionsstart dieses Gens noch unbekannt ist. In der Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens befinden sich zahlreiche Konsensusmotive zur Bindung von Transkriptionsfaktoren, deren Lage und Anzahl für das Maus -und das Humangen identisch sind [101]. Die Konsensus-Bindungssequenz für Transkriptionsfaktoren aus der GATA-Familie, die eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Überlebens von erythroiden Vorläuferzellen und deren Differenzierung spielen [108, 109], existiert zweimal im Promoterbereich des *bcl-x* Gens. Die entscheidende Rolle von Bcl- x_L für das Überleben von hämatopoietischen Zellen konnte durch die Untersuchung von *bcl-x* defizienten Mäusen bewiesen werden [110]. Außerdem induziert Erythropoietin (EPO) die GATA-1 Aktivität [111] und ermöglicht das Überleben von erythroiden Vorläuferzellen, in dem es durch Induktion von Bcl- x_L die Apoptose unterdrückt [112]. Der Transkriptionsfaktor Ets-1 hat einen entscheidenden Anteil am Überleben von Lymphocyten [113, 114] und die Existenz von zwei Ets-1 Konsensus-Bindungssequenzen im Promoterbereich des *bcl-x* Gens sind für die stadienspezifische Regulation der Bcl-x Expression während der Lymphocytenentwicklung zuständig [101]. Im Promoterbereich des humanen *bcl-x* Gens wurde ein GAS Element identifiziert, das zwischen Position -321 und -331 stromaufwärts vom Startkodon der *bcl-x* mRNA liegt [107]. Die Transkription des *bcl-x* Gens kann durch Erythropoietin über einen JAK-Kinase Signalweg induziert werden [122]. IL-2, IL-7 [123], CD40L [124, 125] und in einigen Fällen auch INF- γ [126, 127] können die Transkription des *bcl-x* Gens steigern.

1.2.3. Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA

Die am häufigsten in Ratten, Mäusen und Menschen exprimierten Formen von Bcl-x sind das antiapoptotische Bcl- x_L und das proapoptotische Bcl- x_S . Die *bcl-x_L* mRNA wird aus einer prä-mRNA durch Verbindung von Exon2 und Exon 3 erzeugt. Sie enthält einen Leserahmen von 233 Aminosäuren Länge, der für die Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4 und die Transmembrandomäne kodiert. Durch Verwendung einer alternativen Spleißdonorstelle in Exon2, die an die Akzeptorstelle in Exon 3 gespleißt wird, wird die *bcl-x_S* mRNA generiert, der dadurch 63 Aminosäuren fehlen, welche die BH1- und BH2-Domäne bilden (siehe Abb.1.2.3.1.). Aufgrund der fehlenden BH1- und BH2-Domänen hat Bcl- x_S die Fähigkeit verloren, mit anderen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, vor allem Bax und Bad, Heterodimere zu bilden, kann aber

schwach mit Bcl- x_L und Bcl-2 assoziieren [115]. Bcl- x_S ist die Bcl-x Variante, die ausschließlich in Zellen mit einer hohen Wachstumsrate, wie unreifen Thymocyten, exprimiert wird, während Bcl- x_L diejenige Form ist, die in langlebigen postmitotischen Zellen, wie Gehirnzellen, hauptsächlich exprimiert wird [14, 116]. Es wurden noch drei weitere Formen der *bcl-x* mRNA beschrieben, *bcl-x β* , *bcl-x γ* und *bcl-x Δ_{TM}* . Die *bcl-x β* mRNA, die in Mensch [117] und in Ratte [118] nachgewiesen wurde, entsteht aus einer ungespleißten prä-mRNA. Das Stop-Codon auf dieser RNA befindet sich im Intron 2 des *bcl-x* Gens bei Position 630 (siehe Abb.1.2.3.1.). Dem Bcl- $x\beta$ -Protein fehlt also der auf Exon3 liegende Teil der BH2-Domäne und die Transmembrandomäne. Durch Deletion von 70 bp in der carboxyterminale Region der *bcl-x $_L$* mRNA, also im kodierenden Bereich von Exon 3, erhält man die *bcl-x Δ_{TM}* mRNA, der die Transmembrandomäne fehlt. Sie konnte bisher nur in prä-B-Zellen von Mäusen



