

## 2. ERGEBNISSE

### 2.1. Struktur des *bcl-x* Gens

Die Struktur und die Sequenz von Exon 1, 2 und 3, von Intron 1 und einem Teil des 5'-nichtkodierenden Bereiches (5'-NCR) des *bcl-x* Gens der Maus ist vor einiger Zeit aufgeklärt worden [101]. Vom humanen *bcl-x* Gen waren nur die Sequenz des kodierenden Bereiches der *bcl-x* mRNA sowie ein relativ kurzer Bereich der 5'-NCR bekannt [115 – 120 und 103]. Die in Abschnitt 2.1.1. beschriebene computergestützte Analyse der publizierten Sequenzen des 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens zeigt, daß diese Sequenzen nicht übereinstimmen. Außerdem konnte durch die computergestützte Sequenzanalyse ein antisense ORF im 5'-NCR des *bcl-x* Gens identifiziert werden. Die Struktur des humanen *bcl-x* Gens wurde durch Restriktionsanalysen der genomischen DNA verschiedener Kulturzellen erstellt (siehe 2.1.2.). Durch diese Restriktionskartierung des *bcl-x* Gens konnte gezeigt werden, daß das humane *bcl-x* Gen, wie das *bcl-x* Gen der Maus, eine stark konservierte Struktur hat, die aus drei Exons besteht. Um die „korrekte“ Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens zu bestimmen, wurde die Sequenz des 5'-NCR, von Exon 1, 2 und 3 sowie von Intron 1 des humanen *bcl-x* Gens entschlüsselt (siehe 2.1.3.). Die hier ermittelte Sequenz des 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens enthält die von Inohara et al. [103] veröffentlichte Sequenz.

#### 2.1.1. **Computergestützte Analyse der Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens**

Die zwei veröffentlichten Sequenzen [101, 103] des 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens wurden einer computergestützten Sequenzanalyse unterzogen. Diese Analyse zeigte, daß die von Grillot und Nuñez 1997 aufgeführte Sequenz für den 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens nicht mit der von Inohara und Ohta 1994 ermittelten Basensequenz des 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens übereinstimmt (siehe Abb. 2.1.1.1.). Außerdem konnte hier gezeigt werden, daß im Promoterbereich des *bcl-x* Gens ein offener Leserahmen in antisense Orientierung existiert, der eine Länge von 623 bp hat und damit für ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 22,84 kD kodiert. Die von Fujio und Kishimoto 1997 beschriebene GAS-Sequenz im 5'-NCR des *bcl-x* Gens [107] konnte zwischen Position -321 und -331 strangaufwärts vom Startkodon der *bcl-x* mRNA lokalisiert werden. Das GAS-Element liegt auf einer Intronsequenz, die sich

---

von Position –113 bis –402 im 5'-NTR des *bcl-x* Gens erstreckt und bei der humanen *bcl-xβ* mRNA [117] herausgespleißt ist. Der von Inohara und Ohta postulierte Transkriptionsstart für die *bcl-x* mRNA in Daudi-Zellen [103] und der von Nuñez et al. 1997 [101] beschriebene Transkriptionsstart liegen möglicherweise strangaufwärts von diesem GAS-Motiv. Da der Transkriptionsstart eines Gens im allgemeinen strangabwärts von den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren liegt, muß der mögliche Transkriptionsstart einer cytokinabhängig exprimierten *bcl-x* mRNA relativ nah am Startkodon des kodierenden Bereiches des *bcl-x* Gens liegen. Ein weiteres GAS-Motiv konnte innerhalb der kodierenden Region des *bcl-x* Gens zwischen Position +48 und +60 lokalisiert werden.

Abb.2.1.1.1:

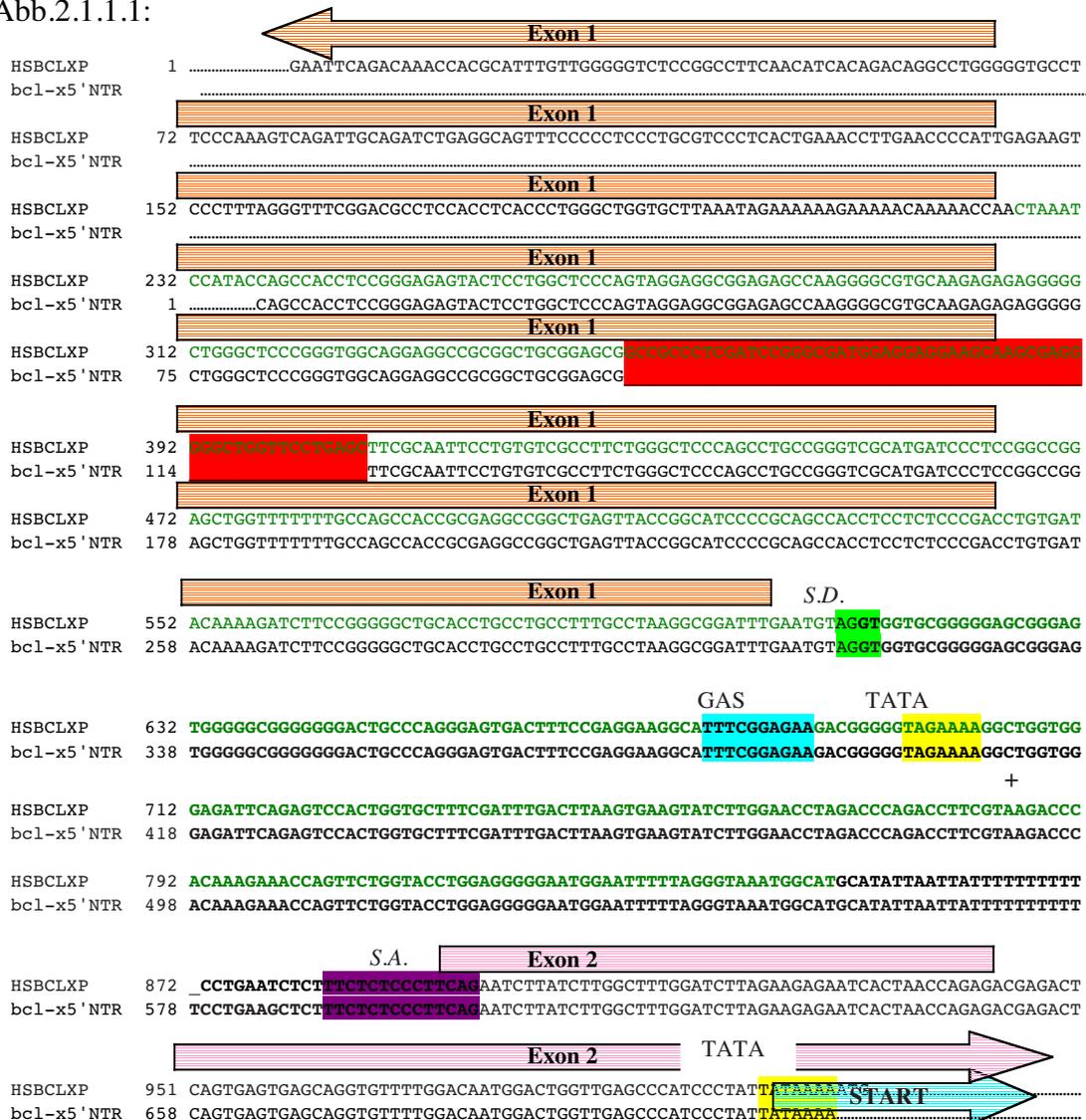
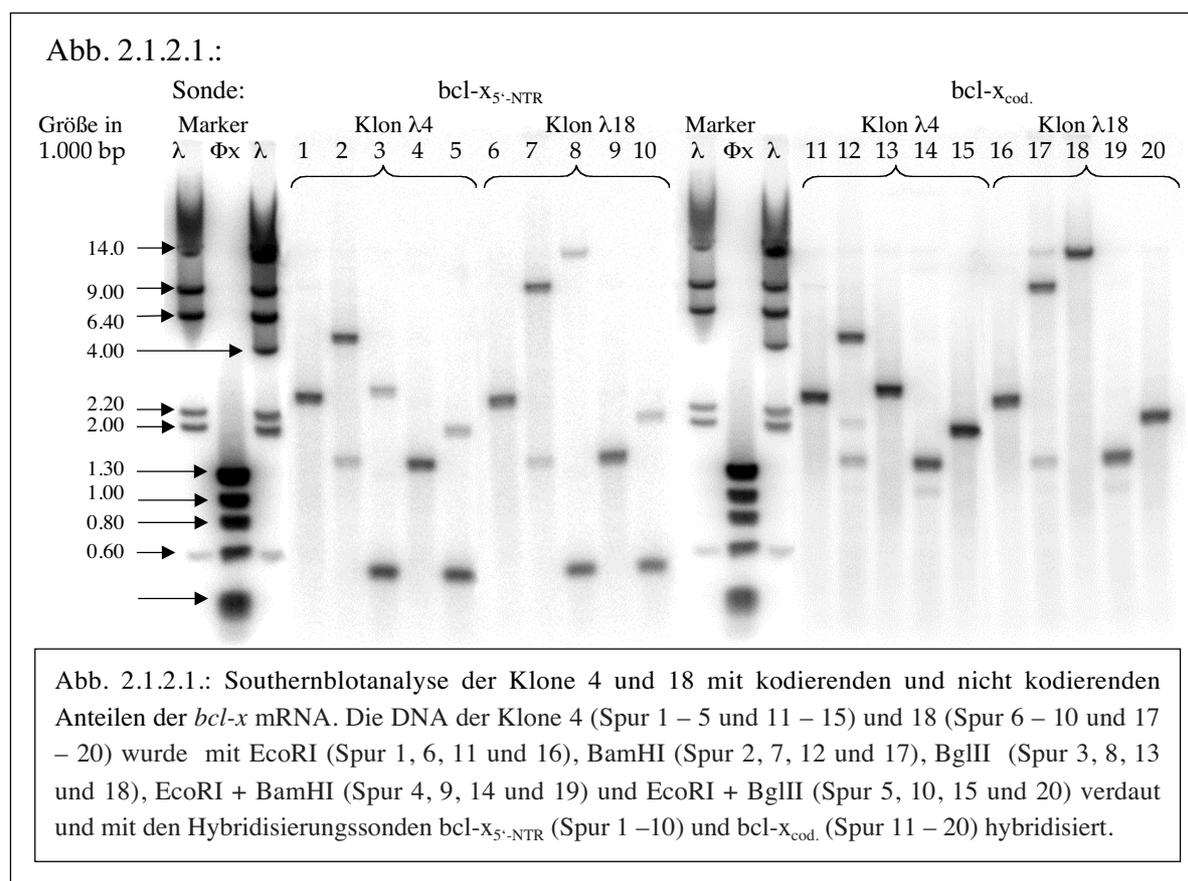


Abb. 2.1.1.1.: Alignment der publizierten Sequenzen des 5'-nichttranslatierten Bereichs des humanen *bcl-x* Gens [101, 103]. Die nicht übereinstimmenden Abschnitte der beiden Sequenzen sind rot, das GAS-Motiv türkis, TATA-Boxen gelb, Spleißdonorstellen hellgrün und die Spleißakzeptorstelle violett unterlegt. Intron 1 ist durch fettgedruckte Lettern- und der offene Leserahmen in antisense-Orientierung durch grüne Buchstaben dargestellt. Exon 1 und Exon 2 sind durch hellorange- bzw. hellrosa Balken oberhalb der Sequenz dargestellt.

## 2.1.2. Restriktionskartierung des *bcl-x* Gens

Um die tatsächliche Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens zu ermitteln, wurde eine  $\lambda$ -DNA-Bank durchsucht, die aus der genomischen DNA peripherer Blutzellen von vier gesunden Spendern erzeugt wurde. Als Hybridisierungssonde wurden hier zum einen die radioaktiv markierte cDNA des kodierenden Bereichs der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA (*bcl-x<sub>cod</sub>*) und zum anderen die mit [<sup>32</sup>P] markierte cDNA des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA (*bcl-x<sub>5'-NTR</sub>*; siehe Abschnitt 2.2.1.) verwendet. Zwei Klone, die sowohl mit der kodierenden Region als auch dem 5'-NTR der *bcl-x* mRNA spezifisch hybridisierten, konnten isoliert werden. Die DNA der Klone  $\lambda 4$  und  $\lambda 18$  wurde mit verschiedenen Endonukleasen verdaut und im Southernblot analysiert. Als Hybridisierungssonde dienten hier wieder der 5'-NTR und der kodierende Bereich der *bcl-x* mRNA. Die Ergebnisse der Southernblotanalyse sind in Abb. 2.1.2.1. dargestellt.



Die Größe der im Southernblot hybridisierenden DNA-Fragmente entspricht der Fragmentgröße, die die computergestützte Analyse der Sequenzen des 5'-NCR und der kodierenden Region des *bcl-x* Gens ergab. Vergleich der Southernblots von genomischer DNA aus Raji, Jurkat, U937, Namalwa – und K562-Zellen, die mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, BamHI und BglIII verdaut wurden, zeigten nach

Abb. 2.1.2.2.

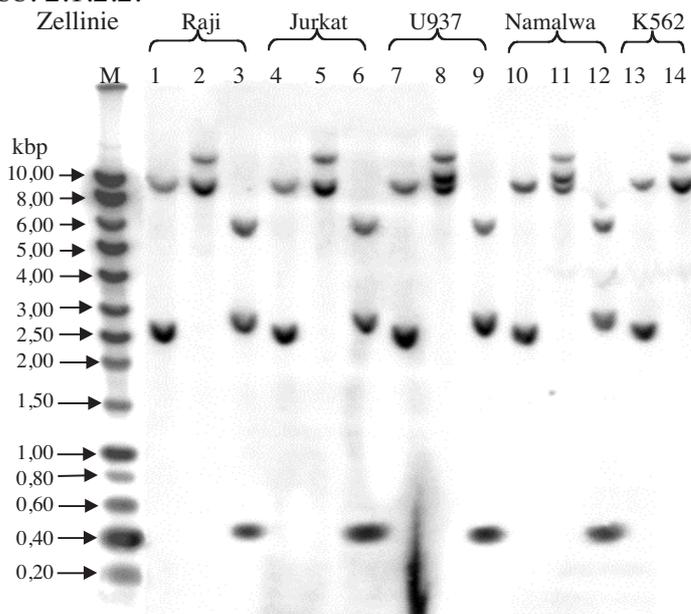


Abb. 2.1.2.2.; Southernblotanalyse von genomischer DNA aus verschiedenen humanen Zelllinien. Die genomische DNA aus den Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 wurde mit EcoRI (Spur 1, 4, 7, 10 und 13), BamHI (Spur 2, 5, 8, 11 und 14) und BglII (Spur 3, 6, 9 und 12) verdaut und mit den Hybridisierungssonden  $bcl-x_{cod.}$  und  $bcl-x_{5'NTR}$  hybridisiert.

Hybridisierung mit den Sonden  $bcl-x_{kod.}$  und  $bcl-x_{5'NTR(C11)}$  die gleichen Bandenmuster, wie die Southernblots der Klone  $\lambda 4$  und  $\lambda 18$  (siehe Abb. 2.1.2.2.). Im Bereich des ersten und zweiten Exons des *bcl-x* Gens sind in den oben genannten Zelllinien keine Mutationen festzustellen. Die mit BamHI verdaute genomische DNA der Zelllinien U937 und Namalwa weist im Southernblot eine zusätzliche Bande auf, die

Abb. 2.1.2.3.

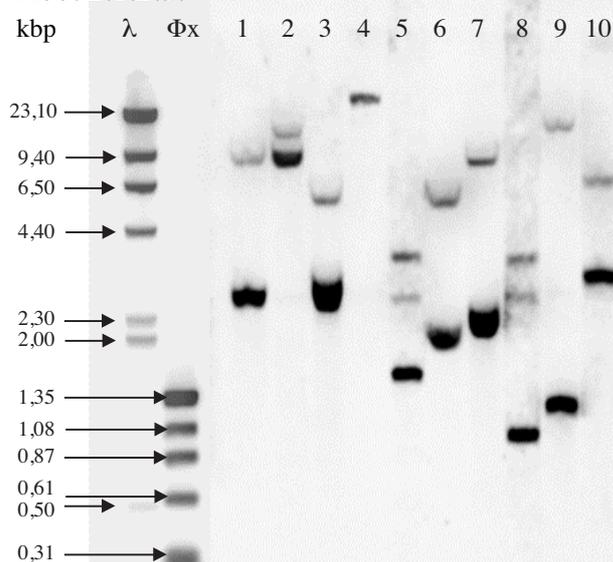


Abb. 2.1.2.3.: Southernblotanalyse von humaner genomischer DNA aus K562 Zellen. Die DNA wurde mit EcoRI (Spur 1), BamHI (Spur 2), BglII (Spur III), NotI (Spur 4), EcoRI/BamHI (Spur 5), EcoRI/BglII (Spur 6), EcoRI/NotI (Spur 7), BamHI/BglII (Spur 8), BamHI/NotI (Spur 9) und mit BglII/NotI (Spur 10) verdaut und mit der Hybridisierungssonde  $bcl-x_{cod.}$  hybridisiert.

auf eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für BamHI im 5'-Bereich des *bcl-x* Gens zurückzuführen ist. Diese zusätzliche BamHI-Schnittstelle ist wahrscheinlich auf eine Mutation zurückzuführen, die ca. 10 – 11 kbp vom Beginn der kodierenden Region des *bcl-x* Gens entfernt ist. Die schwachen Nebenbanden, die auf diesen Southernblots zu sehen sind, sind auf die relativ schwache Hybridisierung von Exon 3 des *bcl-x* Gens mit dem 3'-Ende der  $bcl-x_{kod.}$  Sonde zurückzuführen. Der Mehrfachverdau von genomischer DNA aus K562 Zellen mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, BamHI, BglII und NotI und anschlie-

---

ßende Southernblotanalyse ergab nach Hybridisierung mit der Sonde *bcl-x<sub>cod.</sub>* die in Abb. 2.1.2.3. dargestellten Bandenmuster. Die Größe der durch Verdau mit BamHI und NotI erzeugten Fragmente genomischer DNA zeigt, daß das zweite Intron des *bcl-x* Gens länger als 9kb ist.

### 2.1.3. Sequenz des 5'-NCR und von Exon 1, 2 und 3 des humanen *bcl-x* Gens

Mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, NotI, BglII und EcoRI fragmentierte DNA der Klone  $\lambda 4$  und  $\lambda 18$  wurde in den Klonierungsvektor pBluescriptIISK subkloniert und sequenziert. Die durch Analyse der überlappenden Sequenzen der Subklone ermittelte Sequenz wurde mit den oben genannten Sequenzen und den Sequenzen der *bcl-x* mRNA verglichen. Die Sequenz des 5'-nichtkodierenden Bereichs des *bcl-x* Gens in den Klonen  $\lambda 4$  und  $\lambda 18$  entspricht der Sequenz HSBCLXP [103] und nicht der von Grillot und Nuñez [101] veröffentlichten Sequenz (siehe Abb. 2.1.1.1.). Es konnten strangaufwärts vom Beginn der Sequenz HSBCLXP weitere 890 bp der 5'-nichtkodierenden Region des *bcl-x* Gens sowie ein Teil des zweiten Introns des humanen *bcl-x* Gens sequenziert werden. In diesen 890 bp konnten zahlreiche Sequenzmotive lokalisiert werden, die den Konsensussequenzen der Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Ets-1, AP2, AP4, HIP1, ETS1etc. entsprechen. Es wurden keine weiteren GAS-Sequenzmotive in der strangaufwärts gelegenen Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens gefunden. Es konnten keine kanonischen TATA- oder CAAT-Boxen in dem Bereich der 5'-nichtkodierenden Region des *bcl-x* Gens identifiziert werden, in dem eine Promoteraktivität nachgewiesen wurde [107]. Von Inohara und Ohta wird ein nichtklassisches TATA-Motiv mit der Sequenz TAGAAA beschrieben, das vor dem Haupttranskriptionsstart des *bcl-x* Gens bei Position -231 in DAUDI Zellen liegt [103]. Bei Position -801 konnte ein weiteres TAGAAA-Motiv identifiziert werden. Im Bereich von Position +1 bis -1300 befinden sich drei *Inr* Konsensusmotive (siehe Einleitung) und elf Bindungsmotive für den Transkriptionsfaktor HIP1, der die Transkription von Genen initiiert, die unter der Kontrolle von TATA-losen Promotoren stehen. Desweiteren konnten ein zusätzliches mögliches Intron im Bereich von -1380 bis -1510 identifiziert werden. Im gesamten 5'-nichtkodierenden Bereich des humanen *bcl-x* Gens konnten sechs Spleißdonor- und zwei Spleißakzeptorstellen identifiziert werden.

---

Abb. 2.1.3.1.

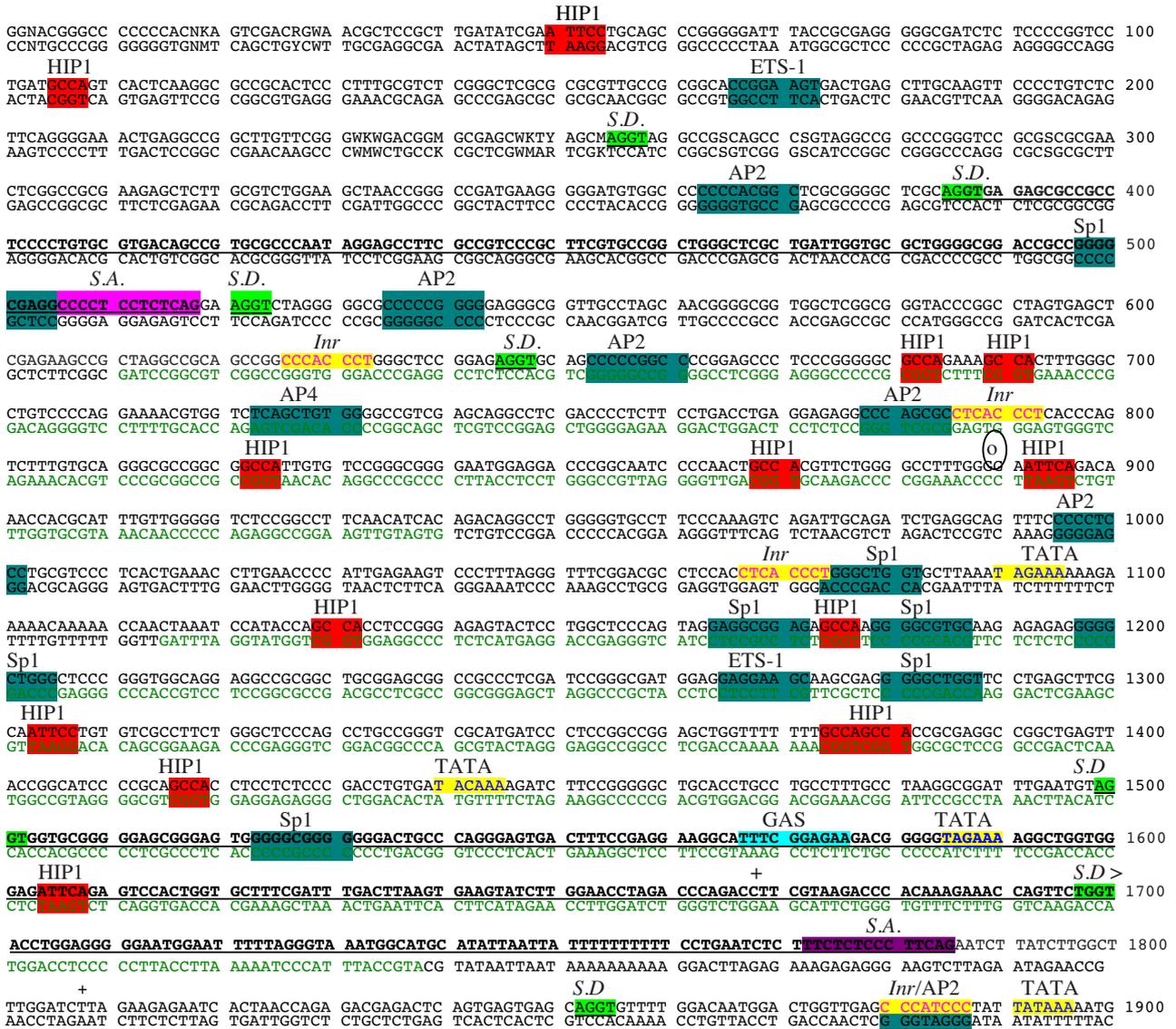


Abb.2.1.3.1.: Erweiterte Sequenz des 5'-NTR des *bcl-x* Gens, doppelsträngige Darstellung. Die Sequenz der offenen Leserahmen (ORFs) in antisense-Orientierung ist grün und Intronsequenzen sind fettgedruckt und unterstrichen dargestellt. Spleißakzeptorsequenzen sind rosa, Spleißdonorsequenzen hellgrün, die Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren SP1, AP2, AP4 und ETS-1 blaugrün, die Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor HIP1 rot und das *Inr* Konsensusmotiv, sowie TATA-Boxen gelb unterlegt. Die im Text genannte GAS-Sequenz ist türkis unterlegt. „O“ gibt den Beginn der Sequenz HSBCLXP an, während die verschiedenen Transkriptionsstarts durch „+“ markiert sind.

