

2. ERGEBNISSE

2.1. Struktur des *bcl-x* Gens

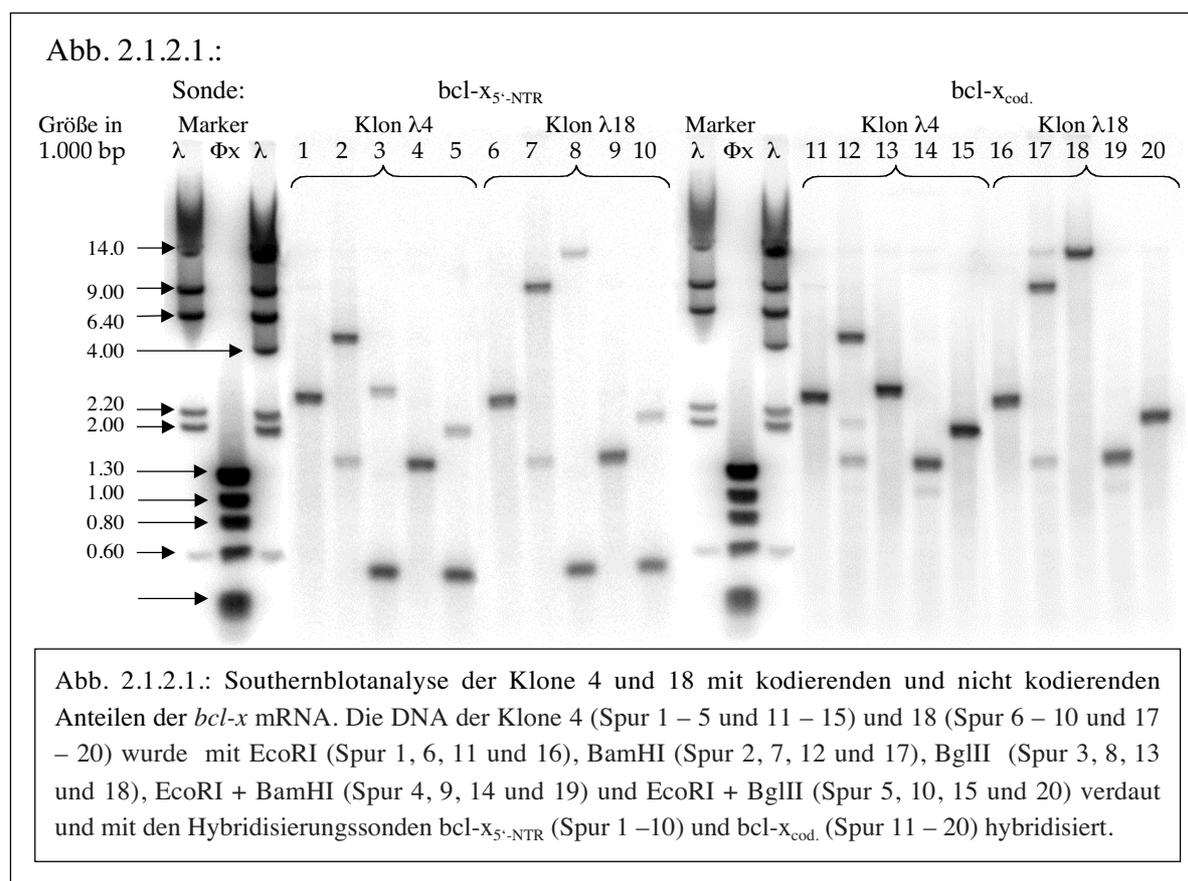
Die Struktur und die Sequenz von Exon 1, 2 und 3, von Intron 1 und einem Teil des 5'-nichtkodierenden Bereiches (5'-NCR) des *bcl-x* Gens der Maus ist vor einiger Zeit aufgeklärt worden [101]. Vom humanen *bcl-x* Gen waren nur die Sequenz des kodierenden Bereiches der *bcl-x* mRNA sowie ein relativ kurzer 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

2.1.2. Restriktionskartierung des *bcl-x* Gens

Um die tatsächliche Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens zu ermitteln, wurde eine λ -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_L* mRNA (*bcl-x_{cod}*) und zum anderen die mit [³²P] markierte cDNA des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA (*bcl-x_{5'-NTR}*; 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 BglII verdaut wurden, zeigten nach

Abb. 2.1.2.2.