nachgewiesen werden [119]. Eine dritte bekannte Form, die *bcl-x γ* mRNA, wird aus Exon1, Exon2 und einem noch nicht näher beschriebenen Exon, das für eine ankyrinartige Domäne kodiert, zusammengesetzt. Auch bei Bcl-x γ fehlt, wie bei Bcl-x Δ_{TM} und Bcl-x β (siehe Abb. 1.2.3.1.), die Membrandomäne und der größte Teil der BH2-Domäne [120]. Die genaue Funktion der Bcl-x Spleißvarianten Bcl-x β , Bcl-x γ und Bcl-x Δ_{TM} ist bis jetzt noch nicht eindeutig aufgeklärt worden. Zwischen Exon1 und Exon2 des *bcl-x* Gens befindet sich ein 283bp langes, fakultatives Intron (siehe oben)[117]. Ein weiteres fakultatives Intron, das nur 86 bp lang ist, wurde in der humanen Promoterregion bzw. Exon1 entdeckt [103]. Da die Sequenz des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA bisher nicht entschlüsselt worden ist, kann man über die Bedeutung der Intronsequenzen im 5'-NTR des *bcl-x* Gens nur spekulieren. Die Spleißvarianten *bcl-x_L* und *bcl-x_S* sind mit der Pathogenese einer Vielzahl maligner Erkrankungen in Verbindung gebracht worden [20 – 29]. So entscheidet das Verhältnis zwischen Bcl-x_L und Bcl-x_S über eine gute oder schlechte Prognose bei der Chemotherapie bestimmter Krebserkrankungen [121].

1.3. Kontrolle der Genexpression und Apoptose

Die Genexpression wird in Eukaryonten auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Diese Ebenen umfassen die Transkription, die Polyadenylierung der RNA, das mRNA-Spleißen, den Export der reifen mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma und den gezielten Abbau der RNA. Die wesentlichen, für die Regulation der Transkription apoptoserelevanter Gene wirksamen Faktoren sind in den vorhergehenden Kapiteln besprochen worden. Für die Gene *FGF2* [128], *WT1* [129], *c-myc* [130], *n-myc* [131], *p53* [132], *β -globin* [133] und *bcl-2* [134, 135] wurden natürlich vorkommende antisense RNAs identifiziert und für die antisense RNA von *bcl-2-IgH* konnte ein Einfluß auf die Expression nachgewiesen werden und [134, 135]. Durch Transfektion der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen die *bcl-2-IgH* antisense RNA, also Sinn-Oligonukleotiden, konnte die Expression von Bcl-2 sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene gehemmt werden [134]. Der genaue Mechanismus der Wirkung zellulärer antisense RNAs auf die Expression ist noch nicht aufgeklärt worden, er könnte aber eine weitere Kontrollebene für die Genexpression in Eukaryonten darstellen.

Die Auslösung der Apoptose ist von der Menge an pro- und antiapoptotischen Proteinen abhängig. Überwiegt in dem Moment, in dem die Zelle einen apoptotischen

Impuls erhält, die relative Menge an antiapoptotischen Proteinen, so kann die Apoptose nicht ausgelöst werden. Für die Einleitung der Apoptose ist es daher zwingend notwendig, daß das Mengenverhältnis von proapoptotischen zu antiapoptotischen Proteinen in sehr kurzer Zeit verändert werden kann. Die Regulation auf Ebene der Transkription ist für die grundsätzliche Regulation der Expression eines bestimmten Gens ausreichend. Sie ist aber zu langsam, um die Reaktion der Zelle auf veränderte extrazelluläre Bedingungen zu ermöglichen. Die schnelle Reaktion einer Zelle auf extrazelluläre Stimuli kann durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung von Proteinen und die proteolytische Aktivierung von Zymogenen vermittelt werden (siehe Abschnitt 1.1., 1.1.1., 1.1.2. und gängige Lehrbücher der Biochemie).

In den letzten Jahren erwies sich die Kontrolle der Expression auf Translationsebene als ein regulatorischer Schlüsselmechanismus für die Steuerung der eukaryonten Genexpression [136]. Die Zelle kann auf dieser Kontrollebene sehr schnell auf veränderte extrazelluläre Bedingungen reagieren und große Mengen eines bestimmten Proteins aus einer vorhandenen mRNA synthetisieren. Für verschiedene Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormonrezeptoren, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, Komponenten des Translationsapparates und für Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose wie das antiapoptotische Bcl-2 [140], das proapoptotische Bax [141], den Tumorsuppressor p53 [141], das p53-Kontrollprotein Mdm2 [142] oder den Todesrezeptor FAS/Apo1/CD95 [143] wurde eine translationskontrollierte Expression nachgewiesen (Review: [137]). Die mRNAs, die für Gene kodieren, deren Expression unter Translationskontrolle steht, zeichnen sich meist durch eine auffällige Struktur aus. Der 5'-NTR der meisten mRNAs ist normalerweise zwischen 10 N und 200 N lang [138, 139]. Etwa zwei Drittel der mRNAs, die für Protooncogene oder Faktoren kodieren, die an der Zellteilung beteiligt sind, haben 5'-NTRs, die länger als 200 N sind und/oder mehr als ein Startkodon enthalten. Die bisher bekannten Mechanismen, durch die der 5'-NTR einer mRNA die Initiation der Proteinbiosynthese beeinflussen kann, werden am Beispiel verschiedener apoptoserelevanter Gene in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