---

## **2.2. Struktur der *bcl-x* mRNA**

Von allen bekannten Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA sind bisher ausschließlich der kodierende Bereich oder nur sehr kurze Abschnitte des 5'-NTR sequenziert worden [14, 80, 115 – 121]. Verschiedene Transkriptionsstarts der *bcl-x* mRNA sind in Mauszellen und unvollständig in humanen K562 Zellen kartiert worden [101]. Die aus der Analyse des 5'-NCR des *bcl-x* Gens vorhersagbaren möglichen Spleißvarianten des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA und eine zelluläre *bcl-x* antisense RNA, die aus den in Abschnitt 2.1.1. und 2.1.3. beschriebenen antisense ORFs transkribiert werden kann, sind bisher nicht identifiziert worden. In Abschnitt 2.2.1. wird die Isolierung eines cDNA-Fragments beschrieben, das zum einen eine Spleißvariante des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA und zum anderen ein Fragment einer zellulären *bcl-x* antisense RNA darstellen kann. Das Durchsuchen verschiedener cDNA-Banken mit diesem cDNA-Fragment als Hybridisierungssonde führte zur Isolierung einer cDNA mit der vollständigen Sequenz der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA und zweier bicistronischer cDNA-Klone, deren erstes Cistron der Sequenz der kodierenden Region der *CtIP*- bzw. der *HLA-E* mRNA und deren zweites Cistron in beiden Fällen der vollständige Sequenz der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA entspricht. Die Sequenz des 5'-NTR der hier isolierten *bcl-x<sub>L</sub>* cDNA unterscheidet sich erheblich von der des als Hybridisierungs-sonde eingesetzten cDNA-Fragments und der Sequenz der intercistronischen Region der beiden bicistronischen *bcl-x<sub>L</sub>* cDNAs. Die Kartierung des Transkriptionsstarts in den humanen Kulturzellen Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 wird in den Abschnitten 2.2.3. und 2.2.4. beschrieben. Es konnten sechs unterschiedliche Transkriptionsstarts und mindestens drei unterschiedliche Spleißformen des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA identifiziert werden.

### **2.2.1. Isolierung eines mehrfach gespleißten cDNA-Fragments aus dem 5'-NCR des *bcl-x* Gens**

Um die mögliche Transkription einer antisense RNA im Promoterbereich des *bcl-x* Gens nachzuweisen und den Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA zu ermitteln, wurde mit den Primern BNX 874R und BNX 104L, die den oben beschriebenen offenen Leserahmen in antisense-Orientierung flankieren, aus der gesamt-RNA von Namalwa- und U937 Zellen eine RT-PCR durchgeführt. Das Hauptprodukt dieser PCR hatte nicht die erwartete Größe von ca. 700 bp, sondern war ca. 500 bp lang. Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenz des Klons Ct11 wurde mit der Sequenz des

---

Abb. 2.2.1.1.:

```

CT11s
HSBCLXP      1  GAATTCAGACAAACCACGCATTGTGTGGGGGTCTCCGGCCTTCAACATCACAGACAGGCCTGGGGGTGCCTTCCCAAAGT

CT11s
HSBCLXP      1  .....CCTTTAGG
HSBCLXP     81  CAGATTGCAGATCTGAGGCAGTTTCCCCCTCCTGCGTCCCTCACTGAAACCTTGAACCCCATTTGAGAAGTCCCTTTAGG

CT11s
HSBCLXP     9  GTTTCGGACGCCTCCACCTCACCTGGGCTGGTGCCTAAATAGAAAAAGAAAAACAAAACCAACTAAATCCATACCAG
HSBCLXP    161  GTTTCGGACGCCTCCACCTCACCTGGGCTGGTGCCTAAATAGAAAAAGAAAAACAAAACCAACTAAATCCATACCAG

CT11s
HSBCLXP     89  CCACCTCCGGGAGAGTACTCCTGGCTCCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGG  T  GGC  ___
HSBCLXP    241  CCACCTCCGGGAGAGTACTCCTGGCTCCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGGCTGGGCTCC

CT11s
HSBCLXP    164  _____AGGAGGAAGCAAGCAGGGGGCTGGTT
HSBCLXP    321  GGGGTGGCAGGAGGCCGCGGCTGCGGAGCGGCCCTCGATCCGGGCGATGGAGGAGGAAGCAAGCAGGGGGCTGGTT

CT11s
HSBCLXP    191  CCTGAGCTTCGCAATTCCTGTGTGCGCTTCTGGGCTCCCAGCCTGCCGGGTGCGATGATCCCTCCGGCCGAGCTGGTTT
HSBCLXP    401  CCTGAGCTTCGCAATTCCTGTGTGCGCTTCTGGGCTCCCAGCCTGCCGGGTGCGATGATCCCTCCGGCCGAGCTGGTTT

CT11s
HSBCLXP    271  TTTTGCAGCCACCGGAGGCCGGCTGAGTTACCGGCATCCCCGAGCCACCTCCTCTCCCGACCTGTGATACAAAAGAT
HSBCLXP    481  TTTTGCAGCCACCGGAGGCCGGCTGAGTTACCGGCATCCCCGAGCCACCTCCTCTCCCGACCTGTGATACAAAAGAT

CT11s
HSBCLXP    351  CTTCCGGGGGCTGCACCTGCCTGCCTTTGCCTAAGGCGGATTGAAT
HSBCLXP    561  CTTCCGGGGGCTGCACCTGCCTGCCTTTGCCTAAGGCGGATTGAATCTAGCTGGTGGGGGAGCGGGAGTGGGGGCGG

CT11s
HSBCLXP    398  _____
HSBCLXP    641  GGGGACTGCCAGGGAGTGACTTTCCGAGGAAGGCATTTCCGAGAAGACGGGGGTAGAAAAGGCTGGTGGGAGATTGAG

CT11s
HSBCLXP    398  _____
HSBCLXP    721  AGTCCACTGGTGCTTTTCGATTGACTTAAGTGAAGTATCTTGAACCTAGACCCAGACCTTCGTAAGACCCACAAAGAAA

CT11s
HSBCLXP    398  _____CT
HSBCLXP    801  CCAGTTCTGGTACCTGGAGGGGGAATGGAATTTTAGGGTAAATGGCATGCATATTAATTATTTTTTTTCTCTGAATCT

CT11s
HSBCLXP    400  CTTTCTCTCCCTTCAGAAATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAG.....
HSBCLXP    881  CTTTCTCTCCCTTCAGAAATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACAGAGACGAGACTCAGTGAGTGA

CT11s
HSBCLXP    961  GCAGGTGTTTTGGACAATGGACTGGTTGAGCCCATCCCTATTATAAAAATG.....

```

Abb. 2.2.1.1.: Alignment von Klon Ct11 gegen die Sequenz HSBCLXP (5'-NCR des *bcl-x* Gens). Intronsequenzen sind durch grüne Basensymbole (ATGC) gekennzeichnet und der offene Leserahmen in antisense Orientierung durch unterstrichenene Basensymbole. Die Spleißdonorstelle und die Spleißakzeptorstelle von Intron1 des *bcl-x* Gens sind grün –bzw. violett- und der Beginn der kodierenden Region türkis unterlegt.

5'-NCR des *bcl-x* Gens verglichen. Dieser Sequenzvergleich ergab, daß aus der Sequenz von Ct11 das 285 bp lange Intron 1, das von Ban und Nuñez [101, 117] beschrieben worden ist, herausgespleißt wurde. Die Intron-Exon Übergänge stimmen hier nicht mit den Konsensusmotiven für Spleißdonor –und Spleißakzeptorstellen überein. Weiter stromaufwärts ist aus der Sequenz von Ct11 ein weiteres kurzes Intron herausgespleißt worden, das auch keine klassischen Konsensusmotive für Spleißdonor –und Akzeptorstellen aufweist (siehe Abb. 2.2.1.1.). Das 5'-Ende der Sequenz von Ct11 liegt bei Position –637 relativ zum Translationsstart der *bcl-x* mRNA. Es kann sich hier also einerseits um eine antisense RNA handeln, die vom kodierenden Bereich des *bcl-x*

Gens aus transkribiert wird, oder um den 5'-NTR einer *bcl-x* mRNA, deren Startpunkt sehr weit strangaufwärts liegt.

Der Klon Ct11 wurde bei allen folgenden Experimenten als Hybridisierungsprobe eingesetzt ( $bcl-x_{5'-NTR/Ct11}$ ) und ergab im Northernblot die gleichen Hybridisierungsmuster wie eine Sonde, die spezifisch mit der kodierenden Region ( $bcl-x_{cod.}$ ) der *bcl-x* mRNA hybridisiert. Die Hybridisierungssignale der Sonde  $bcl-x_{cod.}$  waren etwa doppelt so stark wie die Signale der Sonde  $bcl-x_{5'-NTR/Ct11}$  (Daten hier nicht aufgeführt).

Beide Sonden hybridisierten im Northernblot mit der 2700N langen *bcl-x* mRNA [14, 80] und einer ca. 3600 N langen mRNA. Diese 3600 N lange mRNA wird besonders stark in Jurkat Zellen exprimiert, wo sie in gleicher Menge wie die 2700 N lange *bcl-x* mRNA exprimiert wird. (siehe Abb.2.3.1.1. im Abschnitt 2.3.1.)

### 2.2.2. Aufklärung der vollständigen Sequenz der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA und Isolierung von zwei bicistronischen *bcl-x* mRNAs

Um die Sequenz der 3600 N langen *bcl-x* verwandten mRNA zu ermitteln, wurde eine cDNA-Bank, die aus der mRNA von Jurkat-Zellen hergestellt worden war, mit der Hybridisierungsprobe  $bcl-x_{5'-NTR/Ct11}$  durchsucht. Um die vollständige Sequenz der 2700 N langen *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA, die Sequenz des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA und die Sequenz einer möglicherweise existierenden zellulären *bcl-x*-antisense RNA zu ermitteln, wurde eine cDNA-Bank, die aus der mRNA von Gesamtblutzellen hergestellt worden war, mit der Hybridisierungsprobe  $bcl-x_{5'-NTR/Ct11}$  durchsucht. Aus der Gesamtblut-cDNA-Bank konnten drei Klone (AIA, BIA, CIA) isoliert werden und aus der Jurkat-cDNA-Bank ein Klon (F4D). Eine Restriktionsanalyse ergab für den Klon AIA eine Länge von ca. 800bp, für den Klon BIA eine Länge von ca. 4000bp, für den Klon CIA eine Länge von ca. 2700bp und für den Klon F4D eine Länge von ca. 3600 bp. Der Klon CIA entspricht der vollständigen Sequenz der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA (siehe Abb.2.2.2.1.). Der 5'-NTR dieser cDNA ist 529 bp lang und entspricht der Sequenz des 5'-NTR (HSBCLXP) des *bcl-x* Gens, aus dem das erste, 285 bp lange Intron (siehe oben) herausgespleißt wurde. Die Sequenz der Intron-Exon Übergänge im Bereich des ersten Introns der *bcl-x(CIA)<sub>L</sub>* mRNA stimmt nicht mit der Sequenz der *bcl-x<sub>β</sub>* mRNA Intron-Exon Grenzen überein (siehe Abb. 2.2.2.1.). Der Transkriptionsstart dieser *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA liegt erheblich weiter strangaufwärts vom Startkodon der *bcl-x* mRNA als z.B. der für Daudi-, K562- oder humane Placenta beschriebene Transkriptionsstart [101, 117].

Abb.2.2.2.1.:

HSBCLXP	114	TGCGTCCCTCACTGAAACCTTGAACCCATTGAGAAGTCCCTTTAGGGTTTCGGACGCCTCCACCTCAC
bcl-x(Ct11)	1	.....CCTTTAGGGTTTCGGACGCCTCCACCTCAC
bcl-x(C1A)		
bcl-x(F4D)	595	AGTTTTTTCCTTCTTAGTTATTTATAGTTAAAGTTGGTACTAAACATTGATTTTTTTGATCTTCTGTAA
bcl-x(B1A)	1121	CCAGGGGTCTGAGTCTCACAGCTGTAAAGCTGAGACAGCTGCCTTGTGTGCGACTGAGATGCACAGC
HSBCLXP	184	CTGGGCTGGTGCCTAAATAGAAAAAGAAAAACAAAACCAACTAAATCCATACCAGCCACCTCCGGGA
bcl-x(Ct11)	32	CTGGGCTGGTGCCTAAATAGAAAAAGAAAAACAAAACCAACTAAATCCATACCAGCCACCTCCGGGA
bcl-x(C1A)	1	.....GTGCTTAAATAGAAAAAGAAAAA <b>RS</b> AMAAASCAACTAAATCCATACCAGCCACCTCCGGGA
bcl-x(F4D)	665	TGGATTTATAAATCAGTTTTCTATTGAAAATGTTTGTGATATTTTGCCTTTTGCACCTTTAAAAAATAA
bcl-x(B1A)	1191	GCCTTGTGTGCGACTGAGATGCAGGATTTCCTCACGCCCTCCCTATGTGTCTTAGGGGACTCTGGCTTC
HSBCLXP	254	AGTACTCCTGGCTCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGGCTGGGCTCCCG
bcl-x(Ct11)	102	AGTACTCCTGGCTCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGG <b>T</b> GGC
bcl-x(C1A)	63	AGTACTCCTGGCTCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGGCTGGGCTCCCG
bcl-x(F4D)	735	GCGCTTTCATTTTGCACCTCTAACTTAAGAGTTTTTACTTTATGTAGTGATACCTAATACAATTTTGAAA
bcl-x(B1A)	1261	CTTTTGTCAAGGGCCTCTGAATCTGTCTGTGTCCCTGTTAGCACAAATGTGAGGAGGTAGAGAAACAGTC
HSBCLXP	324	GTGGCAGGAGGCCGCGGCTGCGGAGCGGCCGCCCTCGATCCGGGCGATGGAGGAGGAAGCAAGC
bcl-x(Ct11)	164	.....AGGAGGAAGCAAGC
bcl-x(C1A)	133	GTGGCAGGAGGCCGCGGCTGCGGAGCGGSCGCCCTCGATCCGGGCGATGGAGGAGGAAGCAAGC
bcl-x(F4D)	805	TACAAAAAAGGCCGCGGCTGCGGAGCGGCCGCCCTCGATCCGGGCGATGGAGGAGGAAGCAAGC
bcl-x(B1A)	1331	ACGGCAGGAGGCCGCGGCTGCGGAGCGGCCGCCCTCGATCCGGGCGATGGAGGAGGAAGCAAGC
HSBCLXP	604	GAAT <b>GTAGGT</b> GGTGCGGGGGAGCGGGAGTGGGGGCGGGGGGACTGCCAGGGAGTGACTTTCCGAGGA
bcl-x(Ct11)	394	GAAT
bcl-x(C1A)	413	GAAT <b>A</b> .....GACTTTCCGAGGA
bcl-x(F4D)	1085	GAAT
bcl-x(B1A)	1611	GAAT
HSBCLXP	674	GGCATTTCGGAGAAGACGGGGGTAGAAAAGGCTGGTGGGAGATT <b>CA</b> GAGTCCACTGGTGCCTTCGATTT
bcl-x(Ct11)	398	.....
bcl-x(C1A)	432	GGCATTTCGGAGAAGACGGGGGTAGAAAAGGCTGGTGGGAGATT <b>CA</b>
bcl-x(F4D)	1089	.....
bcl-x(B1A)	1615	.....
HSBCLXP	744	ACTTAAGTGAAGTATCTTGAACCTAGACCCAGACCTTCGTAAGACCCACAAA <b>AAA</b> GAAACCAGTTCTGGTA
bcl-x(Ct11)	398	.....AAA
bcl-x(C1A)	481	.....
bcl-x(F4D)	1089	.....
bcl-x(B1A)	1615	.....
HSBCLXP	814	CTGGAGGGGAATGGAATTTTTAGGGTAAATGGCATGCATATTAATTATTTTTTTTTTCTGAATCTCT
bcl-x(Ct11)	398	.....CTCT
bcl-x(C1A)	491	.....
bcl-x(F4D)	1089	.....
bcl-x(B1A)	1615	.....
HSBCLXP	884	TC <b>TCTCCCTCA</b> AATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA
bcl-x(Ct11)	403	TCTCTCCCTCAGAATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAG.....
bcl-x(C1A)	491	.....AATCTTATTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA
bcl-x(F4D)	1089	.....AATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA
bcl-x(B1A)	1615	.....AATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA

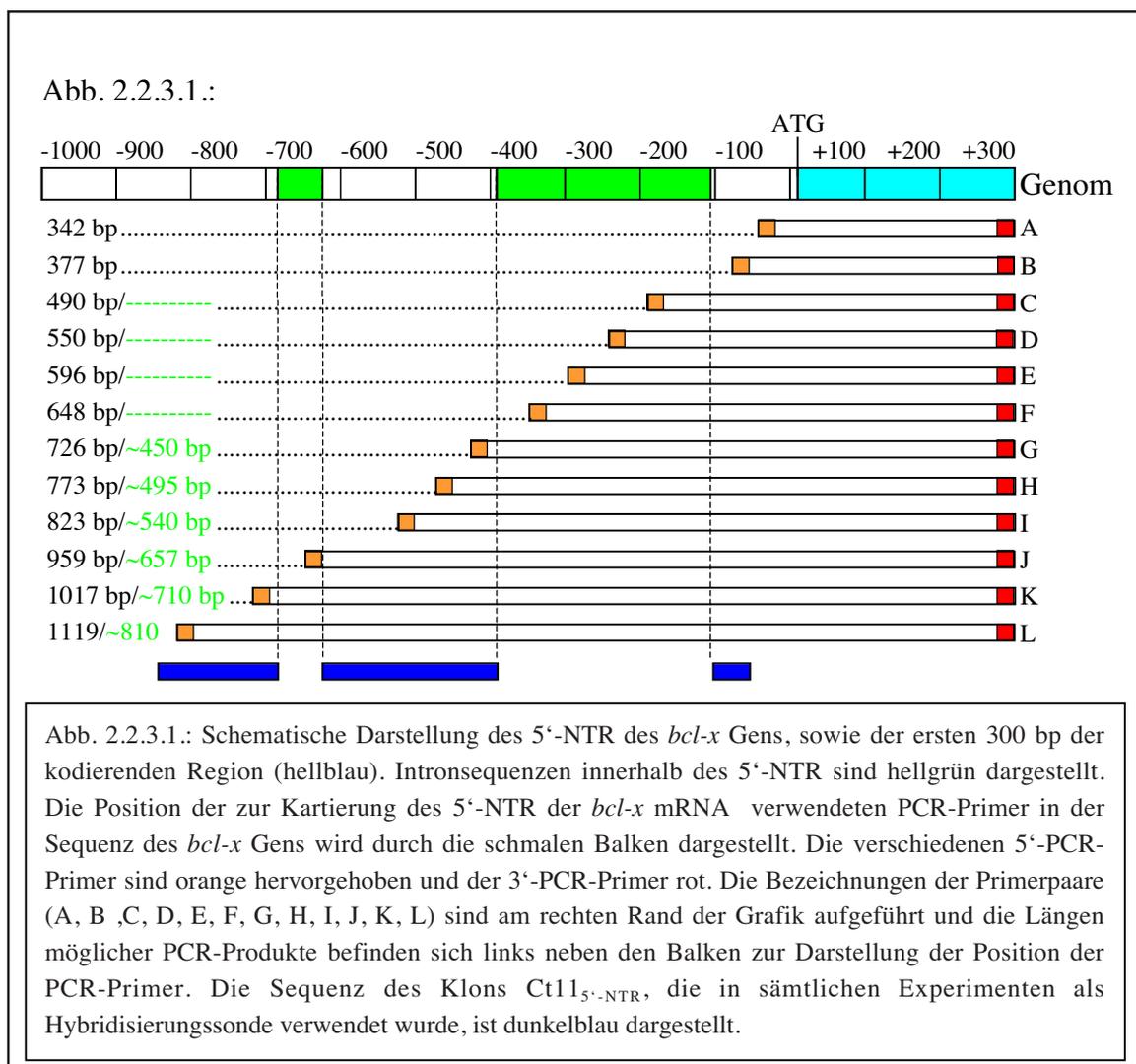
Abb. 2.2.2.1.: Multiples Alignment der cDNA-Sequenzen *bcl-x(Ct11)*, *bcl-x(C1A)*, *bcl-x(B1A)* und *bcl-x(F4D)* mit der Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens. Intronbereiche sind grün unterlegt, übereinstimmende Sequenzabschnitte durch rote Nukleotidsymbole (ACGT) gekennzeichnet, Spleißdonor - bzw. Akzeptorstellen sind türkis bzw. petrolfarben unterlegt. Ein Bereich von 215 bp Länge wurde aus Platzgründen aus der Darstellung entfernt. Dieser Bereich ist durch rote Trennstriche markiert.

Der Klon B1A entspricht der vollständigen *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA, also Klon CIA, an deren 5'-Ende der kodierende Bereich der *HLA-E1A (MHC-1b)* mRNA gespleißt wurde. Der Klon F4D besteht, genau wie CIA, aus der Gesamtsequenz der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA, an deren

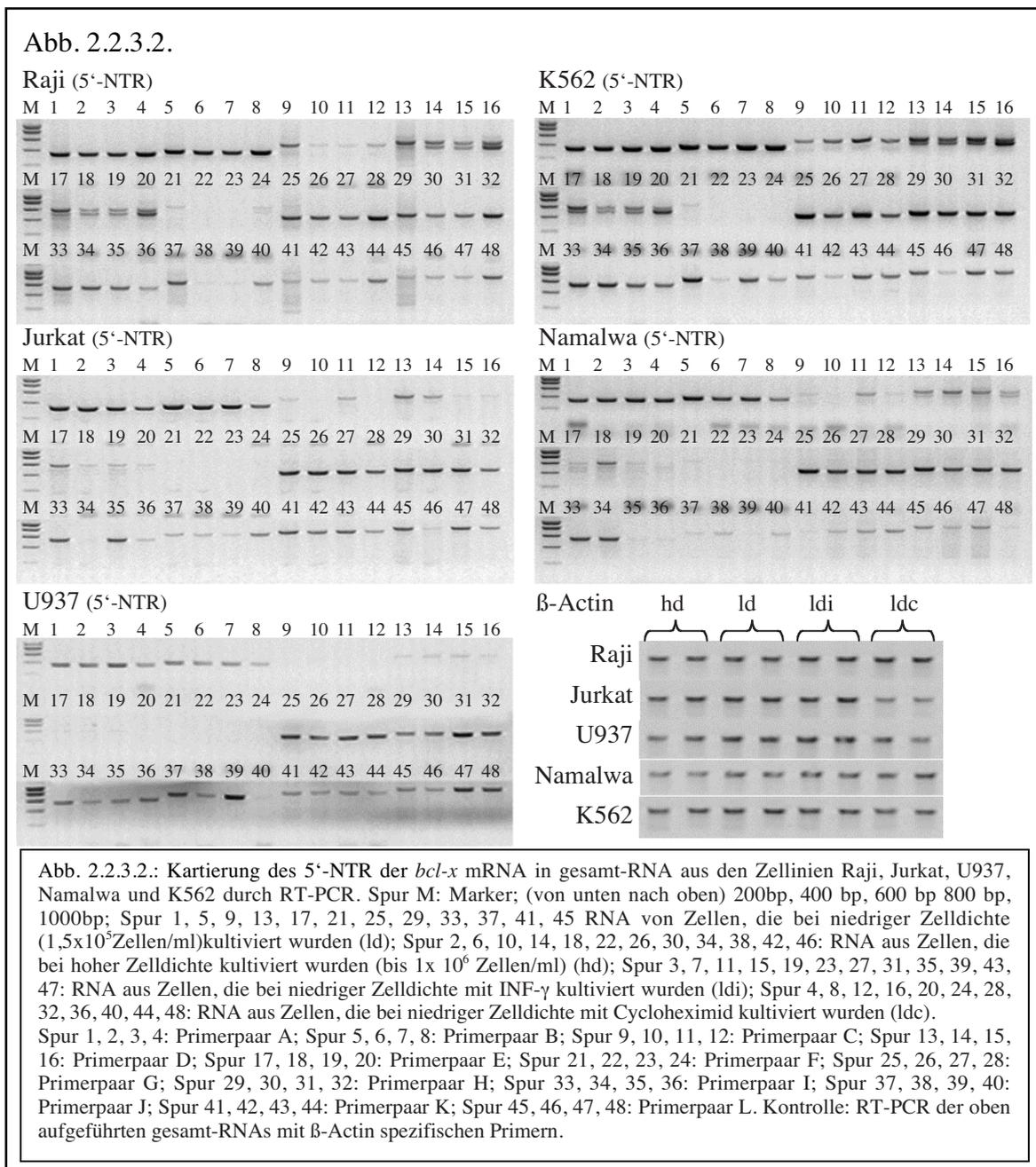
5'-Ende der kodierende Bereich der *CtIP* mRNA gespleißt wurde. Durch Hybridisierung von cDNA-Banken mit Ct11 wurden zwei bicistronische mRNAs isoliert. Die Spleißstelle, an die in den Sequenzen B1A und F4D die MHC-1b bzw. die CtIP/RIM mRNA mit der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA gespleißt wurde, ist in beiden Klonen bis auf 5 Basenpaare identisch (siehe Abb. 2.2.2.1.). Da die beiden cDNA-Klone aus zwei verschiedenen cDNA-Banken isoliert wurden, ist es daher auszuschließen, daß es sich bei den beiden hier isolierten cDNA-Klonen um einen Klonierungsartefakt handelt.. Es wurde eine weitere, ca. 800 bp lange Sequenz, A1A, isoliert, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Sequenz der 5'-nichttranslatierten Region des *bcl-x* Gens aufweist, aber von Sequenzen flankiert wird, die keinerlei Verwandtschaft zu anderen bekannten Sequenzen aufweist.

### 2.2.3. Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens durch RT-PCR

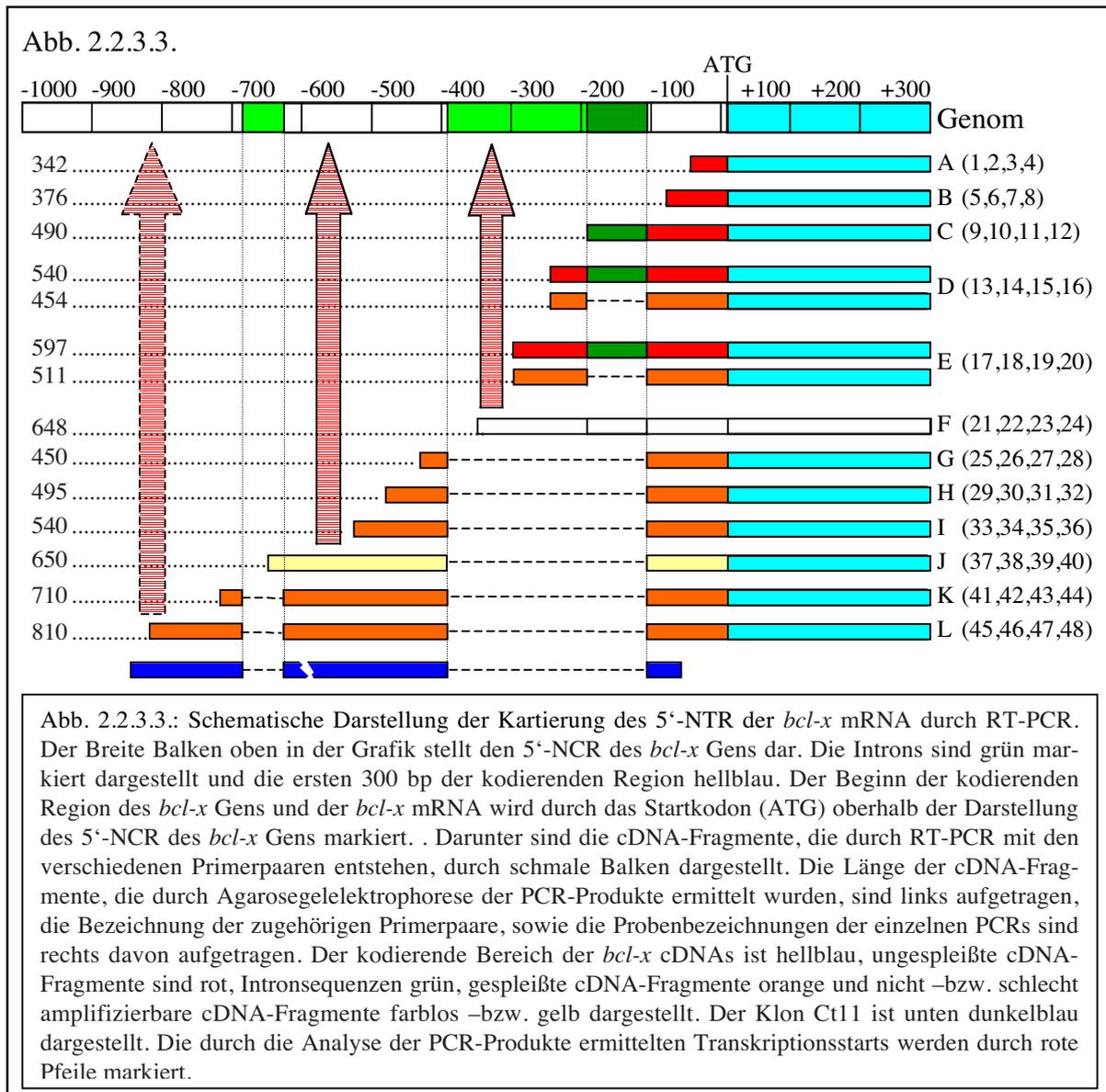
Die Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens wurde mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt (Bedingungen: Siehe Anhang). Die PCR-Primer wurden so ausgewählt, daß sie eine Entfernung von 40 – 100 bp voneinander hatten, und zum Teil auch in den



Intronsequenzen der 5'-NCR des *bcl-x* Gens lagen (siehe Abb. 2.2.3.1.). Um in den untersuchten Zellen den Einfluß der Wachstumsbedingungen auf die Wahl des Transkriptionsstarts der *bcl-x* mRNA zu kontrollieren, wurde die RT-PCR zur Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens mit RNA durchgeführt, die aus Raji-, Jurkat-, U937-, Namalwa- und K562 Zellen isoliert wurde, die bei hoher Zelldichte (hd), niedriger Zelldichte (ld), niedriger Zelldichte unter Einfluß von  $\text{INF-}\gamma$  (ldi), niedriger Zelldichte unter Einfluß von Cycloheximid (ldc) und niedriger Zelldichte unter Einfluß von Cycloheximid und  $\text{INF-}\gamma$  (ldci) kultiviert wurden (siehe Abb. 2.2.3.2.). Die relative Menge und die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese densitometrisch bestimmt und auf die relative Menge von  $\beta$ -Actin normiert.



In allen untersuchten Zellen wird die *bcl-x* mRNA von mindestens drei verschiedenen Startpunkten im 5'-nichttranslatierten Bereich des *bcl-x* Gens aus transkribiert (siehe Abb. 2.2.3.3.). Der Haupttranskriptionsstart der *bcl-x* mRNA liegt ca. 500 bp strangaufwärts vom ersten Startkodon der *bcl-x* mRNA und das von Nuñez und Ban beschriebene, 286 bp lange erste Intron [101, 117], das sich in der Sequenz des 5'-NTR des *bcl-x* Gens zwischen der Spleißdonorstelle bei Position -397 (siehe Abb. 2.1.3.1. in Abschnitt 2.1.3. und der Spleißakzeptorstelle bei Position -126 befindet, ist grundsätzlich aus der reifen *bcl-x* mRNA herausgespleißt. Auch bei mRNAs, die von dem weiter strangaufwärts gelegenen Startpunkt aus transkribiert werden, ist dieses Intron in allen Fällen aus der reifen mRNA herausgespleißt. Ein weiteres, kurzes Intron liegt weiter stromaufwärts und wurde schon in Abschnitt 2.2.1. im Rahmen der Beschreibung des Ct11 Fragments ausführlich untersucht. Es konnten zwei weitere Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA identifiziert werden, die von einem Startpunkt zwischen Position -305 und -337

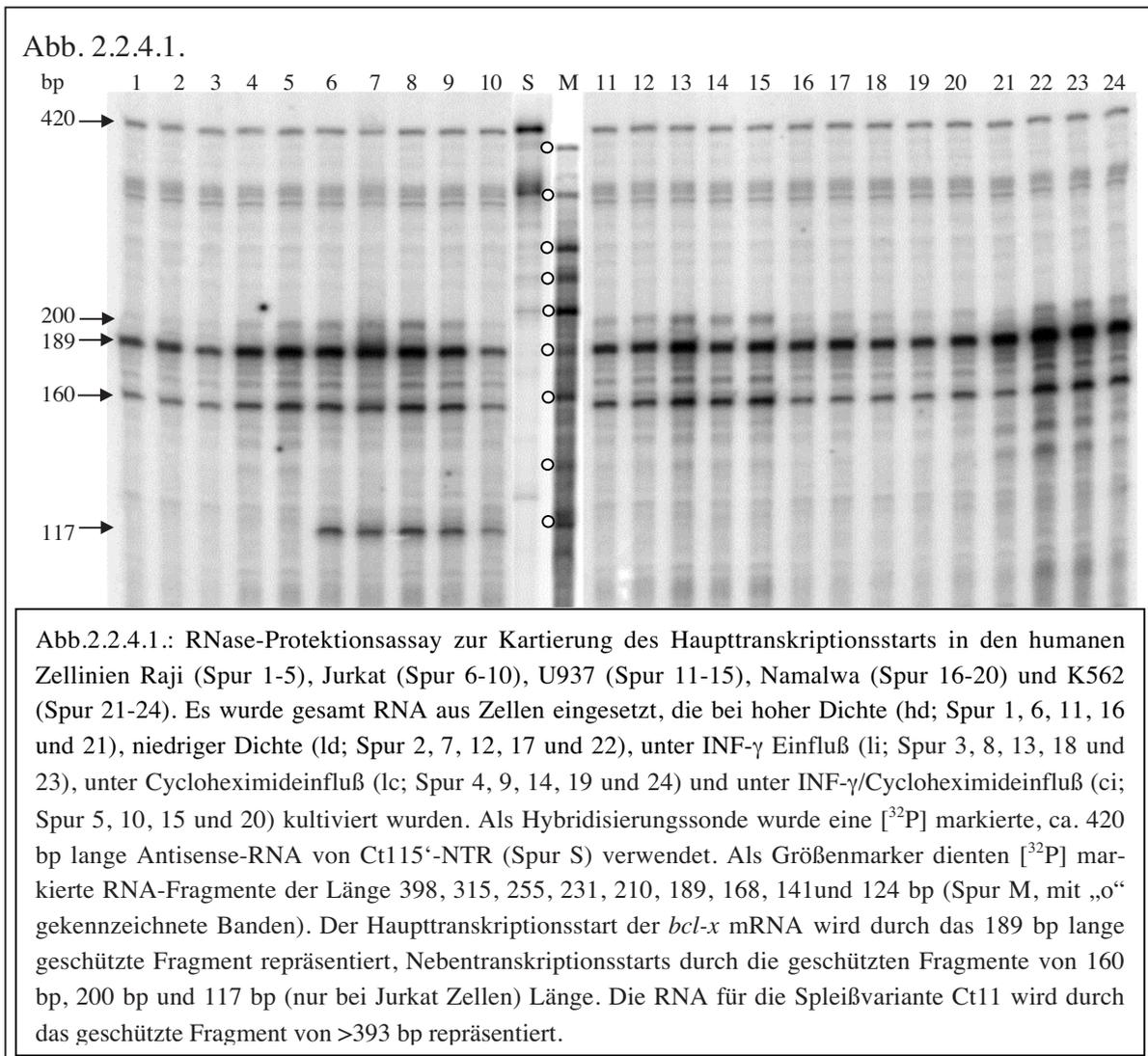


aus transkribiert werden. Der 5'-NTR der einen *bcl-x* mRNA, die als *bcl-x (sn)* (sn = short distance; not spliced) bezeichnet wird, ist ungespleißt und hat eine Länge von ca. 310 N. Aus der zweiten Spleißvariante, die als *bcl-x (ss)* (ss = short distance; spliced) bezeichnet wird, ist ein ca. 80N langes Intron herausgespleißt, das in der Sequenz des 5'-NTR des *bcl-x* Gens zwischen der Spleißdonorstelle bei Position -201 und der Spleißakzeptorstelle bei Position -126 liegt (siehe Abb 2.1.3.1. in Abschnitt 2.1.3.). Der 5'-NTR der *bcl-x(ss)* mRNA hat eine Länge von ca. 230 N. In Raji -und K562-Zellen werden die *bcl-x(ss)* -und die *bcl-x(sn)* mRNA relativ stark (50% - 100% der *bcl-x(MT)* mRNA) -und in Namalwa Zellen sehr schwach exprimiert (siehe Abb.2.3.1.2.). In Jurkat und U937 Zellen wird die *bcl-x(ss)* mRNA fast gar nicht -und die *bcl-x(sn)* mRNA nur sehr schwach exprimiert (s.Abb.2.3.1.2.). Der 5'-NTR der vom Startpunkt > -511bp aus transkribierten mRNA entspricht der intercistronischen Sequenz der bicistronischen mRNAs *bcl-x(B1A)<sub>L</sub>* und *bcl-x(F4D)<sub>L</sub>*, dem 5'-NTR der monocistronischen mRNA *bcl-x(C1A)<sub>L</sub>* und einem Teil der Sequenz Ct11.

#### 2.2.4. Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens durch RNase-Protektionsassay

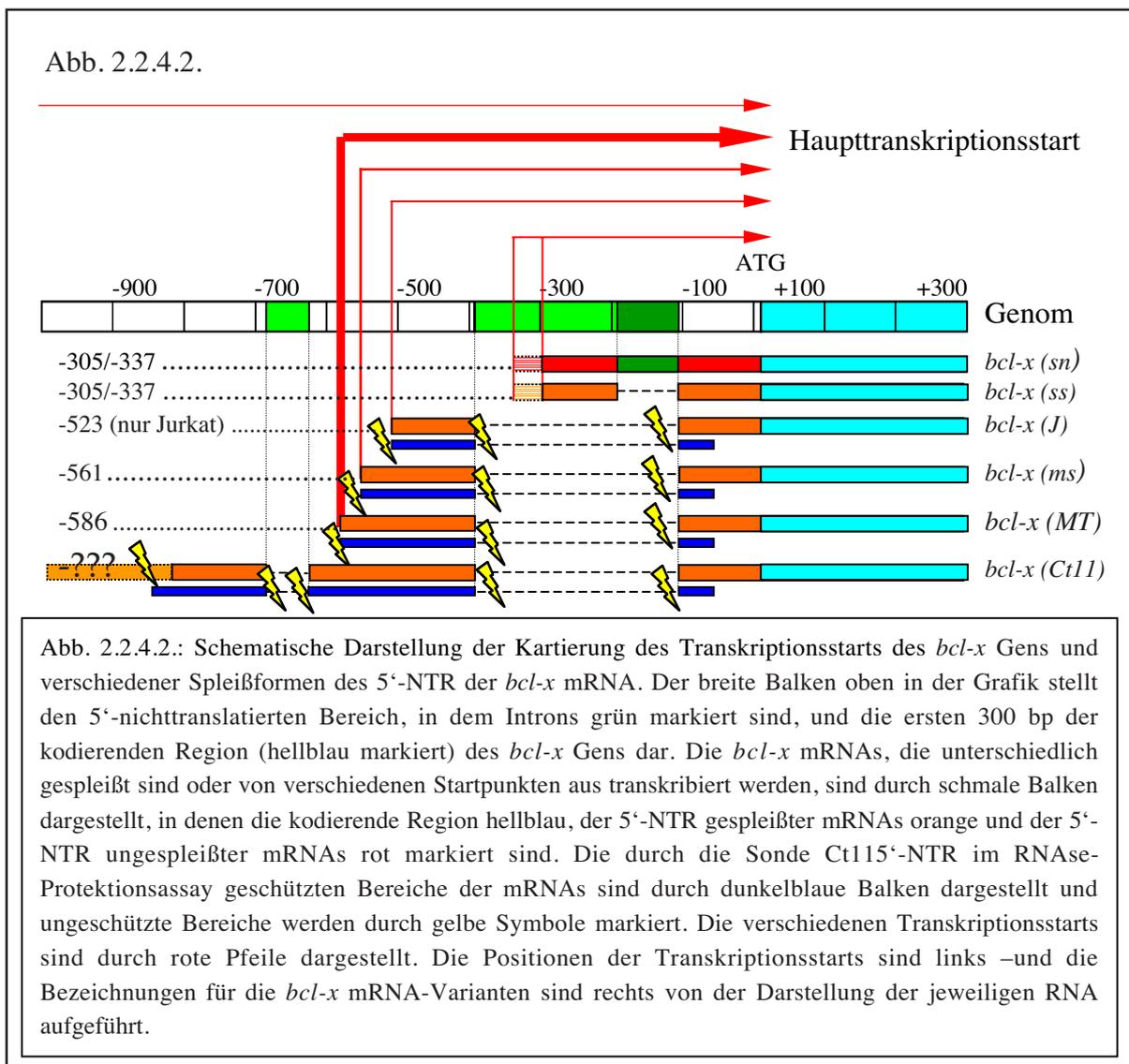
Der RNase-Protektionsassay zur Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens wurde mit RNA durchgeführt, die aus Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 Zellen isoliert wurde, die bei hoher Zelldichte (hd), niedriger Zelldichte (ld), niedriger Zelldichte unter INF- $\gamma$  Einfluß (li), niedriger Zelldichte unter Einfluß von Cycloheximid (lc) und niedriger Zelldichte unter Einfluß von Cycloheximid und INF- $\gamma$  (lci) kultiviert wurden. Als Hybridisierungssonde wurde eine radioaktiv markierte RNA verwendet, die durch in vitro Transkription der Sequenz Ct11<sub>5'-NTR</sub> in antisense-Orientierung synthetisiert wurde. Das Ergebnis des RNase-Protektionsassays ist in Abb. 2.2.4.1. dargestellt. Durch den RNase-Protektionsassay mit der Sonde Ct11<sub>5'-NTR</sub> konnte der Haupttranskriptionsstart der *bcl-x* mRNA festgelegt werden. Die geschützten Fragmente von 180 N, 160 N und 117 N Länge entsprechen der Sequenz, die zwischen dem ersten, kurzen Intron von Ct11 (siehe oben) und dem zweiten, 285 bp langen Intron des *bcl-x* Gens liegt [101, 117]. Zusammen mit den Ergebnissen der PCR-Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens läßt sich der Haupttranskriptionsstart in Position -586 relativ zum ersten Startkodon der *bcl-x* mRNA festlegen.

Die von diesem Startpunkt aus transkribierte *bcl-x* mRNA wird im folgenden *bcl-x(MT)* (MT=Major Transcription start) genannt (siehe Abb. 2.2.4.2.). Ca. 25 bp strangabwärts,



also bei Position  $-561$  relativ zum ersten Startkodon der *bcl-x* mRNA, befindet sich ein weiterer Transkriptionsstartpunkt, der durch das geschützte RNA-Fragment von ca. 164 N Länge repräsentiert wird. Die von diesem Startpunkt aus synthetisierte *bcl-x* mRNA Variante wird im folgenden *bcl-x* (*ms*) (*ms* = medium distance; spliced) genannt (s. Abb. 2.2.4.2.). In Jurkat Zellen existiert ein weiterer Transkriptionsstartpunkt, der weiter strangabwärts bei Position  $-523$  relativ zum ersten Startkodon der *bcl-x* mRNA liegt und durch ein ca. 117 N langes, geschütztes RNA-Fragment repräsentiert wird. Die von diesem Startpunkt aus transkribierte *bcl-x* mRNA wird im folgenden als *bcl-x* (*J*) (*J*= Jurkat) (s. Abb. 2.2.4.2.) bezeichnet. Die Menge an *bcl-x*(*ms*) mRNA entspricht 30% – 40%– und die Menge an *bcl-x*(*J*) mRNA ca. 25% - 30% der Menge an *bcl-x*(*MT*) mRNA. Aus allen *bcl-x* mRNA Varianten, die nicht vom Transkriptionsstart  $-305/-337$  aus synthetisiert werden, ist das 285 bp lange, erste Intron des *bcl-x* Gens herausgespleißt. Es existiert außerdem ein sehr geringer Anteil an ungespleißter *bcl-x* mRNA, der durch ein geschütztes RNA-Fragment von ca. 200 –220 bp Länge repräsentiert wird. Da der

RNase-Protektionsassay mit gesamt-RNA aus den oben genannten Kulturzellen durchgeführt wurde, besteht die Möglichkeit, daß dieses geschützte RNA-Fragment aus unreifen Vorläufer-mRNAs stammt (s. Abb. 2.2.4.1. und Abb. 2.2.4.2.). Eine mRNA, die durch die Sequenz Ct11<sub>5'-NTR</sub> vollständig geschützt wird, wird in allen untersuchten Zelllinien in relativ konstanter Menge exprimiert. Die Banden von ca. 315 bp Länge sind auf Abbrüche bei der *in vitro* Transkription der Sonde zurückzuführen. Die relativen Intensitäten und die Verhältnisse der exprimierten RNA-Menge in Abhängigkeit von INF- $\gamma$  (li), der Zelldichte (ld und hd), von Cycloheximid (lc) und Cycloheximid + INF- $\gamma$  (ci) entsprechen denen, die in Abschnitt 2.3.1. beschrieben werden. Der Bereich, der in der *bcl-x* mRNA zwischen dem 3'-Ende des 285 bp langen Introns und dem ersten Startkodon des kodierenden Bereichs des *bcl-x* Gens liegt, kann durch die Sonde Ct11<sub>5'-NTR</sub> nicht effektiv gegen RNasen geschützt werden, da der hybridisierende Anteil nur 48 bp lang ist. Bei den hier gewählten Hybridisierungsbedingungen hybridisiert ein so kurzes RNA Fragment nicht vollständig. Es wird außerdem auf dem zur Auftrennung der ge-



---

schützten RNA-Fragmente verwendeten Polyacrylamidgel nicht mehr effektiv aufgetrennt und zudem noch durch kleine Abbauprodukte der RNasen überdeckt.