1.3.1. Regulation der Translation durch lange, strukturierte 5'-NTRs

GC-reiche Sequenzen und stabile Sekundärstrukturen im 5'-NTR einer mRNA können die CAP-abhängige Initiation der Proteinbiosynthese nach dem „ribosome scanning“ Modell sehr effizient inhibieren. Der „Scanning“ Prozess erfordert die Bindung

des eukaryonten Initiationsfaktors 4E (eIF4E) an das ⁷Methyl-G CAP der mRNA und das Aufschmelzen der Sekundärstruktur durch die Helicase eIF4A [136]. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Haarnadelstruktur, die eine freie Energie von 30 – 70 kcal./mol hat und sich im 5'-NTR einer mRNA befindet, die Translation wirksam inhibieren kann. So konnte auch gezeigt werden, daß mRNAs mit einem derart strukturierten 5'-NTR nur sehr schwach translatiert werden. Die Translation des p53-Inhibitors Mdm2 (siehe Abschnitt 1.1.1.) wird durch einen langen, strukturierten 5'-NTR reguliert. Das *mdm2* Gen hat zwei Promotoren: Der eine Promoter liegt stromaufwärts vom Gen und aktiviert konstitutiv die Transkription und der zweite Promoter liegt im ersten Intron des *mdm2* Gens und wird durch p53 über p53-Bindungsstellen reguliert [36, 144]. Der 5'-NTR der vom p53 abhängigen Promoter aus transkribierten *mdm2* mRNA ist 68 N lang, während der 5'-NTR der *mdm2* mRNA, die vom weiter stromaufwärts gelegenen Promoter konstitutiv transkribiert wird, 300 N lang ist. Die Translationseffizienz der *mdm2* mRNA, die den 68 N langen 5'-NTR trägt, ist ca. 8 mal höher als die der mRNA mit dem 300 N langen 5'-NTR [144]. So führt eine Überexpression von p53 zu einer verstärkten Translation von Mdm2, die einen verstärkten Abbau von p53 in der Zelle zur Folge hat [31].

1.3.2. Regulation der Translation durch strangaufwärts gelegene offene Leserahmen (uORFs)

Das „ribosome scanning“ Modell der Translationsinitiation besagt, daß die Proteinsynthese am 5'-proximalen Startkodon beginnt [145]. Es existiert eine Reihe von mRNAs mit langen 5'-NTRs, die ein oder mehrere zusätzliche Startkodons stromaufwärts vom ersten Startkodon des kodierenden Bereichs, oder ein oder mehrere uORFs enthalten, die auf die Translation des stromabwärtsliegenden kodierenden Region inhibierend wirken [137]. Das *bcl-2* Gen enthält zwei Promoterregionen, wobei 95% aller Transkripte vom weiter stromaufwärts gelegenen Promoter aus transkribiert werden und einen über 1000 N langen 5'-NTR haben [11], während die restlichen 5% der Transkripte von einem sehr nah am Startkodon der *bcl-2* mRNA gelegenen Promoter aus transkribiert werden und einen 80 N langen 5'-NTR haben [146]. Die Untersuchung des Effektes, den der lange 5'-NTR der *bcl-2* mRNA auf die Translation hat, ergab, daß sich zwischen Position -119 und -84 ein uORF befindet, der für ein elf Aminosäuren langes Peptid kodiert. Deletion dieses uORF aus dem 5'-NTR der *bcl-2* mRNA und Deletion des Startkodons führte zu einer 5 – 7 fachen Zunahme der Expression eines Reportergens *in vitro* und *in vivo* [136, 140]. Die Trans-

lation der mRNA, die für das proapoptotische Bax kodiert, und die Translation der mRNA des Todesrezeptors CD95/Fas/Apo1 werden ebenfalls durch uORFs im 5'-NTR der jeweiligen mRNA kontrolliert [137, 141].