### **2.3. Expression des *bcl-x* Gens**

Die Analyse der Sequenz des 5'-nichtkodierenden Bereichs des *bcl-x* Gens zeigte, daß sich zwischen Position -321 und -331 strangaufwärts vom Startkodon eine GAS-Sequenz befindet (siehe Abschnitt 2.1.1.). Diese Sequenz liegt auf dem ersten Intron des *bcl-x* Gens und kann die Promoteraktivität dieses Bereiches beeinflussen [107]. Der Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA wurde in den vorhergegangenen Abschnitten kartiert. Es konnte gezeigt werden, daß sich der Haupttranskriptionsstart der *bcl-x*(MT) mRNA im Bereich des ersten Exons befindet (siehe Abschnitt 2.2.3. und 2.2.4.). Die Nebentranskriptionsstarts der *bcl-x* mRNA befinden sich alle im 5'-Bereich des ersten Introns. Da sich wirksame Promoterelemente im allgemeinen strangaufwärts vom Transkriptionsstart der mRNA eines Gens befinden [178], wurde die Expression des *bcl-x* Gens in Abhängigkeit von der Zelldichte, Cycloheximid und INF- $\gamma$ , das über das oben genannte GAS-Element die Transkription beeinflussen kann, in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht. Die Transkription des *bcl-x* Gens wurde mit Hilfe von Hybridisierungssonden bzw. PCR-Primern untersucht, die spezifisch für die kodierende Region der *bcl-x* mRNA sind. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Abschnitt 2.3.1. dargestellt. Auf Proteinebene wurde die Expression des *bcl-x* Gens mit Hilfe von Westernblots analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung (siehe Abschnitt 2.3.2.) zeigen, daß die in verschiedenen Kulturzellen nachgewiesene mRNA Menge in Abhängigkeit von der Zelldichte, Interferon- $\gamma$  und Cycloheximid in keinem linearen Zusammenhang mit der nachgewiesenen Proteinmenge stehen. Aus diesem Grund wurde die Transkription der in 2.2.3. und 2.2.4. nachgewiesenen Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- $\gamma$  und Cycloheximid untersucht und diese Werte mit den in Abschnitt 2.3.2. aufgeführten Werten aus der Westernblotanalyse verglichen. So konnte die aktiv translatierte Form der *bcl-x* mRNA in verschiedenen Zelltypen identifiziert werden (siehe Abschnitt 2.3.3.). In Abschnitt 2.3.4. wird der Nachweis der in 2.1.1. und 2.2.1. postulierten zellulären *bcl-x* antisense RNA durch einen RNase Protektionsassay beschrieben. Die zelluläre *bcl-x* antisense RNA konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden und wies ein anderes Expressionsmuster in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- $\gamma$  und Cycloheximid auf. Die in Abschnitt 2.2.2. beschriebenen bicistronischen *bcl-x* mRNAs konnten durch die in 2.3.5. beschriebenen Experimente in verschiedenen Kulturzellen nachgewiesen werden.

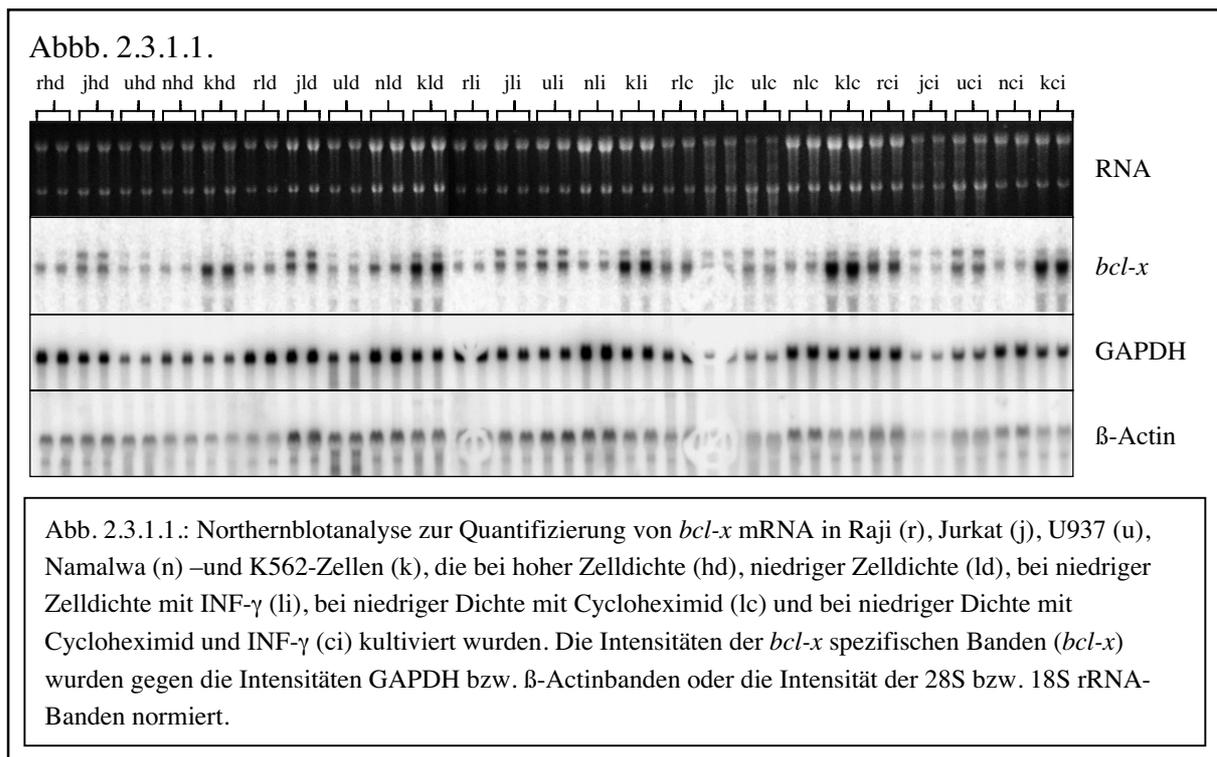
---

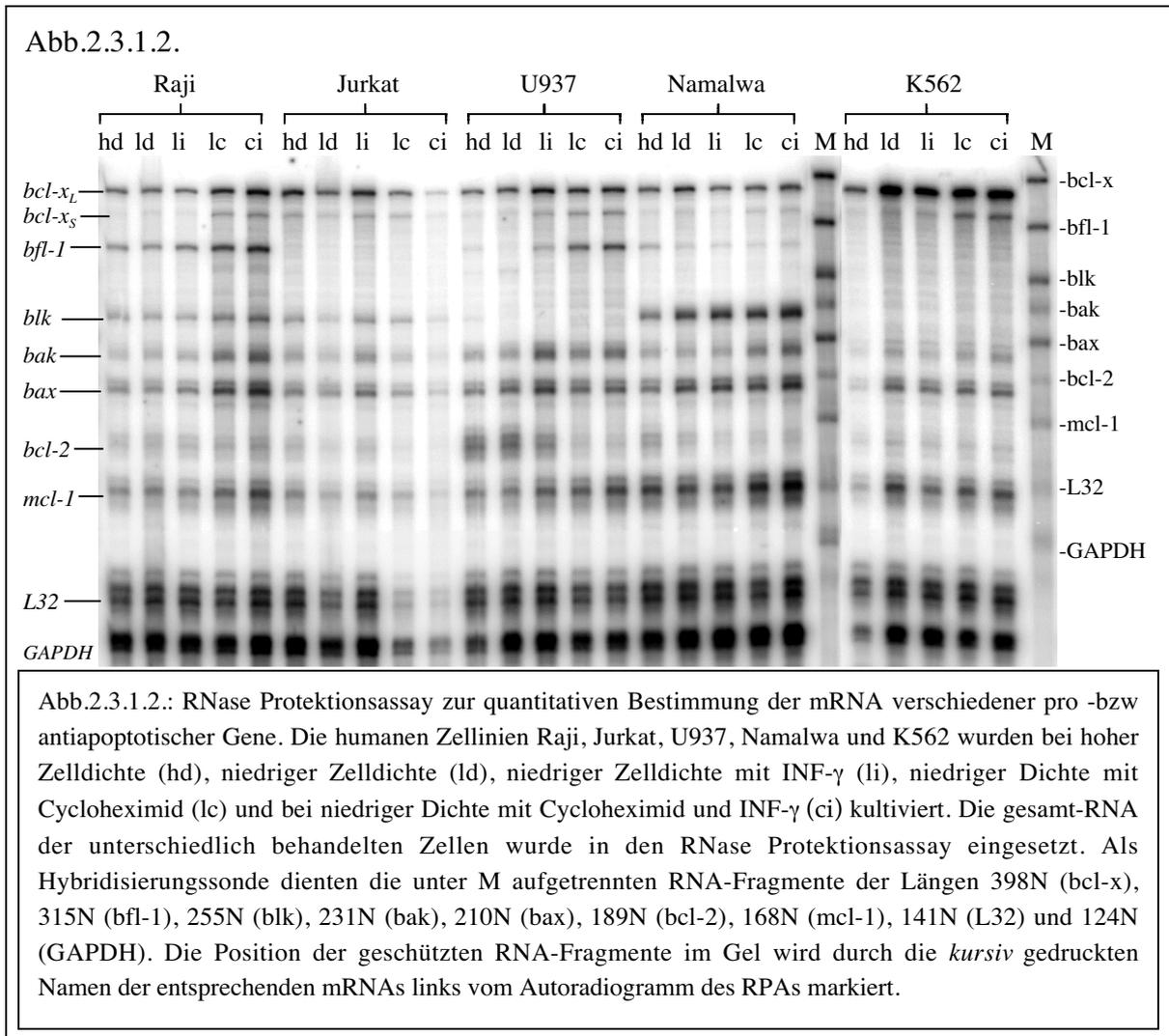
### 2.3.1. Transkription des *bcl-x* Gens in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- $\gamma$ und Cycloheximid

Der Einfluß von Cycloheximid, INF- $\gamma$  und der Zelldichte auf die Transkription des *bcl-x* Gens und einiger anderer Gene aus der Bcl-Familie wurde in den im folgenden beschriebenen Experimenten analysiert.

Die direkte Induktion eines Gens durch INF- $\gamma$  wird durch den Einfluß von INF- $\gamma$ , Cycloheximid und INF- $\gamma$  und Cycloheximid auf die Expression eines bestimmten Gens untersucht. Ist die relative Änderung der Expression dieses Gens unter Einfluß von INF- $\gamma$  genauso hoch wie unter Einfluß von INF- $\gamma$  und Cycloheximid, so ist die Induktion der Expression unabhängig von der de novo Synthese INF- $\gamma$  abhängiger Transkriptionsfaktoren. Das Gen wird also direkt durch INF- $\gamma$  induziert. Es wurden die Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 (siehe Abschnitt 6.1.1.) untersucht, da sie verschiedene Zelltypen darstellen und damit in unterschiedlicher Weise auf den Einfluß von Cytokinen reagieren.

Die Northernblot Analyse zeigte, daß in U937-Zellen die Transkription des *bcl-x* Gens ca. 2,5 fach induziert wird. In den Zelllinien Raji und Jurkat wurde sie nicht induziert, während sie in Namalwa- und K562-Zellen leicht gehemmt wurde (siehe Abb.2.3.1.1. und Abb. 2.3.1.3.). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Transkription des *bcl-x* Gens in K562 Zellen ca. 5 – 10 mal stärker ist als in allen anderen untersuchten Zellen (siehe Abb. 2.3.1.3.). Das Ergebnis einer quantitativen Auswertung





der *bcl-x* Expression in verschiedenen Kulturzellen in Abhängigkeit von den oben genannten Kulturbedingungen wird stark von der Auswahl des sogenannten Haushaltsgenes („housekeeping gene“) beeinflusst, da die Expression der hier ausgewählten Haushaltsgene vom Zustand der Zelle abhängig ist. (siehe Abb. 2.3.1.3.). Der Einfluß von INF- $\gamma$  auf die Expression der proapoptotischen *bcl-x* Spleißvariante *bcl-x<sub>s</sub>* konnte hier nicht untersucht werden, da der Größenunterschied zwischen *bcl-x<sub>L</sub>* und *bcl-x<sub>s</sub>* zu klein ist, um im Northernblot dargestellt werden zu können. Der Einfluß von INF- $\gamma$ , der Zelldichte und Cycloheximid auf die Transkription von *bcl-x<sub>L</sub>* und *bcl-x<sub>s</sub>* wurde mit Hilfe eines RNase-Protektionsassays untersucht, der die gleichzeitige Bestimmung der Transkription der mRNA von *bcl-x<sub>L</sub>*, *bcl-x<sub>s</sub>*, *bfl-1*, *blk*, *bak*, *bax*, *bcl-2*, *mcl1*, *GAPDH* und *L32* ermöglicht. Es wurde die gesamt-RNA aus Raji-, Jurkat-, U937-, Namalwa- und K562 Zellen untersucht, die jeweils bei hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte (ld) kultiviert wurden und die mit INF- $\gamma$  (li), Cycloheximid (lc) und INF- $\gamma$  und Cycloheximid (ci) behandelt wurden. In U937 Zellen konnte auch hier eine ca. 2,5 fache Steigerung der *bcl-x<sub>L</sub>* Expression unter Einfluß von INF- $\gamma$  gemessen werden. In den anderen

untersuchten Zelllinien wurde keine Änderung der *bcl-x<sub>L</sub>* Expression gefunden. In Zellen, die gleichzeitig mit INF- $\gamma$  und Cycloheximid inkubiert wurden, war gegenüber Zellen, die nur mit Cycloheximid inkubiert wurden, keine Steigerung der *bcl-x* Expression zu beobachten. Es handelt sich hier also um eine indirekte Induktion der *bcl-x* Expression. Eine Kontrolle für die Wirkung von INF- $\gamma$  stellt die Expression von *bak* dar. In HT-29 Zellen wurde eine direkte Induktion der *bak* Expression durch INF- $\gamma$  beobachtet [127]. In U937 Zellen erfährt die *bak* Expression eine direkte Induktion durch INF- $\gamma$  und in Jurkat Zellen eine schwache indirekte Induktion. In allen anderen untersuchten Zel-

Abb. 2.3.1.3.:

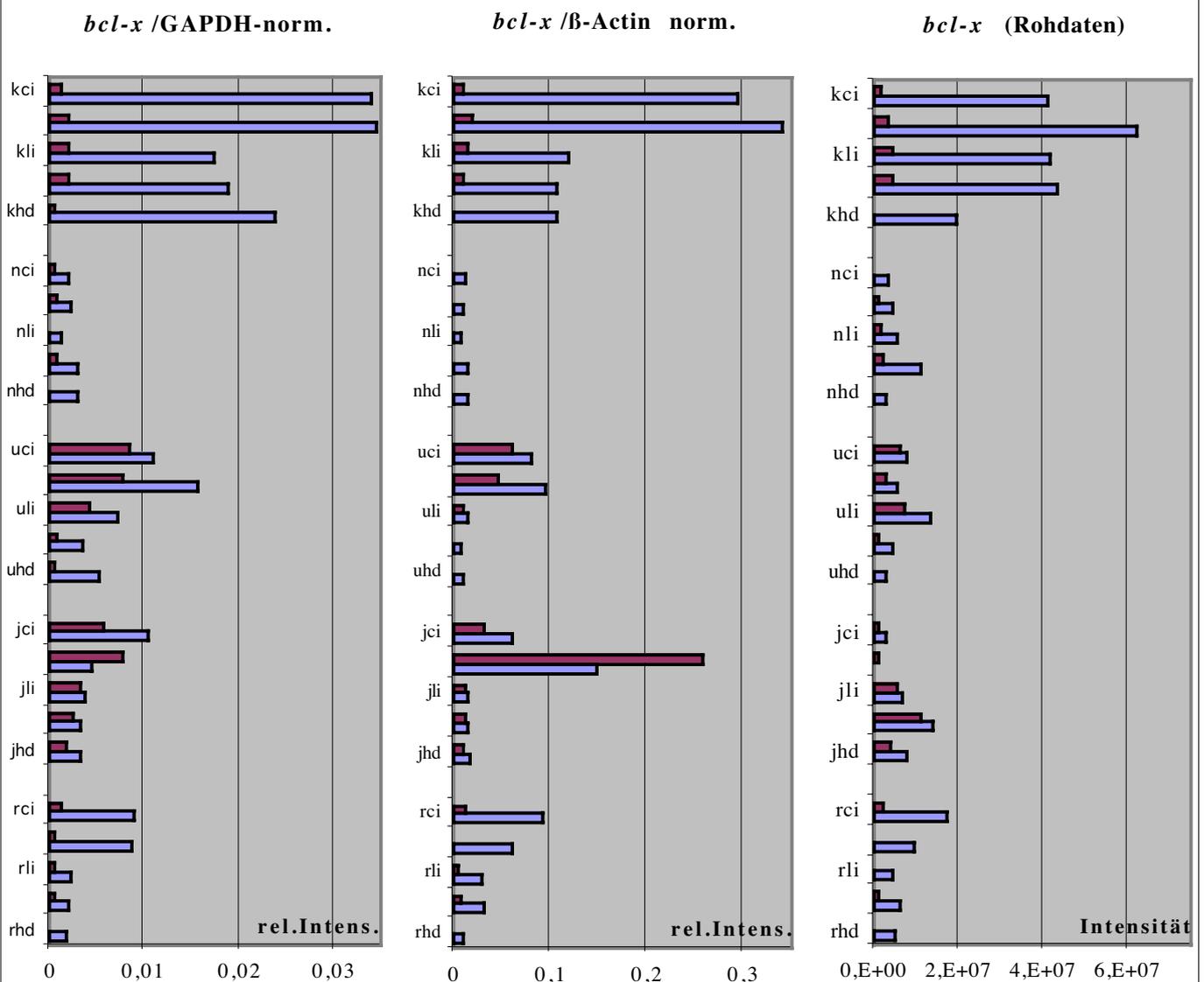
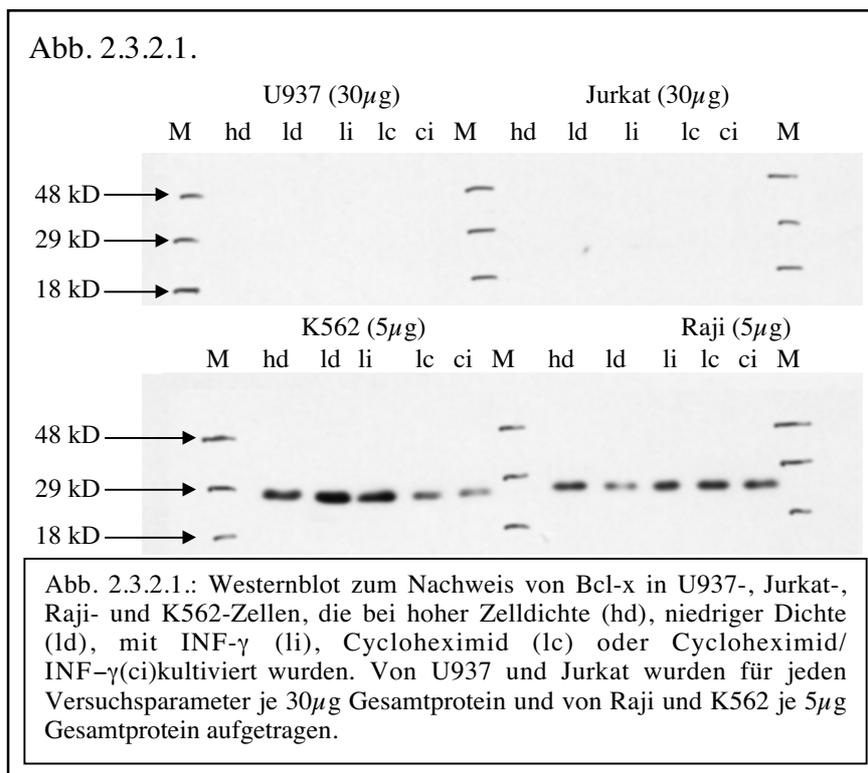


Abb. 2.3.1.3. : Quantitative Bestimmung der *bcl-x* Expression durch densitometrische Auswertung des in Abb. 2.2.1.1. gezeigten Northernblots. Die relativen Intensitäten der 2700 N langen *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA Banden sind in den Diagrammen blau dargestellt und die relativen Intensitäten der 3600 N langen *bcl-x* ähnlichen mRNA violett. Die Intensitäten der *bcl-x* spezifischen Banden wurden gegen die Intensitäten der entsprechenden GAPDH -bzw.  $\beta$ -Actinspezifischen Banden normiert.

linien hatte  $\text{INF-}\gamma$  keinen Einfluß auf die *bak* Expression. Durch Behandlung mit Cycloheximid verdoppelte sich in allen untersuchten Zelllinien das Verhältnis von *bcl-x<sub>s</sub>* zu *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA. Auch das Verhältnis von anderen proapoptotischen mRNAs zu antiapoptotischen mRNAs erhöhte sich (Daten hier nicht dargestellt).

### 2.3.2. Translation der *bcl-x* mRNA in Abhängigkeit von der Zelldichte, $\text{INF-}\gamma$ und Cycloheximid



Die Untersuchung der *bcl-x* Expression im Westernblot zeigt, daß in einigen der untersuchten Zellen die Änderung der *bcl-x* mRNA-Menge keinen direkten Einfluß auf die Menge des synthetisierten Bcl-x Proteins hat (siehe Abb. 2.3.1.3. und 2.3.2.2. - 4). In K562-Zellen ist die nachgewiesene Bcl-x Menge um den Faktor 1.5 – 2.0 höher als in

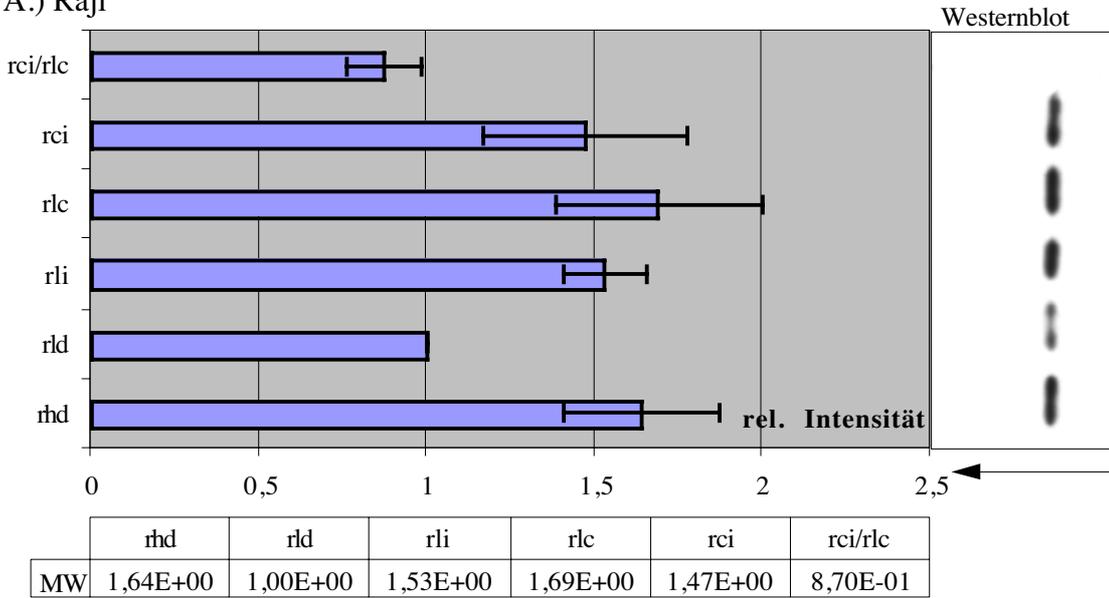
Raji-Zellen, obwohl die *bcl-x* mRNA Menge in K562 Zellen um den Faktor 4.5 – 6.0 mal höher ist als in Raji Zellen (siehe Abb. 2.3.1.3. und 2.3.2.1.). In den anderen untersuchten Zellen, die eine ähnliche Menge an *bcl-x* mRNA wie Raji Zellen aufwiesen, war unter gleichen Bedingungen kein Bcl-x Protein nachzuweisen (siehe Abb. 2.3.2.1.).