1.3.3. Regulation der Translation durch interne Ribosomeneintrittsstellen (IRES)

Ursprünglich wurde die interne Initiation der Translation bei Picornaviren entdeckt, deren mRNAs keine ⁷methyl-G CAP-Struktur und einen ca. 1000 N langen, strukturierten 5'-NTR haben, der zudem eine hohe Anzahl an uORFs enthält und somit eine Initiation der Translation nach dem „ribosome scanning“ Modell nicht erlaubt [147]. Ähnlich strukturierte 5'-NTRs wurden auch in der RNA verschiedener anderer Viren, wie dem Hepatitis C Virus (HCV) [148] oder dem Encephalomyocarditisvirus (ECMV) [149], entdeckt. Im 5'-NTR einiger zellulärer mRNAs von Eukaryonten, wie der *Antp* mRNA [150], der *VEGF* mRNA [151], der *FGF-2* mRNA [152], der *BiP* mRNA [153, 154], der *PDGF2/c-sis* mRNA [155], eIF4G mRNA [156] und der *c-myc* mRNA [157] konnten ebenfalls eine oder mehrere IRES nachgewiesen werden. Diese zellulären mRNAs haben vier Eigenschaften gemeinsam: Sie kodieren für ein oder mehrere Proteine, die von unterschiedlichen Transkriptionsstartstellen aus synthetisiert werden [157], wobei für gewöhnlich das stromaufwärts vom AUG-Startkodon gelegene Startkodon ein CUG-Triplett ist [152, 158]. Die 5'-NTRs unterdrücken die Translation des stromabwärts gelegenen Cistrons *in vitro* aber normalerweise nicht *in vivo*. Sie werden entweder CAP-abhängig translatiert und die translationale Repression des 5'-NTR wird in eIF4E überexprimierenden Zellen aufgehoben [136, 159] oder sie enthalten eine IRES, die eine CAP-unabhängige Translation ermöglicht [136, 150-157].

Die strukturellen Voraussetzungen, die der 5'-NTR einer mRNA erfüllen sollte, um den internen Eintritt von Ribosomen zu ermöglichen, wurden am Beispiel der IRES-Elemente aus *BiP* mRNA, *FGF-2* mRNA und den RNAs aus Picornavirus, Pestivirus und HCV ermittelt [160]. Eine Sequenz die die Ausbildung einer Y-förmigen Haarnadelstruktur ermöglicht, die von einer einfachen, direkt vor dem ersten Startkodon der kodierenden Region befindlichen Haarnadelstruktur gefolgt wird, ist das gemeinsame Strukturmotiv der oben genannten mRNAs [160]. Es wurde postuliert, daß diese Struktur eine allgemeine Funktion im Ribosomenbindungsmechanismus der zellulären mRNAs hat [160]. Allerdings konnte diese Vermutung bisher nicht durch experimentelle Beweise gestützt werden, da zum Beispiel die 5'-NTRs der