In Raji- und Namalwa-Zellen ist bei hoher Zelldichte (hd) und bei Zugabe von  $\text{INF-}\gamma$  (li) die Translationsaktivität deutlich höher als bei niedriger Zelldichte (ld) (siehe Abb. 2.3.2.3. und 2.3.2.4.). In Jurkat-, U937- und K562-Zellen ist die Translationsaktivität bei hoher Zelldichte (hd) niedriger als bei niedriger Zelldichte (ld) und unter Einfluß von  $\text{INF-}\gamma$  (li) (siehe Abb. 2.3.2.2., 2.3.2.3. und 2.3.2.4.). Bei K562-Zellen hat  $\text{INF-}\gamma$  auf die Translation der *bcl-x* mRNA eine leicht inhibierende Wirkung. In Raji-, U937- und Namalwa-Zellen führt die Kultivierung der Zellen mit  $\text{INF-}\gamma$  zu einer Steigerung der Bcl-x Menge. Bei U937-Zellen ist die Wirkung von  $\text{INF-}\gamma$  auch auf Transkriptionsebene

zu beobachten. In Raji Zellen führt die Gabe von  $\text{INF-}\gamma$  zu keiner signifikanten Veränderung der *bcl-x* mRNA Menge, die Bcl-x Proteinmenge erhöht sich um den Faktor 1.5 (siehe Abb. 2.3.2.2., 2.3.2.3. und 2.3.2.4.).

Abb.2.3.2.2.

## A.) Raji



## B.) Jurkat

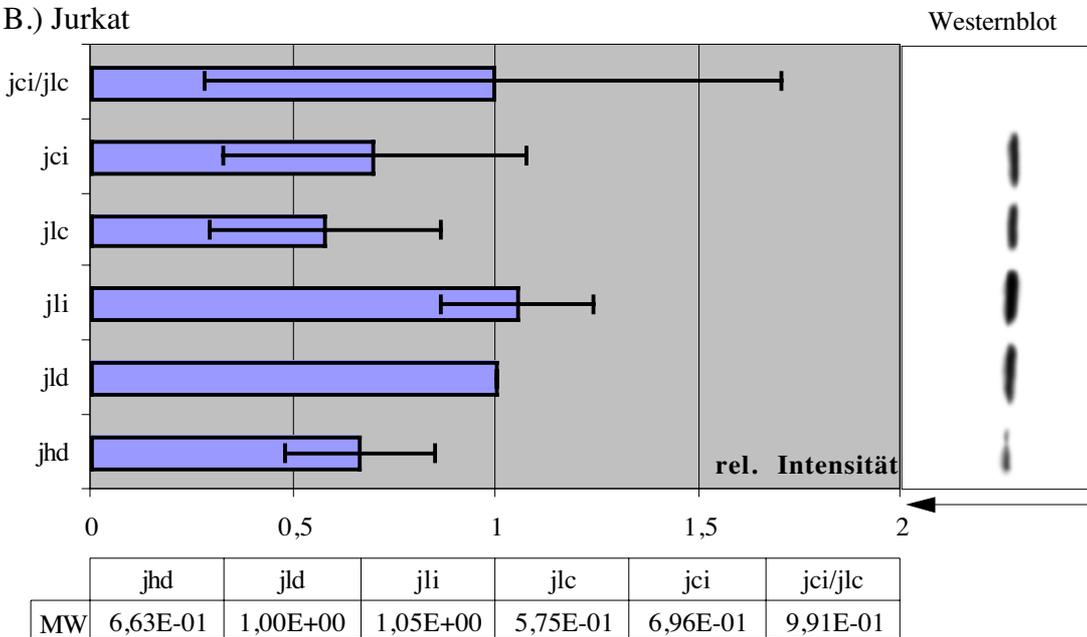
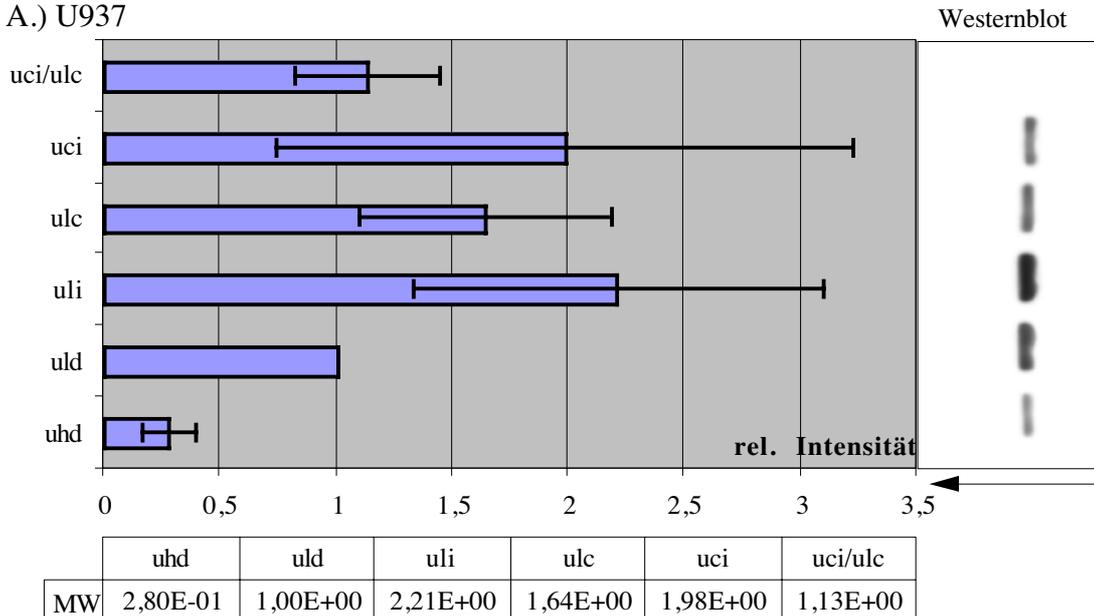


Abb.2.3.2.2.: Westernblot Analyse der Bcl-x Menge in Gesamtprotein aus (A.) Raji- und (B.) Jurkat-Zellen. Die Zellen wurden bei niedriger Zelldichte (ld), hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte mit  $\text{INF-}\gamma$  (li), bei niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Zelldichte mit  $\text{INF-}\gamma$  und Cycloheximid (ci) für 18 h kultiviert. Die Diagramme stellen die relative Intensität der Bcl-x Banden im Westernblot dar. Eine Abbildung des Westernblots ist links vom jeweiligen Diagramm gezeigt und die Durchschnittswerte für die relativen Intensitäten sind in den Tabellen unter den Diagrammen aufgeführt. Die Diagramme stellen den Mittelwert von mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

Abb.2.3.2.3.

## A.) U937



## B.) Namalwa

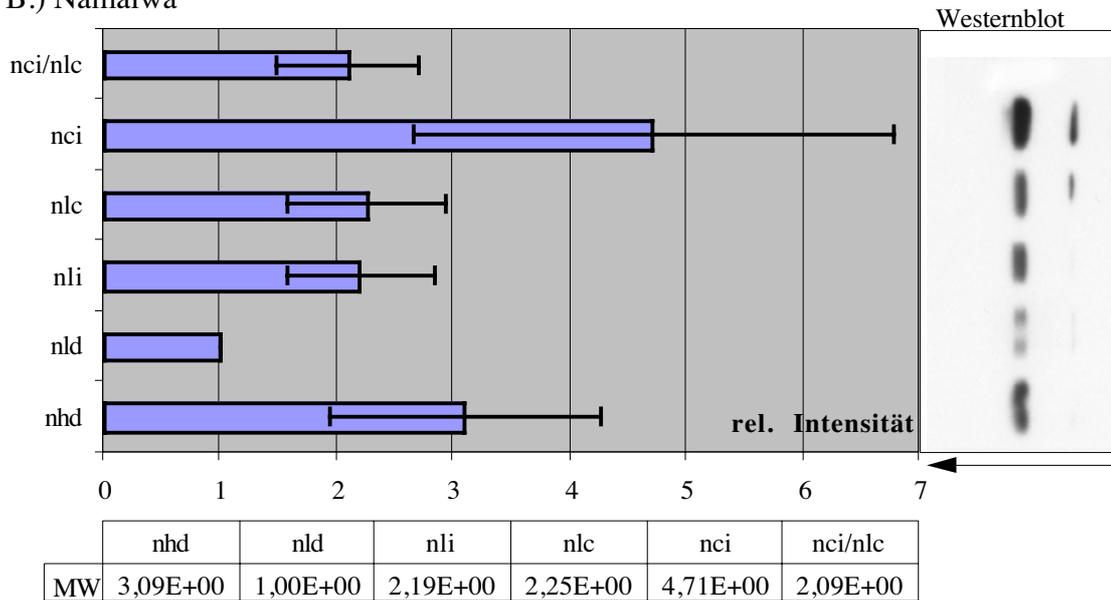


Abb.2.3.2.3.: Westernblot Analyse der Bcl-x Menge in Gesamtprotein aus U937 (A.) –und Namalwa-Zellen (B.). Die Zellen wurden bei niedriger Zelldichte (ld), hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte mit  $\text{INF-}\gamma$  (li), bei niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Zelldichte mit  $\text{INF-g}$  und Cycloheximid (ci) für 18 h kultiviert. Die Diagramme stellen die relative Intensität der Bcl-x Banden im Westernblot dar. Eine Abbildung des Westernblots ist rechts vom jeweiligen Diagramm gezeigt und die Durchschnittswerte für die relativen Intensitäten sind in den Tabellen unter den Diagrammen aufgeführt. Die Diagramme stellen den Mittelwert von mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

Abb.2.3.2.4.

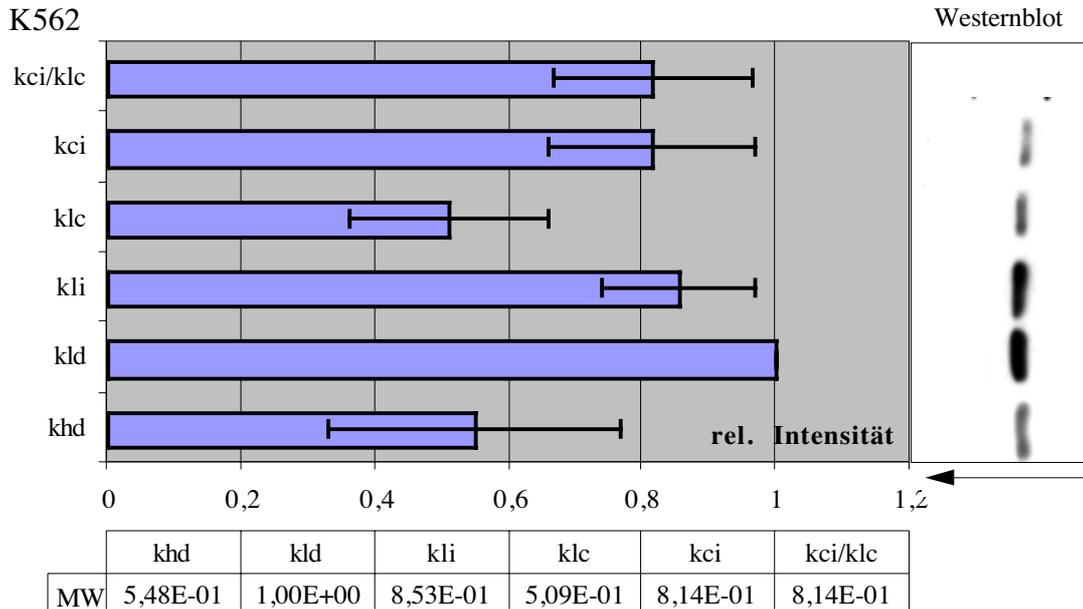


Abb.2.3.2.4.: Westernblot Analyse der Bcl-x Menge in Gesamtprotein aus K562-Zellen. Die Zellen wurden bei niedriger Zelldichte (ld), hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte mit INF-g (li), bei niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Zelldichte mit INF- $\gamma$  und Cycloheximid (ci) für 18 h kultiviert. Die Diagramme stellen die relative Intensität der Bcl-x Banden im Westernblot dar. Eine Abbildung des Westernblots ist rechts vom jeweiligen Diagramm gezeigt und die Durchschnittswerte für die relativen Intensitäten sind in den Tabellen unter den Diagrammen aufgeführt. Das Diagramm stellt den Mittelwert von mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

### 2.3.3. Abhängigkeit des Transkriptionsstarts und der Spleißmuster der *bcl-x* mRNA von Zelldichte, INF- $\gamma$ und Cycloheximid

Abb.2.3.3.1.. (K562)

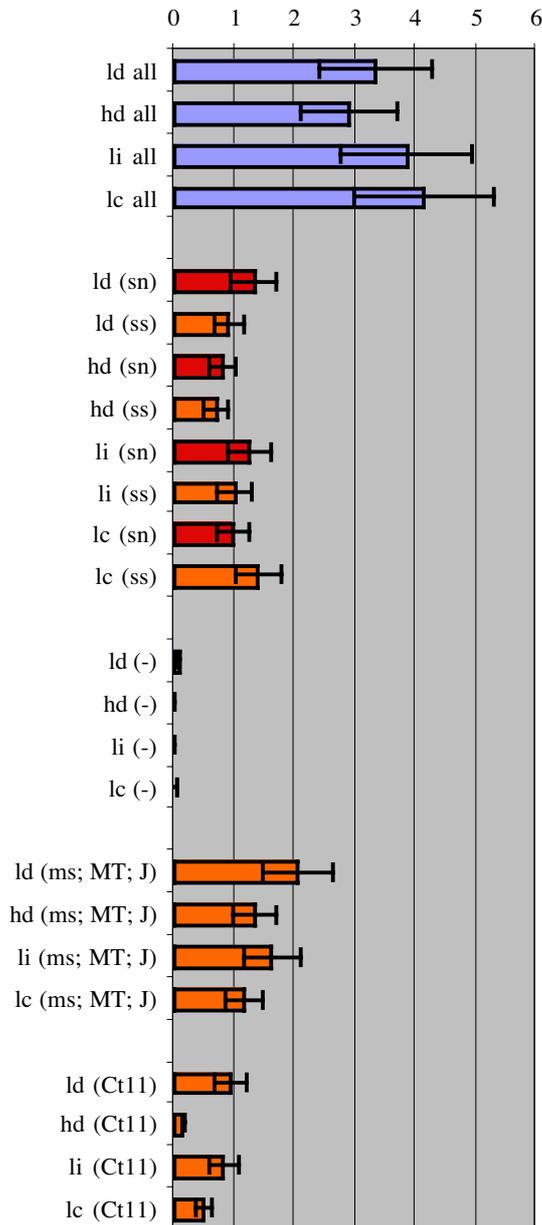


Abb. 2.3.3.1.: Einfluß von Zelldichte (hohe Dichte = hd; niedrige Dichte = ld), INF- $\gamma$  und Cycloheximid auf Spleißaktivität und Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA in K562 Zellen. Rote Balken repräsentieren die ungespleißte *bcl-x(sn)* mRNA, orange Balken die gespleißte *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(MT)*, *bcl-x(J)* und *bcl-x(Ct11)* mRNA und die blauen Balken repräsentieren die Summe aus allen *bcl-x* mRNA-Spezies.

Durch die densitometrische Auswertung der zur Kartierung des *bcl-x* 5'-NTR gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte (siehe Kapitel 2.2.3.) konnte in den Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 die Wahl des Transkriptionsstarts und unterschiedliche Spleißmuster der *bcl-x* mRNA in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- $\gamma$  oder Cycloheximid bestimmt werden. Das Expressionsmuster der *bcl-x(all)* mRNA, d.h. die Summe aller *bcl-x* mRNA Varianten, weist in K562 Zellen (siehe Abb. 2.3.3.1.) die gleiche Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- $\gamma$  oder Cycloheximid auf wie die *bcl-x<sub>L</sub>*- und *bcl-x<sub>S</sub>* mRNA im Northernblot, im RNase Protektionsassay und in der RT-PCR unter Verwendung für den kodierenden Bereich spezifischer Hybridisierungs sonden bzw. PCR Primer (Abschnitt 2.2.1.) Unter Einfluß von Cycloheximid wird die Expression der *bcl-x(ms)*, der *bcl-x(MT)* und der *bcl-x(Ct11)* mRNA gehemmt, während die Expression der *bcl-x(sn)*- und der *bcl-x(ss)* mRNA gesteigert wird. Bei niedriger Zelldichte und nach INF- $\gamma$  Gabe liegt die *bcl-x(sn)* mRNA in größerer Menge vor als die *bcl-x(ss)* mRNA. Die

Spleißaktivität ist bei niedriger Zelldichte oder INF- $\gamma$  Einfluß in K562 Zellen reduziert. Durch Cycloheximid Einfluß wird die Spleißaktivität beträchtlich erhöht, es liegt also

mehr *bcl-x(ss)* –als *bcl-x(sn)* mRNA vor, während beide mRNA-Spezies bei hoher Zelldichte in gleicher Menge vorliegen (siehe Abb. 2.3.3.1.).

In Raji Zellen hat, ähnlich wie in K562 Zellen, die Zelldichte, INF- $\gamma$  oder Cycloheximid einen Einfluß auf die Spleißaktivität, die die Menge an *bcl-x(sn)* –bzw. *bcl-x(ss)* mRNA bestimmt (siehe Abb. 2.3.3.2.). Bei niedriger Zelldichte ist die Menge an *bcl-x(sn)* mRNA mehr als doppelt so hoch wie die Menge an gespleißter *bcl-x(ss)* mRNA. Bei hoher Zelldichte oder unter INF- $\gamma$  Einfluß ist die Menge an *bcl-x(sn)* mRNA etwas kleiner als die Menge an *bcl-x(ss)* mRNA. Unter Einfluß von Cycloheximid steigt die Menge an *bcl-x(ss)* mRNA um den Faktor  $\sim 2.4$  gegenüber der Menge an *bcl-x(sn)* mRNA (siehe Abb. 2.3.3.1. und Abb. 2.3.3.2.). Die Expressionsmuster der verschiedenen *bcl-x* mRNA-Spezies entsprechen in Raji-Zellen den Expressionsmustern der *bcl-x(all)*, der *bcl-x<sub>L</sub>* und der *bcl-x<sub>S</sub>* mRNA, die durch RNase Protektionsassay, PCR oder Northernblotanalyse mit spezifischen Primern bzw. Hybridisierungs sonden für den kodierenden Bereich der *bcl-x* mRNA ermittelt wurden (siehe Abschnitt 2.3.1.).

Abb.2.3.3.2. (Raji)

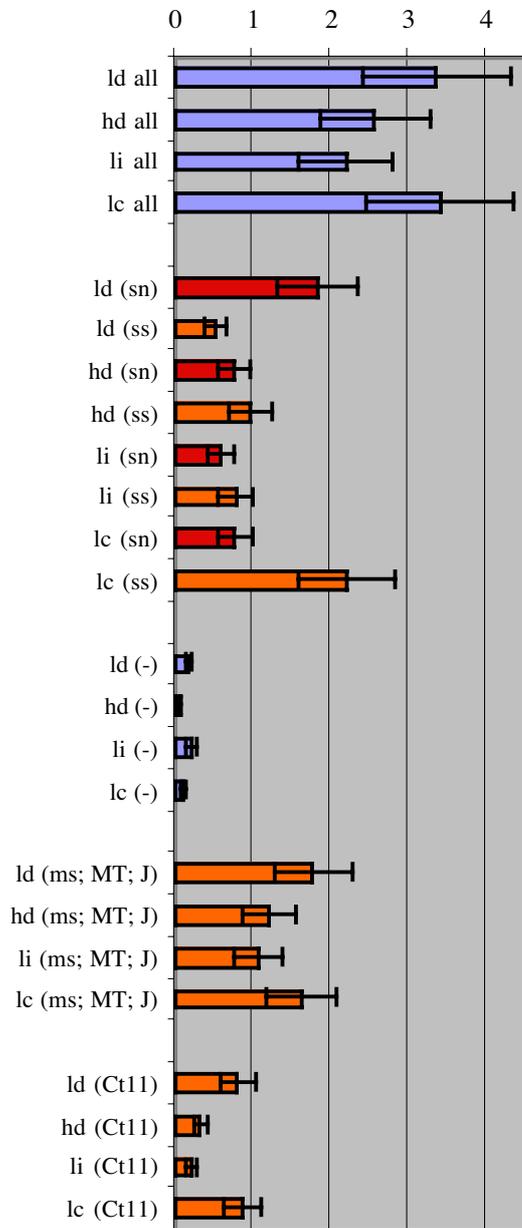


Abb. 2.3.3.2.: Einfluß von Zelldichte (hohe Dichte = hd; niedrige Dichte = ld), INF- $\gamma$  und Cycloheximid auf Spleißaktivität und Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA in Raji Zellen. Rote Balken repräsentieren die ungespleißte *bcl-x(sn)* mRNA, orange Balken die gespleißte *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(MT)*, *bcl-x(J)* und *bcl-x(Ct11)* mRNA und die blauen Balken repräsentieren die Summe aus allen *bcl-x* mRNA-Spezies.

Abb.2.3.3.3. (Namalwa)

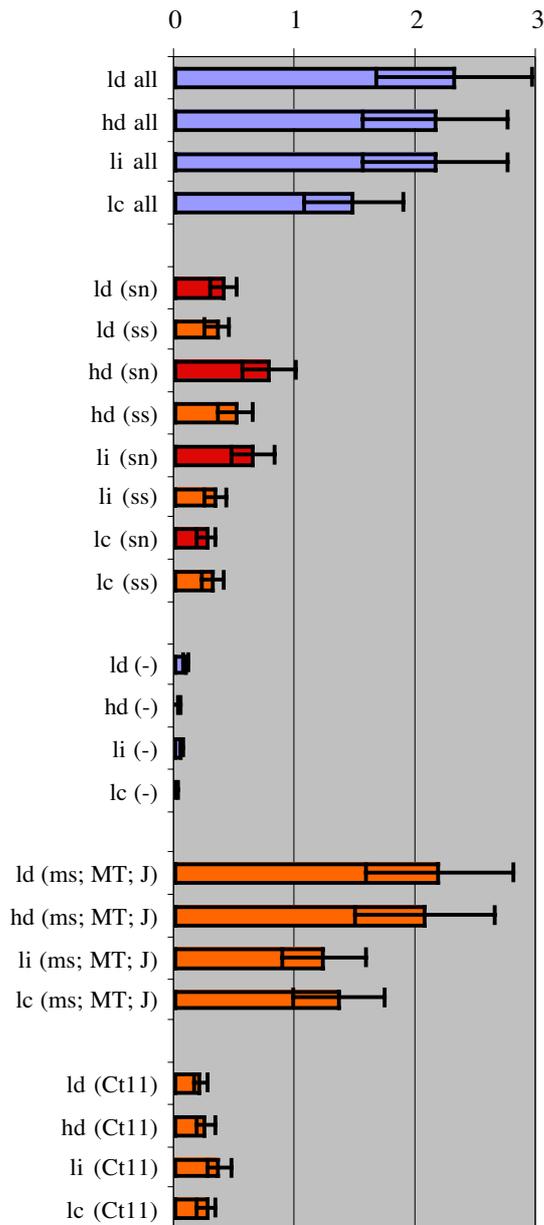


Abb. 2.3.3.3.: Einfluß von Zelldichte (hohe Dichte = hd; niedrige Dichte = ld), INF- $\gamma$  und Cycloheximid auf Spleißaktivität und Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA in Namalwa Zellen. Rote Balken repräsentieren die ungespleißte *bcl-x(sn)* mRNA, orange Balken die gespleißte *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(MT)*, *bcl-x(J)* und *bcl-x(Ct11)* mRNA und die blauen Balken repräsentieren die Summe aus allen *bcl-x* mRNA-Spezies.

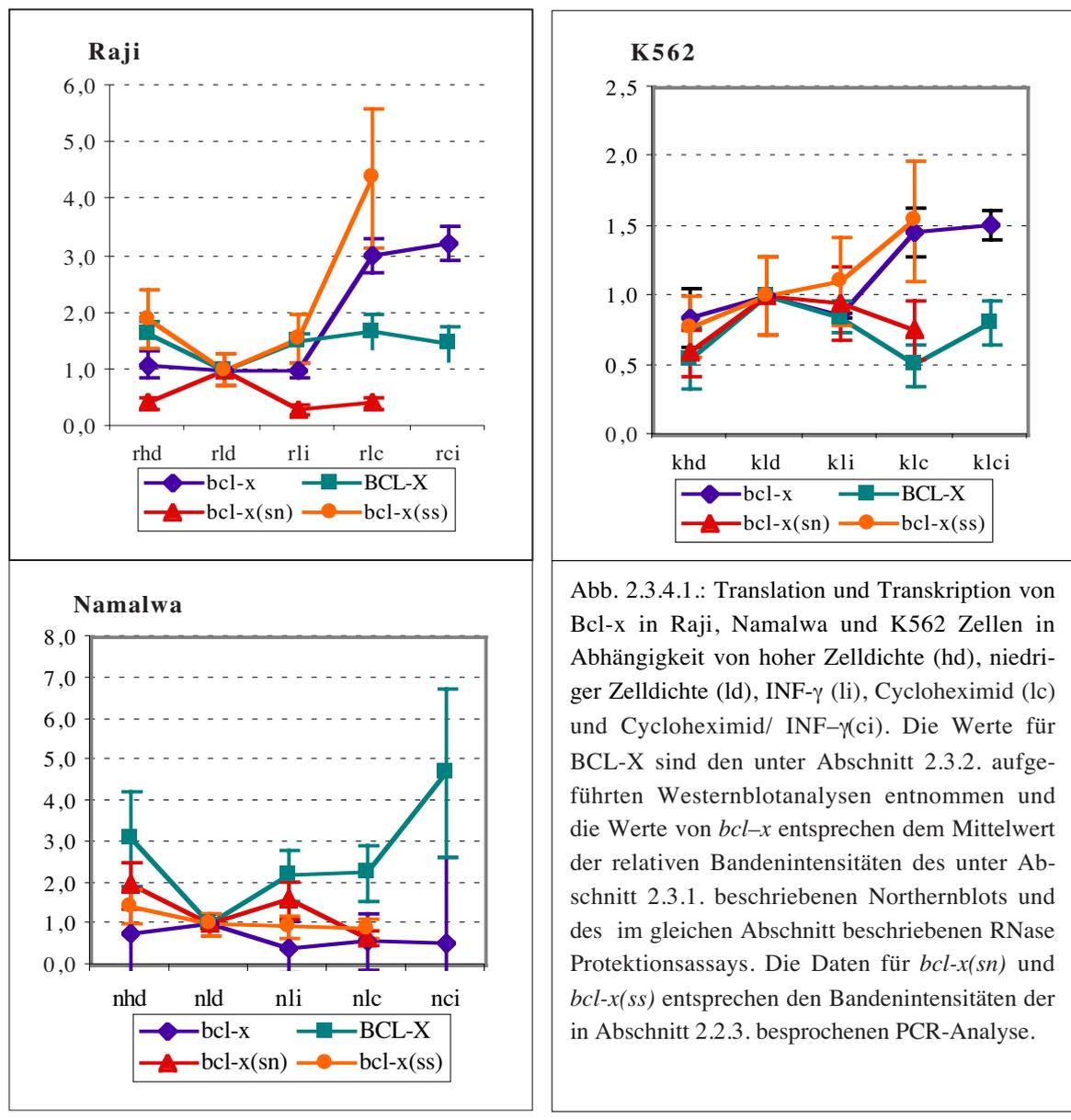
In Namalwa Zellen ist bei hoher Zelldichte, bzw. nach INF- $\gamma$  Gabe eine Steigerung der Transkriptionsrate vom Startpunkt in Position -305/-337, also der *bcl-x(sn)* -bzw. der *bcl-x(ss)* mRNA, zu beobachten. Im Gegensatz zu Raji -oder K562 Zellen ändert sich in Namalwa Zellen das Verhältnis von ungespleißter *bcl-x(sn)* zu gespleißter *bcl-x(ss)* mRNA durch Einfluß von Cycloheximid nicht signifikant (siehe Abb. 2.3.3.3.).

In Jurkat -und U937 Zellen werden die *bcl-x(sn)* -und die *bcl-x(ss)* mRNA nicht exprimiert (siehe Abschnitt 2.2.3., 2.2.4. und 2.3.3.). Daher haben die Zelldichte, INF- $\gamma$  oder Cycloheximid in diesen Zellen keinen meßbaren Einfluß auf die Wahl des Transkriptionsstarts der *bcl-x* mRNA oder die Spleißaktivität. Die in den Diagrammen mit ld (-), hd (-), li (-) und lc (-) beschrifteten Werte stellen PCR-Produkte dar, die einer ungespleißten *bcl-x(MT)* mRNA oder einer *bcl-x(ss)*- bzw. einer *bcl-x(sn)* mRNA, deren Transkriptionsstart weiter strangaufwärts als -305/ -337 bp liegt. Die Menge an diesen PCR-Produkten ist so gering, daß sie als Hintergrund aufgefaßt werden kann (siehe Abb. 2.3.1.2.)

### 2.3.4. Identifizierung der aktiv translatierten *bcl-x* mRNA in Raji-, Jurkat-, U937-, Namalwa- und K562 Zellen.

In Abb. 2.3.4.1. und 2.3.4.2. sind die Daten zur Expression der verschiedenen *bcl-x* mRNA Varianten und des Bcl-x Proteins in den Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 bei hoher Zelldichte (hd), niedriger Zelldichte (ld), niedriger Zelldichte mit INF- $\gamma$  (li), niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und niedriger Zelldichte mit Cycloheximid/INF- $\gamma$  einander gegenübergestellt. Die Expressionsmuster der *bcl-x* mRNA, die mit Hilfe von Hybridisierungs sonden bzw. PCR-Primern ermittelt wurden, die spezifisch für die kodierende Region sind, stimmen nicht mit den Expressionsmustern des

Abb. 2.3.4.1.



Bcl-x Proteins überein (siehe Abb. 2.3.4.1. und 2.3.4.2.). Durch die Identifizierung der *bcl-x* mRNA-Spleißvarianten *bcl-x(sn)*, *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(J)*, *bcl-x(MT)* und *bcl-x(Ct11)* konnten die Expressionsmuster der Spleißvarianten in Raji, Jurkat, U937, Namalwa –und K562 Zellen unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen bestimmt werden (siehe Abb.2.3.4.1. und 2.3.4.2.). In Raji-Zellen entspricht das Expressionsmuster der *bcl-x(ss)* mRNA dem Expressionsmuster des Bcl-x Proteins. In Namalwa –und K562 Zellen sind die Expressionsmuster des Bcl-x Proteins und der *bcl-x(sn)* mRNA deckungsgleich. In Jurkat –und U937 Zellen, in denen die *bcl-x(ss)* –und die *bcl-x(sn)* mRNA nicht exprimiert wird, ähnelt das Expressionsmuster des Bcl-x Proteins eher dem Muster der *bcl-x(Ct11)* mRNA als dem der *bcl-x(MT)* mRNA.

Abb. 2.3.4.2.:

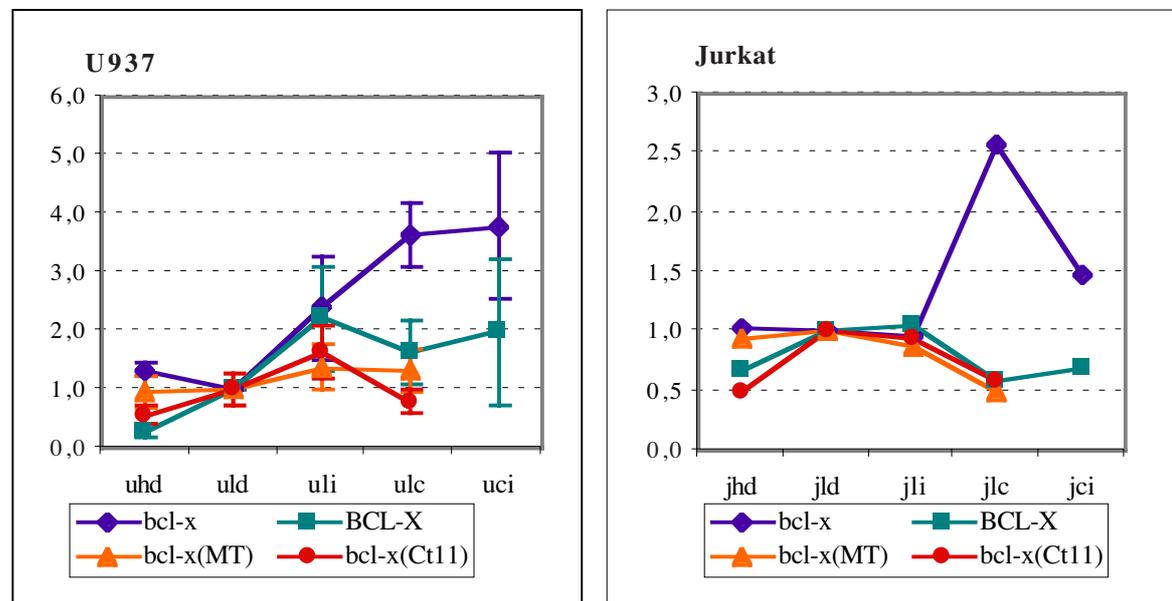


Abb. 2.3.4.2.: Translation und Transkription von Bcl-x in Jurkat und U937 Zellen in Abhängigkeit von hoher Zelldichte (hd), niedriger Zelldichte (ld), INF- $\gamma$  (li), Cycloheximid (lc) und Cycloheximid/ INF- $\gamma$  (ci). Die Werte für BCL-X sind den unter Abschnitt 2.3.2. aufgeführten Westernblotanalysen entnommen und die Werte von *bcl-x* entsprechen dem Mittelwert der relativen Bandenintensitäten der unter Abschnitt 2.3.1. aufgeführten Northernblotanalyse und den relativen Bandenintensitäten des unter Abschnitt 2.3.1. besprochenen RNase Protektionsassays. Die Daten für *bcl-x(MT)* und *bcl-x-Ct11* entsprechen den Bandenintensitäten des RNase Protektionsassays und der PCR-Analyse in Abschnitt 2.2.4. bzw. 2.2.3..

### 2.3.5. Nachweis einer *bcl-x* antisense RNA in Kulturzellen

Zum Nachweis einer *bcl-x* antisense RNA wurden Northernblotanalysen mit gesamt RNA der Zellen Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 mit strangspezifischen Hybridisierungssonden durchgeführt. Mit Hilfe der Sonde *bcl-x*<sub>cod.</sub> konnte nachgewiesen werden, daß im Bereich der kodierenden Region der *bcl-x* mRNA keine zelluläre antisense RNA existiert. Die Sonde *bcl-x*<sub>5'-NTR</sub> hybridisierte sowohl als sense- wie auch als antisense Sonde im Northernblot unter hochstringenten Bedingungen so stark mit verschiedenen RNAs, so daß keine spezifische Bande zu detektieren war (Daten hier nicht gezeigt). Der Nachweis einer antisense RNA im Bereich des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA wurde mit der antisense Sonde *bcl-x*<sub>5'-NTR</sub> im RNase-Protektionsassay durchgeführt. Der RNase-Protektionsassay ermöglicht neben dem sehr sensitiven und spezifischen Nachweis einer bestimmten RNA auch die Kartierung des Transkriptionsstarts einer RNA. In Abb. 2.3.5.1. ist das Autoradiogramm des RNase Protektionsassays zum Nachweis der 5'-NTR spezifischen *bcl-x* antisense RNA dargestellt. Es werden durch die Sonde

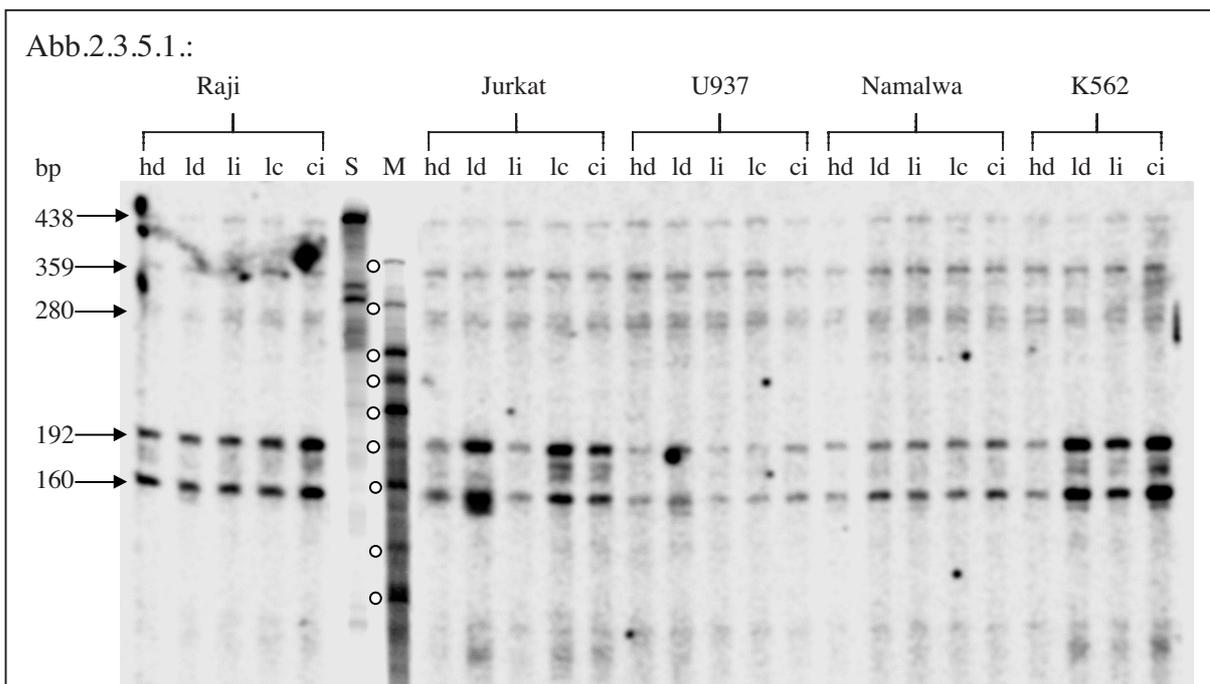
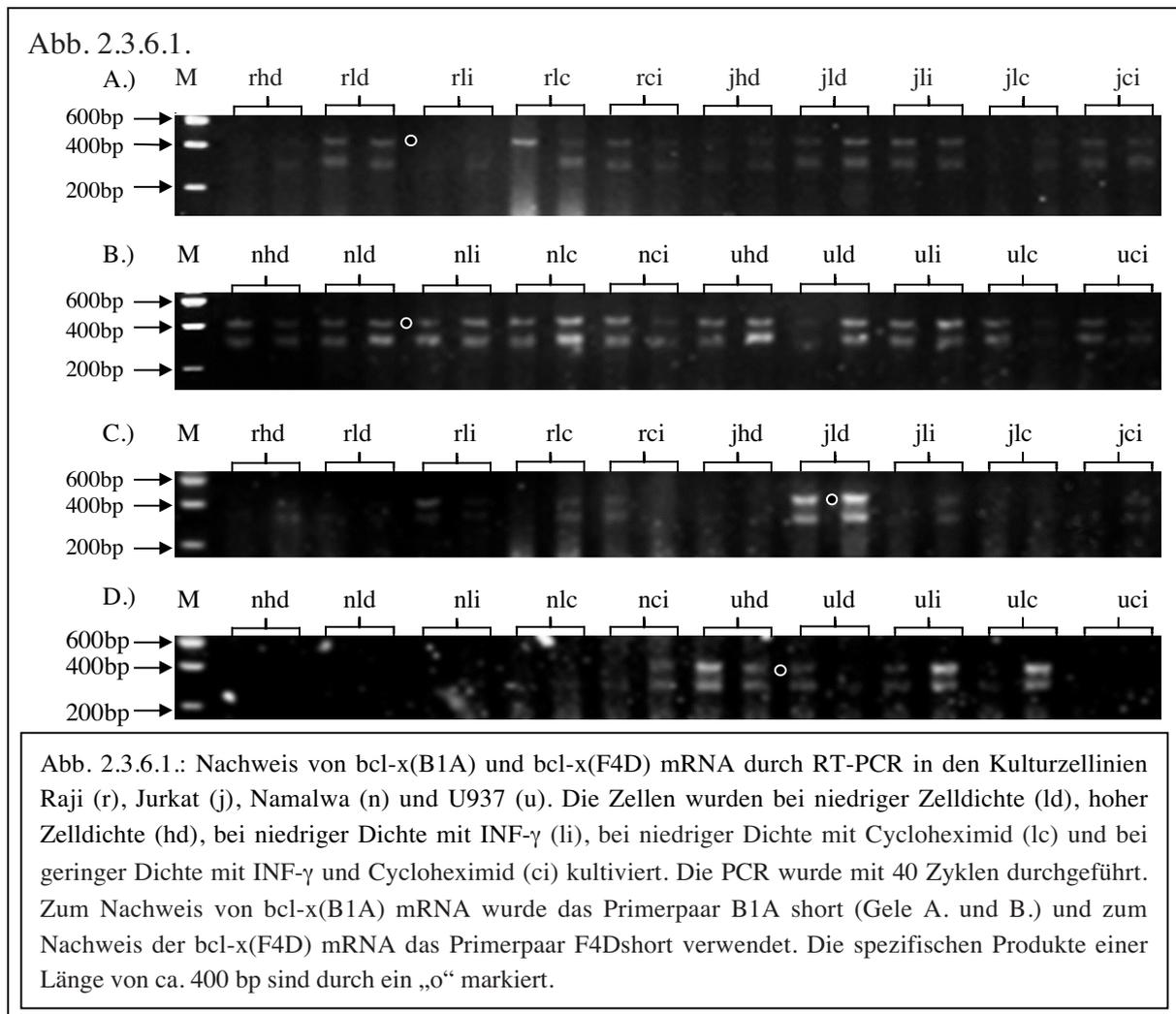


Abb. 2.3.5.1.: Nachweis und Kartierung einer *bcl-x*<sub>5'-NTR</sub> antisense-RNA in gesamt-RNA aus den Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und Jurkat durch RNase Protektionsassay. Die Zellen wurden bei hoher Dichte (hd), niedriger Dichte (ld), niedriger Dichte mit  $\text{INF-}\gamma$  (li), niedriger Dichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Dichte mit  $\text{INF-}\gamma$  und Cycloheximid kultiviert (ci). Als Hybridisierungssonde diente die [<sup>32</sup>P] markierte, ca. 450 N lange Ct11<sub>5'-NTR</sub> RNA (Spur S). Als Größenmarker (Spur M, mit „o“ gekennzeichnete Banden) dienen [<sup>32</sup>P] markierte RNA-Fragmente der Länge 398, 315, 255, 231, 210, 189, 168, 141 und 124 N. Die *bcl-x*<sub>5'-NTR</sub> antisense-RNA wird durch die geschützten Fragmente von 192- und 160 N Länge repräsentiert. Eine weitere mögliche Variante der antisense-RNA wird durch das geschützte Fragment von 359 N repräsentiert.

$bcl-x_{5'-NTR}$  je eine Fragment von 160 N und von 190 N Länge geschützt. Da beide Fragmente von einer RNA abstammen, ist die Intensität der im Autoradiogramm sichtbaren Banden gleich stark. Der mögliche Transkriptionsstart der *bcl-x* antisense RNA liegt in Position -441 relativ zum ersten Startkodon der *bcl-x* mRNA. Das durch die Sonde  $bcl-x_{5'-NTR}$  zwei Bereiche geschützt werden, liegt daran, daß die antisense RNA entweder nicht oder an anderen Stellen als die Sequenz *bcl-x*(*Ct11*) (siehe Abschnitt 2.2.1.) gespleißt ist.

### 2.3.6. Nachweis von bicistronischen *bcl-x* mRNAs in Kulturzellen

Um einen Klonierungsartefakt völlig auszuschließen und um zu überprüfen, ob es sich bei den beiden bicistronischen cDNAs um die unter Abschnitt 2.3.1. beschriebenen 3600 N langen mRNAs handelt, wurde deren Existenz durch RT-PCR mit den Primern B1A, B1AR, F4DL und F4DR nachgewiesen (siehe Abb. 2.3.6.1.).



---

Bei den isolierten, bicistronischen mRNAs B1A und F4D handelt es sich nicht um die in Abschnitt 2.3.1. und 2.2.1. beschriebenen mRNAs von 3.600 bzw. 4.000 N Länge, da die mRNA für *bcl-x(B1A)<sub>L</sub>*, bzw. *bcl-x(F4D)<sub>L</sub>* nur in so geringer Menge vorliegt, daß die Amplifikation mit 40 Zyklen durchgeführt werden mußte, um ein detektierbares PCR-Produkt zu erhalten. Es wurden für jeden zu untersuchenden Parameter Doppelbestimmungen, d.h. zwei PCRs durchgeführt, da die PCR bei so hoher Zykluszahl unzuverlässig ist. Wie unter „Nachweis der *bcl-x* mRNA in verschiedenen Zelllinien“ beschrieben wurde, ist die Menge an 3.600 N langer, *bcl-x* verwandter mRNA in Jurkat Zellen genauso hoch, wie die Menge an 2.700 N langer *bcl-x* mRNA. In der RT-PCR wäre, wenn einer der beiden Klone dieser RNA entspräche, ein sehr viel stärkeres Signal zu erwarten. Da die Expression von MHC-1b in U937 Zellen direkt INF- $\gamma$  abhängig ist [60], wurde die Abhängigkeit der B1A-Expression von INF- $\gamma$  in den Kulturzellen Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 überprüft. Die Expression von B1A ist in keiner der untersuchten Zelllinien von INF- $\gamma$  abhängig, sondern ausschließlich von der Zelldichte, d.h. von Wachstumsfaktoren. In Raji-Zellen führt der Einfluß von INF- $\gamma$  zu einer Hemmung der Expression von B1A (siehe Abb. 2.1.4.2.). Die mRNA von F4D wird in den Zelllinien K562 und Namalwa nicht exprimiert, ist in U937 Zellen nur schwach nachzuweisen, in Raji-Zellen nur unter INF- $\gamma$  Einfluß und in Jurkat Zellen bei niedriger Zelldichte und INF- $\gamma$  Einfluß.