PDGF mRNA [155], der *c-myc* mRNA [157] oder der *VEGF* mRNA nach computergestützten Strukturvorhersagen eine völlig andere Struktur haben [147]. Für die Funktion der IRES im 5'-NTR der RNA von Picornaviren oder Cardioviren ist die Anwesenheit einer Polypyrimidinregion, die im Durchschnitt eine Länge von 15 N hat, eine wesentliche Voraussetzung [147]. Von den zellulären mRNAs beinhaltet nur die IRES der *eIF4G* mRNA eine Polypyrimidinregion, die 12 N lang und zur Translation dieser mRNA zwingend notwendig ist [161]. Ansonsten hat die IRES der *eIF4G* mRNA, bis auf die Fähigkeit zur Bildung extremer Sekundärstrukturen und die Polypyrimidinregion, wenig Ähnlichkeit mit der viralen IRES. Durch die Ausbildung der Sekundärstrukturen wird allerdings das 5'-Ende der mRNA, das bei zellulären mRNAs immer eine ⁷methyl-G CAP-Struktur hat, in die direkte Nachbarschaft des Startkodons der mRNA gebracht. An der IRES abhängigen Initiation der Translation sind in Picornaviren und Cardioviren zwei *trans*-wirkende Faktoren beteiligt, PTB (polypyrimidine tract binding protein) und das La-Autoantigen [162, 163, 164, 165, 166]. Die *trans*-wirkenden Faktoren PTB und La werden nicht für die interne Initiation der Translation zellulärer mRNAs benötigt [154, 158]. Es wird in diesem Zusammenhang diskutiert, ob Proteine wie PRB und La die Aufgabe von Chaperonen übernehmen, die die Sekundärstruktur der IRES aufrechterhalten, da eine Wechselwirkung mit den Initiationsfaktoren der Proteinbiosynthese bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte [147, 149]. Die Initiation der Translation durch internen Ribosomeneintritt erfordert die gleichen zellulären Faktoren, wie die Initiation der Translation nach dem „ribosome scanning“ Modell, die eukaryonten Initiationsfaktoren eIF4A, eIF4B, eIF4F (= eIF4E + eIF4G + eIF4A), eIF3 und eIF4E [137, 147]. Infolge einer Infektion der Zelle durch Entero- und Aphotoviren wird eIF4G proteolytisch gespalten, wobei die C-terminale Hälfte, an die eIF3, eIF4A und die mRNA binden, von der N-terminalen Hälfte, die eIF4E bindet, getrennt wird. Ohne eIF4E, der die ⁷methyl-G CAP-Struktur der mRNA bindet, ist eine CAP-unabhängige Initiation der Translation durch internen Ribosomeneintritt möglich, nicht aber die CAP-abhängige Translation [147].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Dem Bcl-x_L Protein kommt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese verschiedener maligner Erkrankungen zu. Es wird in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert und kann durch seine antiapoptotische Wirkung eine multiple Resistenz gegen Cytostatika bewirken [20 – 24]. Seine Expression kann durch apoptoseauslösende Agenzien [25 – 30], einige Cytokine und andere Faktoren [121 – 127] induziert werden. In einer Zelle, die Bcl-x_L überexprimiert, kann die Apoptose als Antwort auf DNA-Schädigungen oder einen anomalen Zellzyklus gar nicht oder nur unter größten Schwierigkeiten ausgelöst werden [10 – 19]. Als Folge der DNA-Schäden bzw. des anomalen Wachstums akkumulieren Mutationen im Genom dieser Zelle, die zum Teil einen Selektionsvorteil für die Zelle darstellen.

In letzter Zeit konnte gezeigt werden, daß es neben der „klassischen“ Steuerung der Transkriptionsaktivität weitere Kontrollebenen für die Genexpression gibt. So konnte nachgewiesen werden, daß die Expression einiger apoptoserelevanter Gene, wie *mdm2*, *p53*, *fas/CD95/apo1* und *bcl-2* auf der Ebene der Translation kontrolliert wird [136 – 147]. Für die Gene *FGF2* [128], *WT1* [129], *c-myc* [130], *n-myc* [131], *p53* [132], und *bcl-2* [134, 135] wurden zelluläre antisense RNAs identifiziert, die zum Teil einen Einfluß auf die Expression dieser Gene haben.

Die Struktur und die Sequenz des *bcl-x* Gens sind lediglich in Maus [101], nicht aber in *homo sapiens* aufgeklärt worden. Vom 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens ist ein Bereich von 1011 bp Länge sequenziert worden [103], dem eine Promoteraktivität zugesprochen wird [101, 107], die allerdings nicht mit den in [25 – 30] und [121 – 127] genannten Agenzien überprüft worden ist. Es sind verschiedene Spleißvarianten des kodierenden Bereichs der *bcl-x* mRNA identifiziert worden [115 – 120], aber es wurden weder ihre vollständige Sequenz noch ihr Transkriptionsstart aufgeklärt. So konnte in Unkenntnis der Struktur und der vollständigen Sequenz des humanen *bcl-x* Gens bzw. der *bcl-x* mRNA kein Mechanismus zur Kontrolle der Bcl-x Expression formuliert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung von Mechanismen zur Regulation der Expression des antiapoptotischen Bcl-x_L.

Zur Formulierung eines- oder mehrerer möglicher Kontroll- bzw. Regulationsmechanismen der Bcl-x Expression mußten die im folgenden aufgeführten experimentellen Problemstellungen gelöst werden:

- a.) Aufklärung der Struktur des humanen *bcl-x* Gens und der Sequenz der für die Kontrolle der Transkription relevanten Bereiche des Gens.
 - b.) Aufklärung der Struktur und der vollständigen Sequenz der *bcl-x_L* mRNA, Lokalisierung verschiedener Transkriptionsstartpunkte und Identifizierung möglicher weiterer Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA.
 - c.) Nachweis einer zellulären *bcl-x* antisense RNA und im Erfolgsfall Aufklärung ihres Einflusses auf die Expression des *bcl-x* Gens.
 - d.) Identifizierung von Sequenzabschnitten im 5'-NTR der *bcl-x* mRNA, die möglicherweise die Translation beeinflussen und im Erfolgsfall Charakterisierung eines Mechanismus der Translationskontrolle des humanen *bcl-x* Gens.
-