#### **2.4. Funktion des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA**

Die im vorigen Abschnitt präsentierten Ergebnisse stellen einen deutlichen Hinweis auf eine translationskontrollierte Expression des *bcl-x* Gens dar. Wie in Abschnitt 1.3. dargestellt wurde, existieren drei mögliche Mechanismen, die Translation einer mRNA, die über einen langen strukturierten 5'-NTR verfügt, zu kontrollieren. Sämtliche in Abschnitt 2.2.3. und 2.2.4. beschriebenen Start- und Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA haben einen 5'-NTR, der länger als 250 N ist. Die Struktur der in Abschnitt 2.2.2. beschriebenen bicistronischen *bcl-x* mRNAs, deren intercistronische Region dem 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA entspricht, deutet darauf hin, daß die Translation der *bcl-x(MT)* mRNA unabhängig von einer 5'-CAP Struktur erfolgt und durch internen Ribosomeneintritt initiiert wird. Die Abhängigkeit der Translation der *bcl-x(MT)* mRNA von einer 5'-CAP Struktur wurde durch *in vitro* Translation einer *ffLuciferase* mRNA untersucht, die keinen 5'-NTR oder den 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA in sense- oder antisense-Orientierung trug. Jede dieser drei Reporter mRNAs wurde jeweils mit- oder ohne 5'-CAP

---

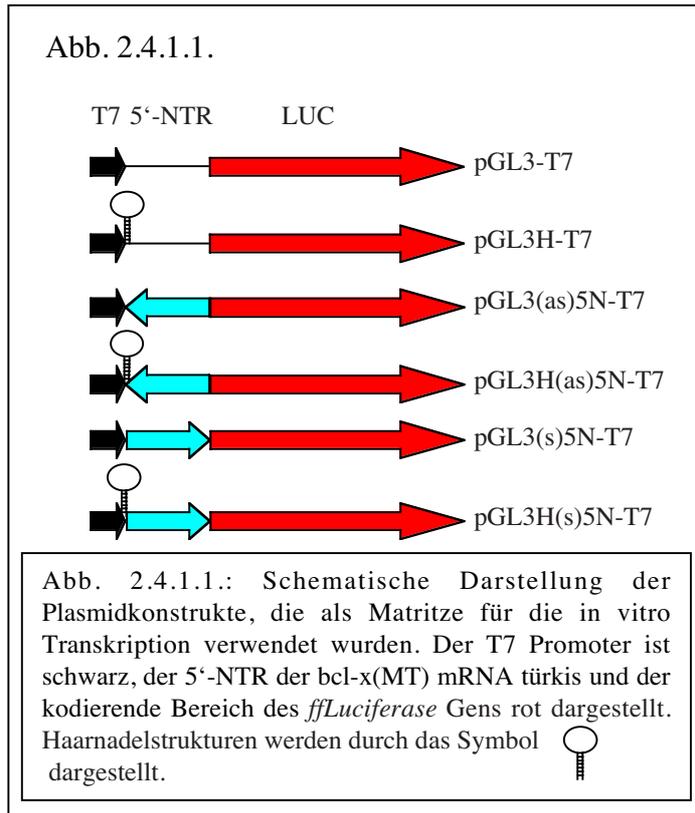
---

Struktur synthetisiert und diente als Matritze in einer *in vitro* Translationsreaktion. Die Translationseffizienz wurde durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abschnitt 2.4.1. dargestellt und zeigen, daß die Translation der *bcl-x(MT)* mRNA unabhängig von einer 5'-CAP Struktur erfolgt. Eine stabile Haarnadelstruktur, die sich im 5'-NTR einer mRNA befindet, kann die Translation dieser mRNA effizient inhibieren (siehe Abschnitt 1.3.1.). Eine mögliche Initiation der Translation der *bcl-x(MT)* mRNA durch internen Ribosomeneintritt wurde durch *in vitro* Translation der oben beschriebenen *ffLuciferase* mRNAs, die an ihrem 5'-Ende eine stabile Haarnadelstruktur trugen, untersucht. Die Ergebnisse dieser in Abschnitt 2.4.2. dargestellten Experimente zeigen, daß die Translation der *bcl-x(MT)* mRNA durch internen Ribosomeneintritt initiiert wird, d.h., daß der 5'-NTR dieser mRNA eine IRES enthielt. In Abschnitt 2.4.3. sind weitere Experimente zum Nachweis einer IRES im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA dargestellt. Hier wurde der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA als intercistronische Region (ICR) in einem bicistronischen Reportergenkonstrukt eingesetzt, dessen erstes Cistron aus der kodierenden Sequenz des *eGFP* Gens- und dessen zweites Cistron aus der kodierenden Sequenz des *ffLuciferase* Gens bestand. Mit diesen bicistronischen Reporterkonstrukten wurden die humanen Kulturzellen Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 transient transfiziert. Durch Messung der Luciferaseaktivität und der relativen GFP-Fluoreszenz und durch Vergleich verschiedener ICRs konnte nachgewiesen werden, daß der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA eine IRES enthält. Durch die in Abschnitt 2.4.4. beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, daß die Orientierung des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA einen enormen Einfluss auf den Translationsstart hat. Diese Sequenz stellt in *sense* Orientierung einen einheitlichen Translationsstartpunkt sicher, während sie in *antisense* Orientierung die Translation von mindestens vier verschiedenen Startpunkten aus ermöglicht.

### **2.4.1. Abhängigkeit der Translation der *bcl-x* mRNA von einer 5'-CAP Struktur**

Die Fähigkeit des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA, die Initiation der CAP-unabhängigen Translation *in vitro* zu unterstützen, wurde mit Hilfe monocistronischer RNAs untersucht. Diese RNAs wurden mit den Plasmidkonstrukten pGL3(as)5N-T7, pGL3(s)5N-T7 oder pGL3-T7 (siehe Abb. 2.4.1.1.) als Matritze durch *in vitro* Transkription synthetisiert. Diese Plasmidkonstrukte trugen den T7 Promoter und den 5'-NTR der *bcl-x* mRNA in

---



antisense- (pGL3(as)5N-T7) oder sense Orientierung (pGL3(s)5N-T7) vor dem Gen der Leuchtkäferluciferase (siehe Abb. 2.4.1.1.). Als Kontrolle diente eine 5'-CAP-abhängige RNA, die keinen 5'-NTR enthielt (pGL3-T7). Monocistronische mRNAs mit und ohne 5'-CAP-Struktur wurden mit den linearisierten Plasmidkonstrukten (pGL3(as)5N-T7), (pGL3(s)5N-T7) oder (pGL3-T7) als Matritze durch *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase synthetisiert. Die *in vitro* transkribierten RNA wurde gereinigt, auf einem denaturierenden Ag-

arosegel analysiert (siehe Abschnitt 3.8.2.) und ihre Konzentration bestimmt. Gleiche Mengen der verschiedenen Konstrukte mit und ohne 5'-CAP-Struktur wurden mit Hilfe von Kaninchenretikulozytenlysat *in vitro* translatiert und die Translationseffizienz durch Messung der Luciferaseaktivität des Ansatzes gemessen. Die Abhängigkeit der Translation von einer 5'-CAP-Struktur der mRNA wurde durch Berechnung des Verhältnisses der Luciferaseaktivität von Reaktionsansätzen, in denen RNA ohne 5'-CAP Struktur als Matritze diente und Ansätzen, in denen RNA mit 5'-CAP Struktur als Matritze vorlag, ermittelt ( $\text{NC/C-Verhältnis} = \text{Luc.Akt.}_{\text{NonCAP}} / \text{Luc.Akt.}_{\text{CAP}}$ ; siehe Abb.2.4.1.2.). Das NC/C-Verhältnis der CAP-abhängigen *pGL3-T7* mRNA wurde, unabhängig von der Konzentration des Kaninchenretikulozytenlysat im *in vitro* Translationsansatz willkürlich gleich 1 gesetzt. Die Translationseffizienz der *pGL3-T7* mRNA ohne 5'-CAP Struktur war nur ca. halb so hoch wie die der *pGL3-T-CAP* mRNA (Daten hier nicht gezeigt). Das NC/C-Verhältnis der *pGL3(s)5N-T7* mRNA betrug, je nach Konzentration des zur *in vitro* Translation eingesetzten Kaninchenretikulozytenlysat, 1.82 bzw. 2.41 (siehe Abb.2.4.1.2.). Das NC/C Verhältnis der *pGL3(as)5N-T7* mRNAs betrug, je nach Konzentration des zur *in vitro* Translation eingesetzten Kaninchenretikulozytenlysat, 1.57 bzw. 1.35. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß der 5'-NTR der *bcl-x* mRNA die CAP-unabhängige Translation *in vitro* ermöglicht. Eine 5'-CAP Struktur senkt die Effizienz der CAP-unabhängigen Translation der *pGL3(s)5N-T7* mRNA in ähnlichem Umfang wie die Denaturierung der mRNA (Daten hier nicht gezeigt).

Abb. 2.4.1.2.

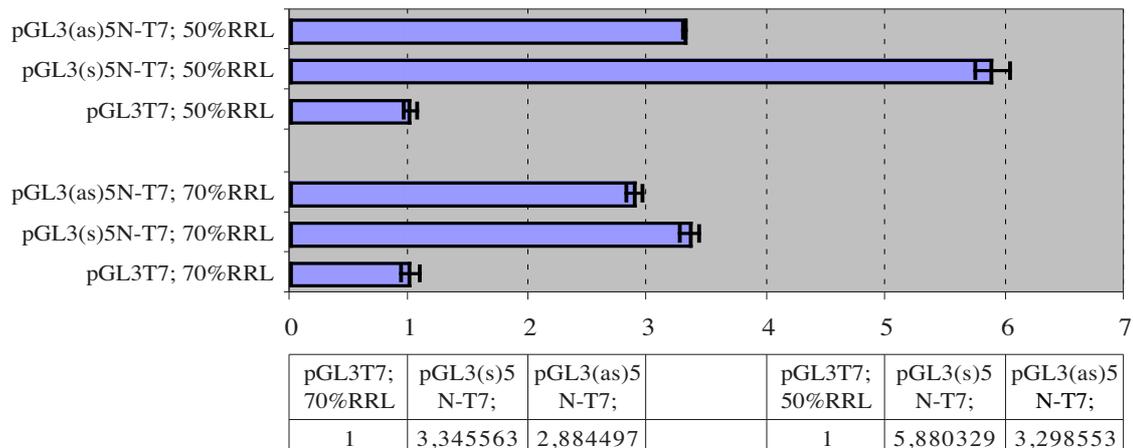
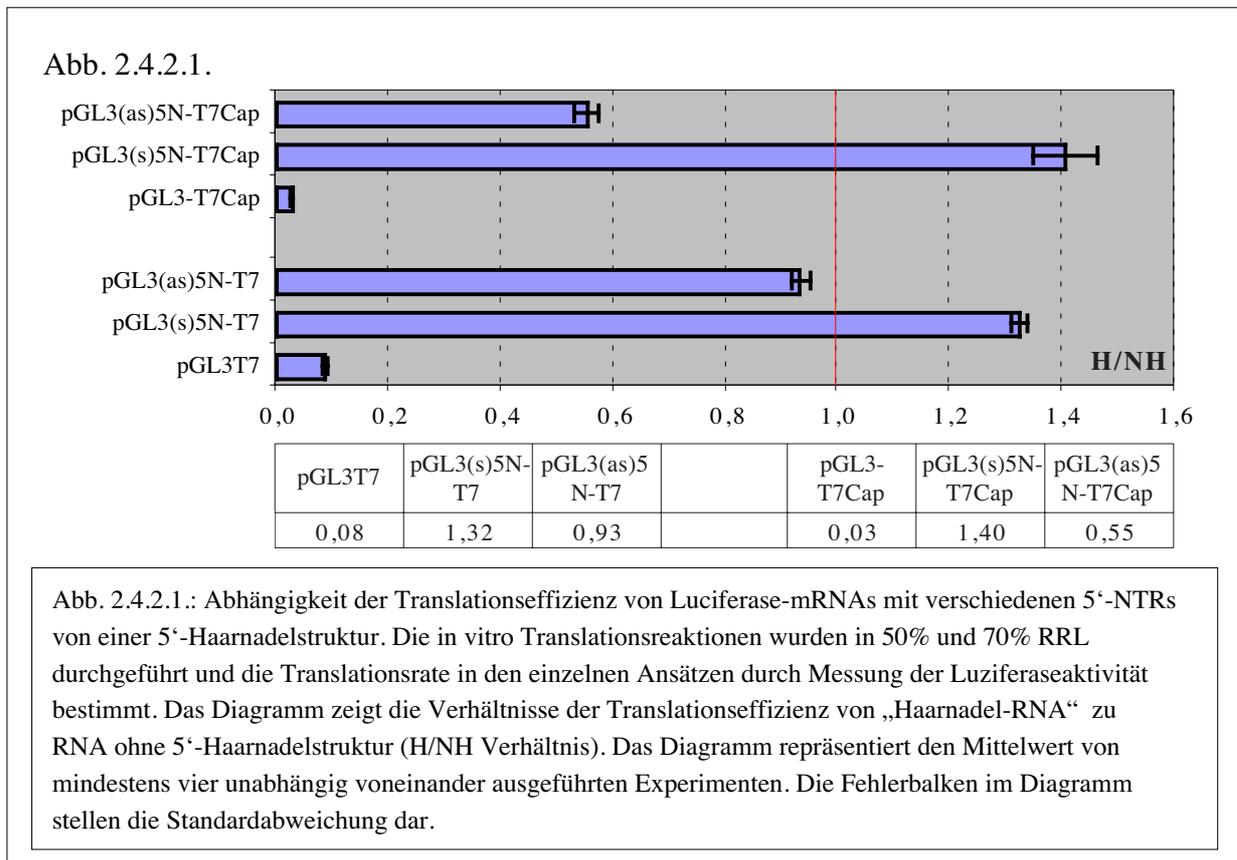


Abb. 2.4.1.2. Translationseffizienz von Luciferase mRNAs mit verschiedenen 5'-NTRs in Abhängigkeit von einer 5'-CAP Struktur. Die *in vitro* Translationsreaktionen wurden in 50% bzw. 70% RRL durchgeführt und die Translationseffizienz in den einzelnen Ansätzen durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Das Diagramm zeigt das Verhältnis der Translationseffizienz von mRNAs ohne 5'-CAP zur Translationseffizienz von 5'-CAP mRNAs (NC/C Verhältnis). Das NC/C Verhältnis von mRNA ohne 5'-NTR (pGL3-)T7 wurde willkürlich gleich 1 gesetzt. Das Diagramm repräsentiert die Ergebnisse von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 2.4.2. Einfluß einer 5'-Haarnadelstruktur auf die Translation der *bcl-x* mRNA

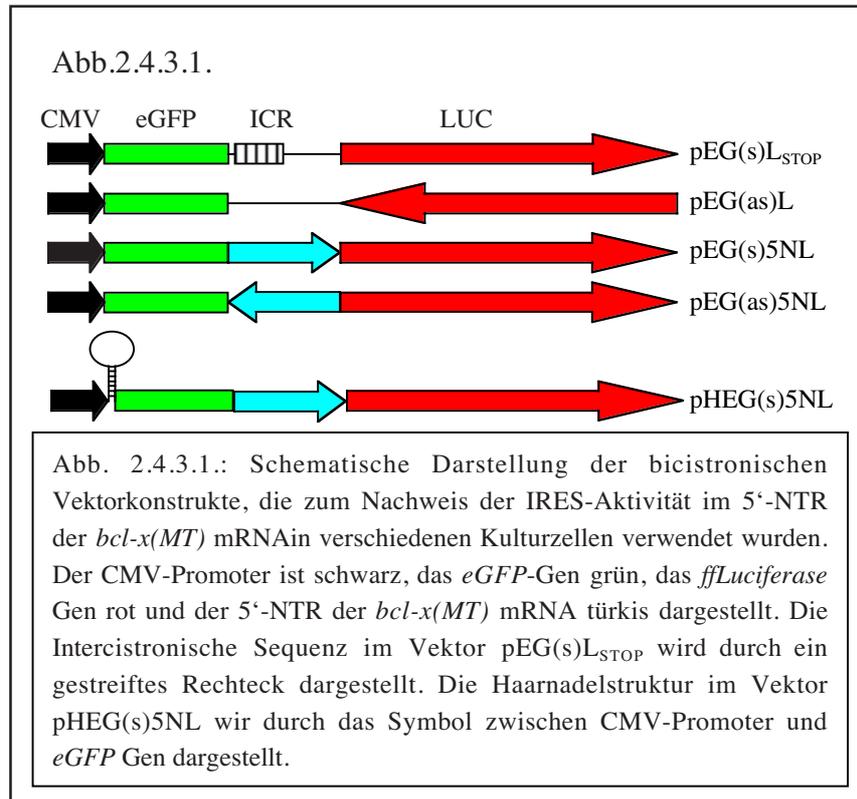
Um die Möglichkeit der internen Initiation der Translation im 5'-nichttranslatierten Bereich der *bcl-x* mRNA zu überprüfen, wurde in den Konstrukten pGL3(s)5N-T7 und pGL3(as)5N-T7 zwischen den T7-Promoter und den 5'NTR der *bcl-x* mRNA und beim Konstrukt pGL3-T7 zwischen T7-Promoter und das *ffLuciferase* Gen eine stabile Haarnadelstruktur eingefügt. Eine stabile Haarnadelstruktur am 5'-Ende einer mRNA verhindert die klassische Initiation der Translation nach dem „ribosome scanning“ Modell [136]. Diese Haarnadelstruktur wurde aus der multiplen Klonierungsstelle des Plasmidvektors pBluescriptSK II erzeugt. Es wurden gleiche Mengen mRNA mit und ohne 5'-CAP Struktur, die durch *in vitro* Transkription mit den linearisierten Plasmidkonstrukten pGL3-T7, pGL3H-T7, pGL3(s)5N-T7, pGL3H(s)5N-T7, pGL3(as)5N-T7 und pGL3H(as)5N-T7 synthetisiert wurden, zur *in vitro* Translation mit Kaninchenretikulozytenlysat eingesetzt. Die Translationseffizienz der einzelnen mRNAs wurde durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Das Verhältnis der Luciferaseaktivität in

Translationsansätzen mit 5'-Haarnadel-RNA zur Luciferaseaktivität in Translationsansätzen, in denen die mRNA keine 5'-Haarnadelstruktur trug (H/NH), wurde verwendet, um die mögliche interne Initiation der Translation zu bestimmen. Durch die Einführung einer Haarnadelstruktur am 5'-Ende wird die Translation von *pGL3-T7* mRNA um ca. 91% ( $H/NH = 0.0847 \pm 0.0052$ ), und die Translation der *pGL3-T7CAP* mRNA um ca. 97% ( $H/NH = 0.027 \pm 0.0025$ ) gehemmt. Die Translation der *pGL3(as)5N-T7*- bzw. der *pGL3(as)5N-T7CAP* mRNA wird um ca. 7% ( $H/NH = 0.933 \pm 0.017$ ) bzw. um 45% ( $H/NH = 0.552 \pm 0.021$ ) gehemmt. Die Translation der *pGL3(s)5N-T7*- bzw. der *pGL3(s)5N-T7CAP* RNA wird um 32% ( $H/NH = 1.323 \pm 0.014$ ) bzw. um 40% ( $H/NH = 1.404 \pm 0.057$ ) gesteigert (siehe Abb. 2.4.2.1.). Die Steigerung der Translationseffizienz bei den *pGL3(s)5N-T7* mRNAs ist auf eine interne Initiation der Translation durch eine IRES im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA zurückzuführen.



### 2.4.3. Steuerung der Synthese des Bcl-x Proteins durch eine IRES

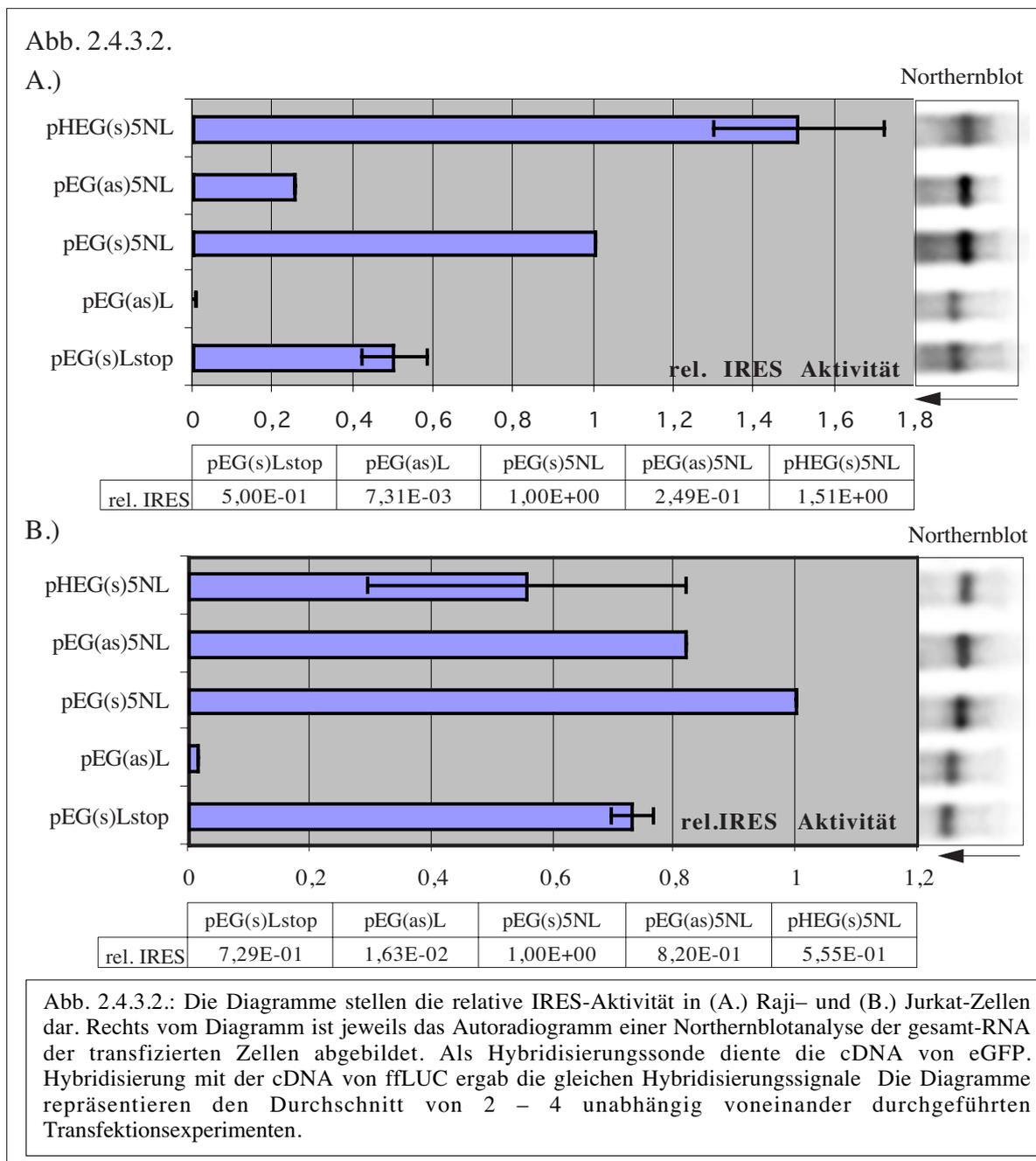
Um zu untersuchen, ob die CAP-unabhängige Translation, die in Kaninchenretikulozytenlysat beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 2.4.1. und 2.4.2.), tatsächlich durch eine IRES im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA ermöglicht wird, wurde eine Reihe



bicistronischer Vektoren konstruiert. Diese Strategie basiert auf dem Prinzip, daß der zweite offene Leserahmen (ORF) einer bicistronischen mRNA nach dem CAP-abhängigen Ribosomen-Scanning Modell [179] nicht exprimiert wird, wenn ihm keine IRES vorangeht. Die oben genannten bicistronischen Vektoren trugen als ersten offenen Leserahmen (ORF) die kodierende Sequenz des

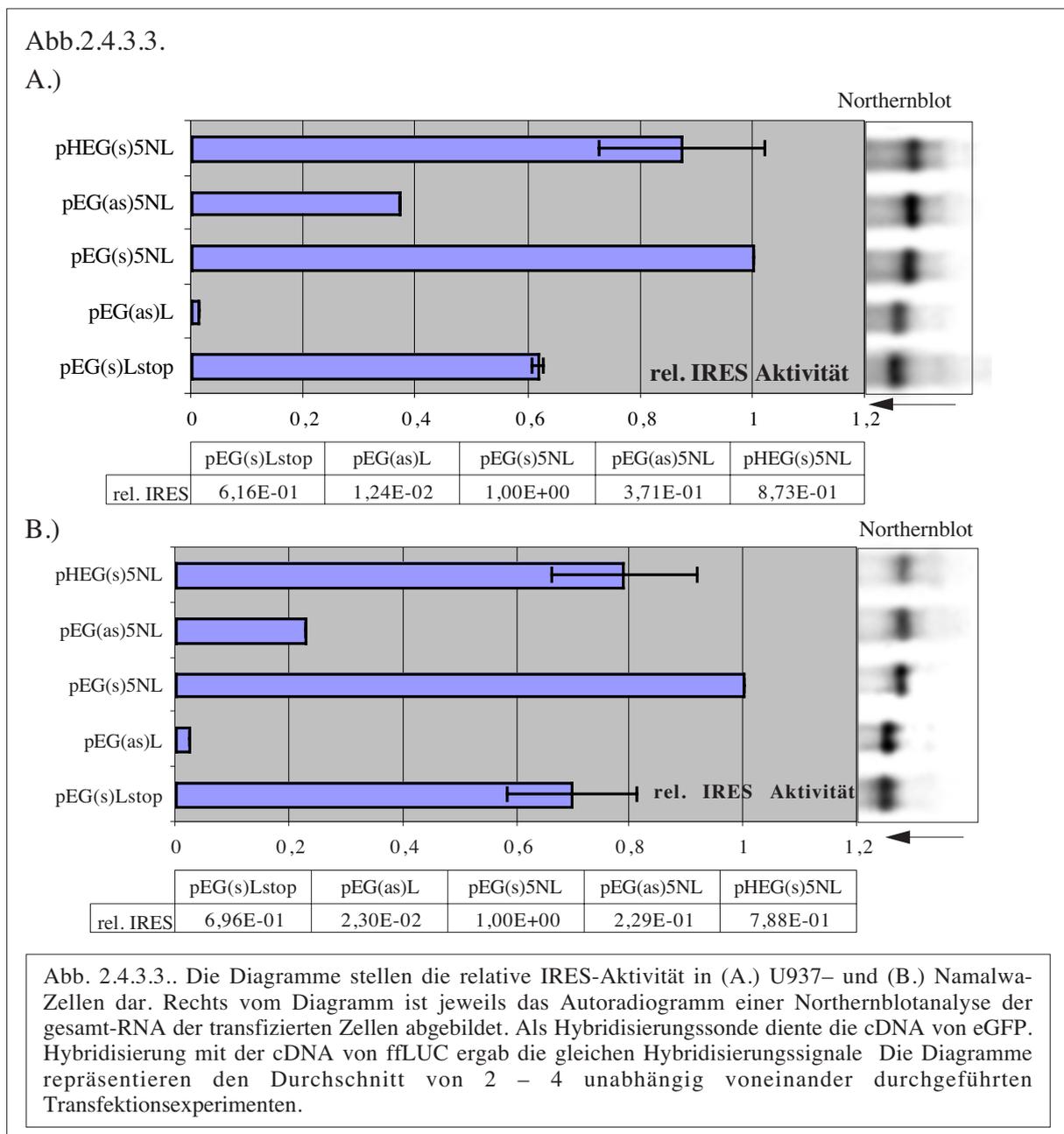
*eGFP* Gens unter Kontrolle des CMV-Promoters und als zweiten offenen Leserahmen (ORF) die kodierende Sequenz des *ffLuciferase* Gens. In die intercistronische Region (ICR) des Vektors pEG(s)L (siehe Abb.2.4.3.1.) wurde eine 120 bp lange Sequenz eingebaut, die 7 Stop-Kodons im Leseraster des *eGFP* Gens enthielt (pEG(s)<sub>LSTOP</sub>). Die Konstrukte pEG(s)5NL und pEG(as)5NL trugen in der ICR die Sequenz des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA in sense Orientierung bzw. in antisense-Orientierung. Zur Kontrolle der IRES-Aktivität wurde in den Vektor pEG(s)5NL zwischen CMV-Promoter und Startkodon des *eGFP* Gens eine stabile Haarnadelstruktur eingefügt. Als weitere Kontrolle diente ein Vektor, in den das *ffLuciferase* Gen hinter dem *eGFP* Gen in antisense Orientierung eingebaut wurde (pEG(as)L). Die verschiedenen bicistronischen Vektorkonstrukte wurden verwendet, um Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 Zellen durch Elektroporation mit je 25 µg der oben genannten Plasmide transient zu transfizieren. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden in jedem Ansatz 12.5 µg des Plasmidvektors pRL-CMV kotransfiziert. Die Analyse der gesamt-RNA im Northernblot zeigte,

daß die exprimierte bicistronische mRNA die erwartete Größe von 2600 – 3000 N aufwies. Die Abwesenheit von zusätzlichen, kleineren RNA-Banden zeigte, daß weder die exprimierte bicistronische mRNA gespleißt wurde noch ein aktiver interner Promoter in den bicistronischen Vektorkonstrukten vorlag. 24 h nach der Transfektion der Zellen wurde die Menge an exprimiertem eGFP-Protein durch FACS-Analysen und fluorometrische Messung bestimmt. Die Expression von ffLuciferase aus den bicistronischen Vektoren und renLuciferase aus pRL-CMV erfolgte durch Messung der Luziferaseaktivität. Zur Bestimmung der IRES-Aktivität der Intercistronischen Region wurde das Verhältnis der ffLuciferaseaktivität zur eGFP-Fluoreszenz bestimmt. Die relative IRES-Aktivität ist das ffLUC/eGFP-Verhältnis aller transfizierten bicistronischen Kon-



strukture, bezogen auf das fFLUC/eGFP-Verhältnis des Konstruktes pEG(s)<sub>Lstop</sub>, das willkürlich gleich eins gesetzt wurde. Abb.2.4.3.2. und Abb. 2.4.3.3. zeigen die relative IRES-Aktivität für jedes eingesetzte bicistronische Plasmidkonstrukt in den verschiedenen transfizierten Zelllinien. Die relativ hohe Luziferaseaktivität in den mit pEG(s)<sub>Lstop</sub> transfizierten Zellen ist auf eine Translation des zweiten Cistrons einer IRES-losen RNA zurückzuführen. Diese Translationsaktivität ist ein Hinweis auf „leaky Scanning“, Durchlesen, Reinitiation oder die Translation nichtdetektierbarer Abbauprodukte der bicistronischen RNAs. Alle Reportergene haben um das Startkodon eine Kozak-Konsensussequenz [138], die eine effiziente Initiation der Translation bei mRNAs mit kurzem 5'-NTR erlaubt.

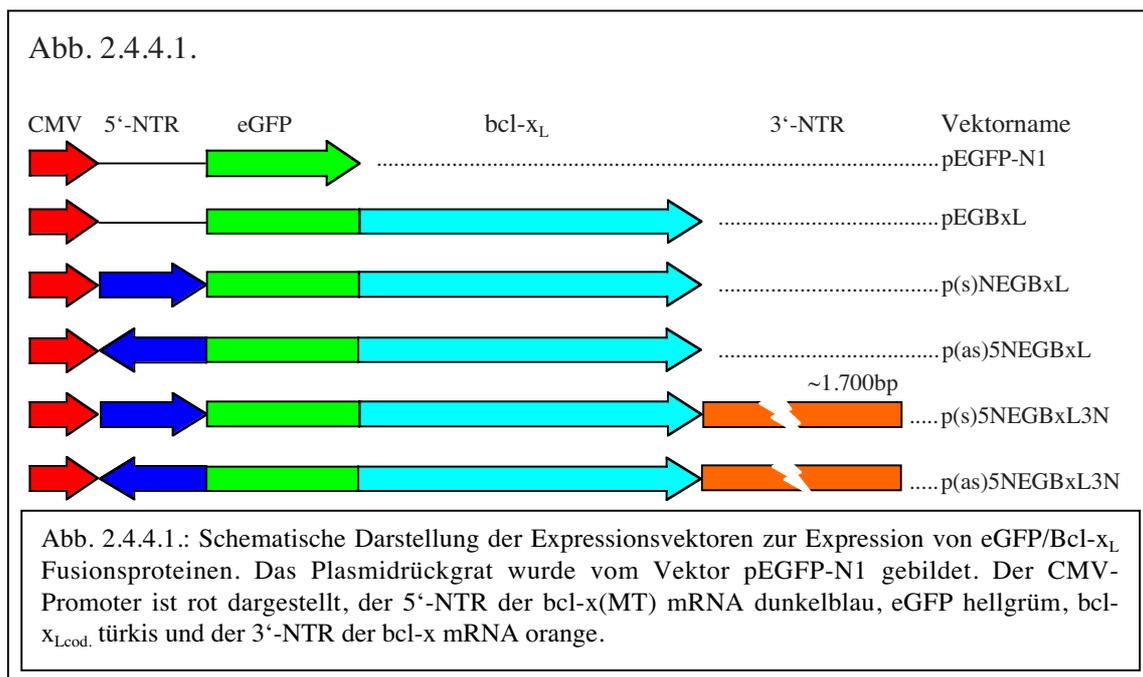
In Raji-Zellen bewirkt der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA eine Steigerung der IRES-Akti-



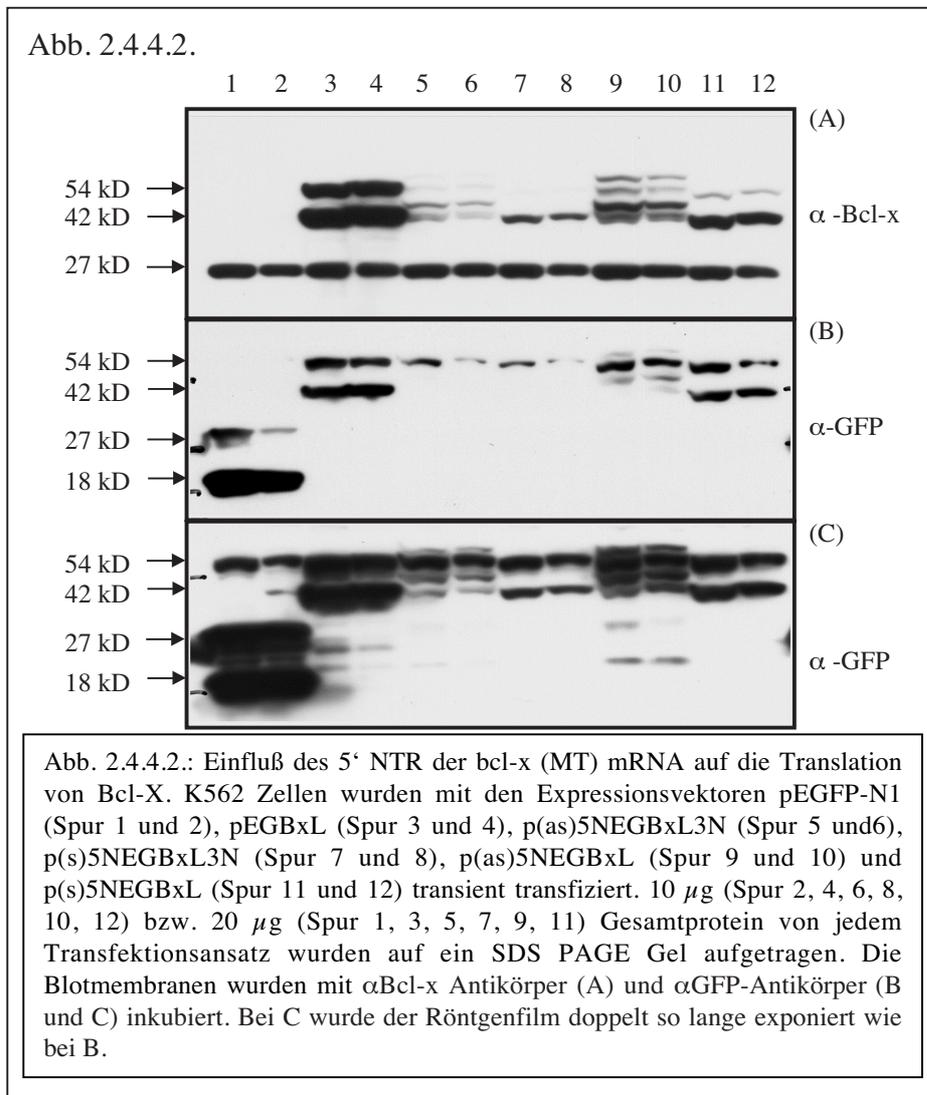
vität um den Faktor 2. Bezieht man die IRES-Aktivität auf das Konstrukt pEG(as)5NL, steigert sich hier die Aktivität um das Vierfache. In U937-Zellen beträgt die relative IRES-Aktivität 1.62, bzw. 2.69 und in Namalwa-Zellen 1.44 bzw. 4.35. In K562-Zellen konnte mit den oben genannten bicistronischen Vektorkonstrukten keine IRES-Aktivität nachgewiesen werden.

#### 2.4.4. Der 5' NTR der *bcl-x(MT)* mRNA ermöglicht einen einheitlichen Translationsstart

Um den Einfluß des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA auf die Initiation der Translation zu überprüfen, wurden verschiedene Vektoren zur Expression eines eGFP/Bcl- $x_L$  Fusionsproteins konstruiert. Die Expression von eGFP/Bcl- $x_L$  war bei den im folgenden beschriebenen Experimenten notwendig, um zum einen das exprimierte Protein vom zellulären Bcl- $x_L$  unterscheiden zu können und zum anderen, um mit zwei verschiedenen Antikörpern die Expression nachweisen zu können. Mit Hilfe der Konstrukte p(s)5NEGBxL und p(as)5NEGBxL, die das eGFP/Bcl- $x_L$  Fusionsprotein exprimieren (siehe Abb. 2.4.4.1.), wurde der Einfluß der Orientierung des 5'-NTR auf die Translation der *bcl-x(MT)* mRNA untersucht. Als Kontrolle dienten die Vektoren pEGFP-N1 und pEGBxL, die das eGFP-Protein bzw. das eGFP/Bcl- $x_L$  Fusionsprotein exprimieren (siehe Abb. 2.4.4.1.). Die Konstrukte p(s)5NEGBxL3N und p(as)5NEGBxL3N entsprechen den Konstrukten p(s)5NEGBxL und p(as)5NEGBxL, enthalten aber zusätzlich den 3'-NTR der *bcl-x\_L* mRNA. K562 Zellen wurden mit den oben beschriebenen Expressionsvektoren



ren transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Westernblot analysiert. In Abb. 2.4.4.2. ist das Ergebnis dargestellt. In Zellen, die mit den Kontrollkonstrukten pEGFP-N1 oder pEGBxL transfiziert wurden, können

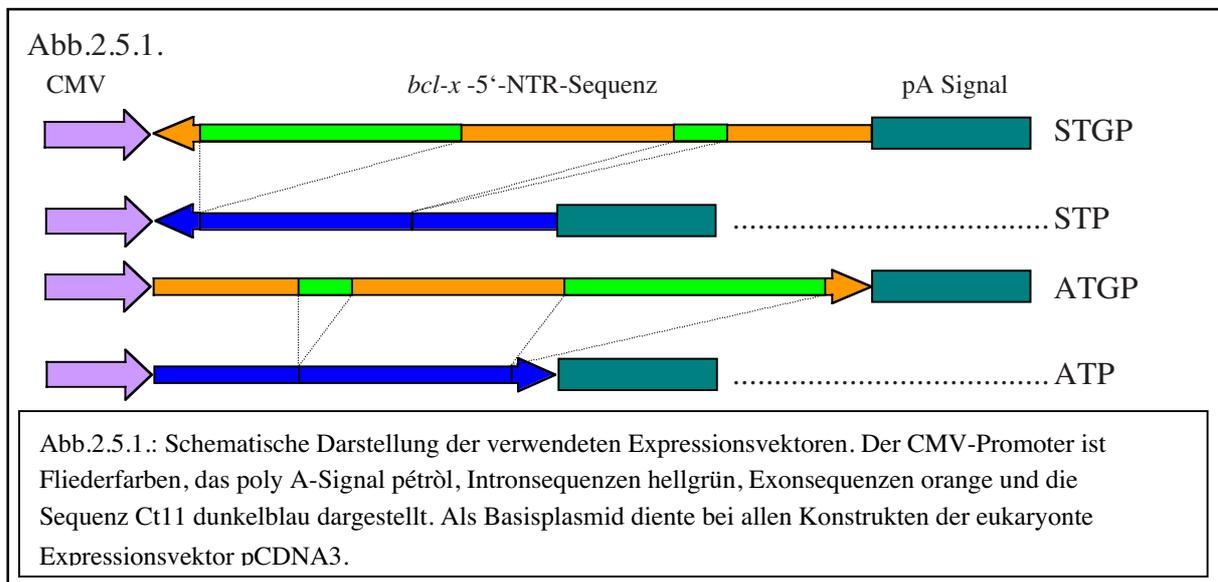


die Proteine eGFP (~ 27 kD) bzw. eGFP/Bcl-xL (~ 54 kD) ohne Hintergrundbanden nachgewiesen werden. Die zusätzlichen, kürzeren Banden, die einem Protein mit dem Molekulargewicht von ca. 18 kD bzw. 42 kD entsprechen, stellen nicht- oder partiell denaturiertes Protein dar. eGFP ist ein außerordentlich stabiles Protein, das nur unter extrem harten Bedingun-

gen vollständig denaturiert werden kann [179]. Das Bandenmuster, das sich im Gesamtprotein von Zellen, die mit den Konstrukten p(s)5NEGBxL oder p(s)5NEGBxL3N transfiziert wurden, darstellen läßt, entspricht dem oben beschriebenen Bandenmuster der mit Kontrollvektoren transfizierten Zellen (siehe Abb. 2.4.4.2.). Nach Transfektion mit den Expressionskonstrukten p(as)5NEGBxL3N und p(as)5NEGBxL sind im Gesamtprotein der transfizierten Zellen neben den Proteinen mit dem Molekulargewicht 54 kD und 42 kD in fast gleicher Stärke Proteine mit dem Molekulargewicht 60 – bzw. 47 kD nachzuweisen. Der 5'-NTR der *bcl-x*(MT) mRNA in sense Orientierung ermöglicht einen einheitlichen Translationsstart.

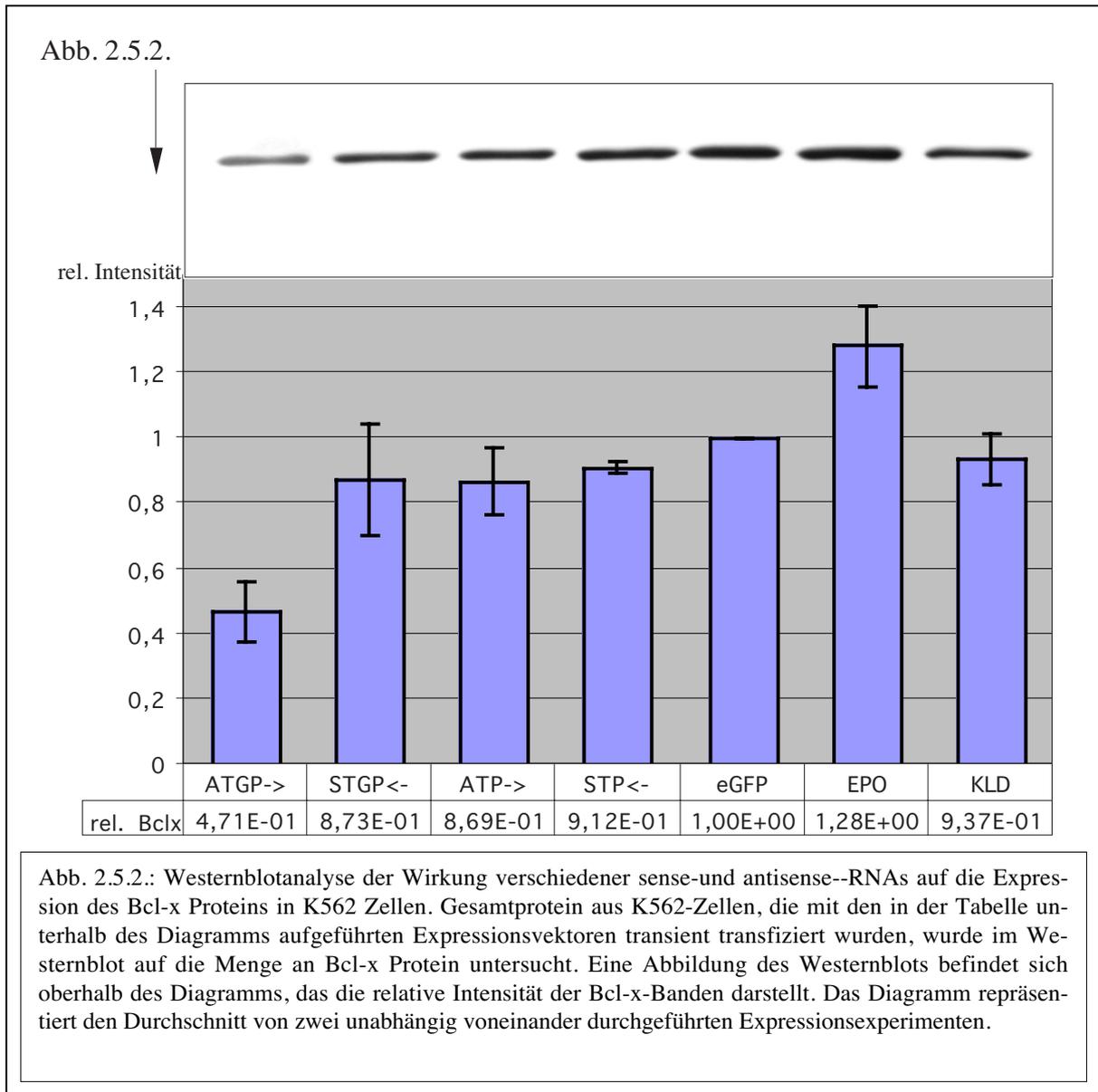
## 2.5. Inhibition der Bcl-x Translation durch Expression von sense- und antisense RNA in K562 Zellen

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 2.3.5. beschriebene *bcl-x* antisense RNA einen direkten Einfluß auf die Expression von Bcl-x hat, wurden K562 Zellen durch Elektroporation mit Expressionsplasmiden transfiziert (siehe Abb. 2.5.1.), die unter Kontrolle des CMV-Promoters die ungespleißte Form des 5'-NTR des *bcl-x* Gens von Position -83 bis -854 in sense Orientierung (pCDNA3.1-ATGP) bzw. antisense Orientierung (pCDNA3.1-STGP) und den 5'-NTR der *bcl-x*(Ct11) mRNA in sense Orientierung (pCDNA3.1-ATP) bzw. antisense Orientierung (pCDNA3.1-STP) exprimieren.



Desweiteren kann mit diesem Experiment nachgewiesen werden, ob die IRES-vermittelte Initiation der Translation (siehe Abschnitt 2.4.2. und 2.4.3.) der *bcl-x* mRNA durch den Einsatz von antisense RNA im Bereich des 5'-NTR der *bcl-x*(MT) mRNA inhibierbar ist. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Expressionsvektor pEGFP-N1 kotransfiziert. Zur Kontrolle des Einflusses der Elektroporation auf die zelluläre Bcl-x Translation wurden K562-Zellen nur mit pEGFP-N1 bzw. ohne Plasmid elektroporiert. Zur Bestimmung des Basiswertes wurden K562 Zellen verwendet, die bei niedriger Zelldichte (1d) kultiviert wurden. 18h nach der Transfektion wurden aus den Zellen gesamt-RNA und Gesamtprotein isoliert und die Transfektionsrate durch FACS-Analyse bestimmt. Das Gesamtprotein der mit den oben beschriebenen Expressionsvektoren transfizierten Zellen wurde im Westernblot analysiert, um die Menge an Bcl-x Protein zu bestimmen (siehe Abb. 2.5.2.). Die Menge an *bcl-x* mRNA wurde durch RT-PCR bestimmt. Die Expression von *bcl-x*<sub>(5'-NTR)</sub> sense -bzw. antisense-RNA hatte keinen nachweisbaren Einfluß auf die Transkription des *bcl-x* Gens (Daten hier nicht aufgeführt). Auf Proteinebene konnte durch die Expression der ATGP-RNA

eine Reduzierung der Bcl-x Menge um 40% – 60 % gegenüber mit eGFP-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. (siehe Abb. 2.5.2.). Die Expression von *STGP*, *ATP*- oder *STP*-RNA zeigte keine signifikante Wirkung auf die Translation von Bcl-x.



Die hier beschriebenen Versuche, die Translation von Bcl-x durch Expression verschiedener Spleißvarianten des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA zu inhibieren, geben einen weiteren Hinweis auf die aktiv translatierte *bcl-x* mRNA Variante. Allerdings muß hier noch der genaue Mechanismus der Wirkung von *ATGP*-RNA auf die Translation der *bcl-x* mRNA diskutiert werden.