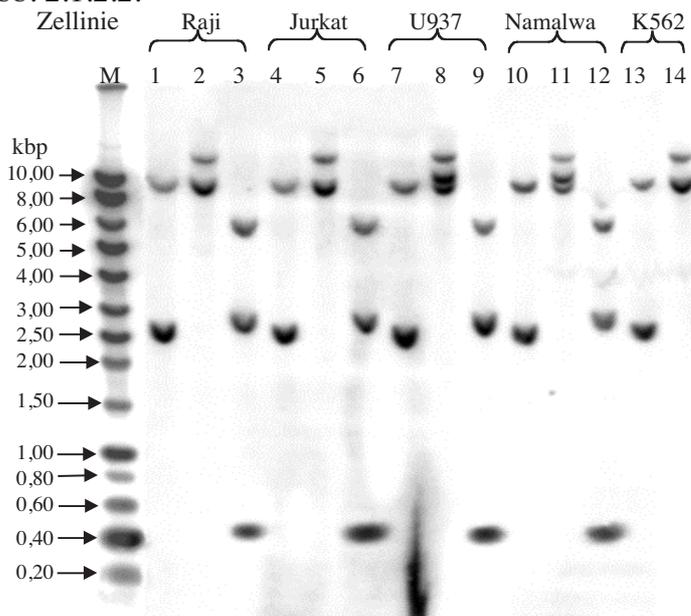


Abb. 2.1.2.2.; Southernblotanalyse von genomischer DNA aus verschiedenen humanen Zelllinien. Die genomische DNA aus den Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 wurde mit EcoRI (Spur 1, 4, 7, 10 und 13), BamHI (Spur 2, 5, 8, 11 und 14) und BglII (Spur 3, 6, 9 und 12) verdaut und mit den Hybridisierungssonden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

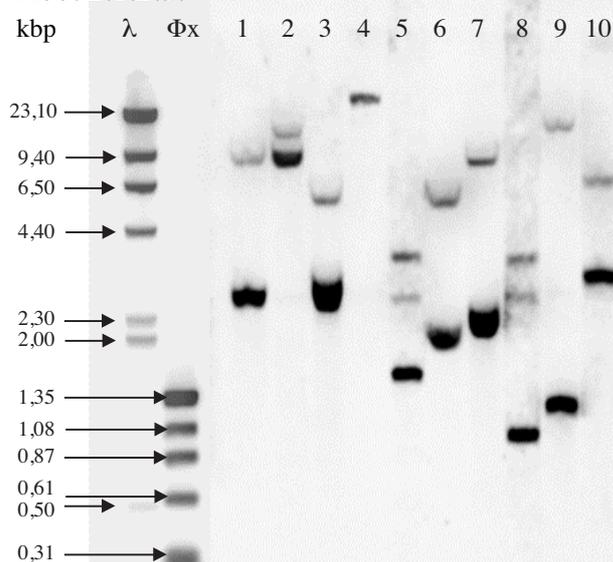


Abb. 2.1.2.3.: Southernblotanalyse von humaner genomischer DNA aus K562 Zellen. Die DNA wurde mit EcoRI (Spur 1), BamHI (Spur 2), BglII (Spur III), NotI (Spur 4), EcoRI/BamHI (Spur 5), EcoRI/BglII (Spur 6), EcoRI/NotI (Spur 7), BamHI/BglII (Spur 8), BamHI/NotI (Spur 9) und mit BglII/NotI (Spur 10) verdaut 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 Mehrfachverdaue 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_{cod}*, 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.

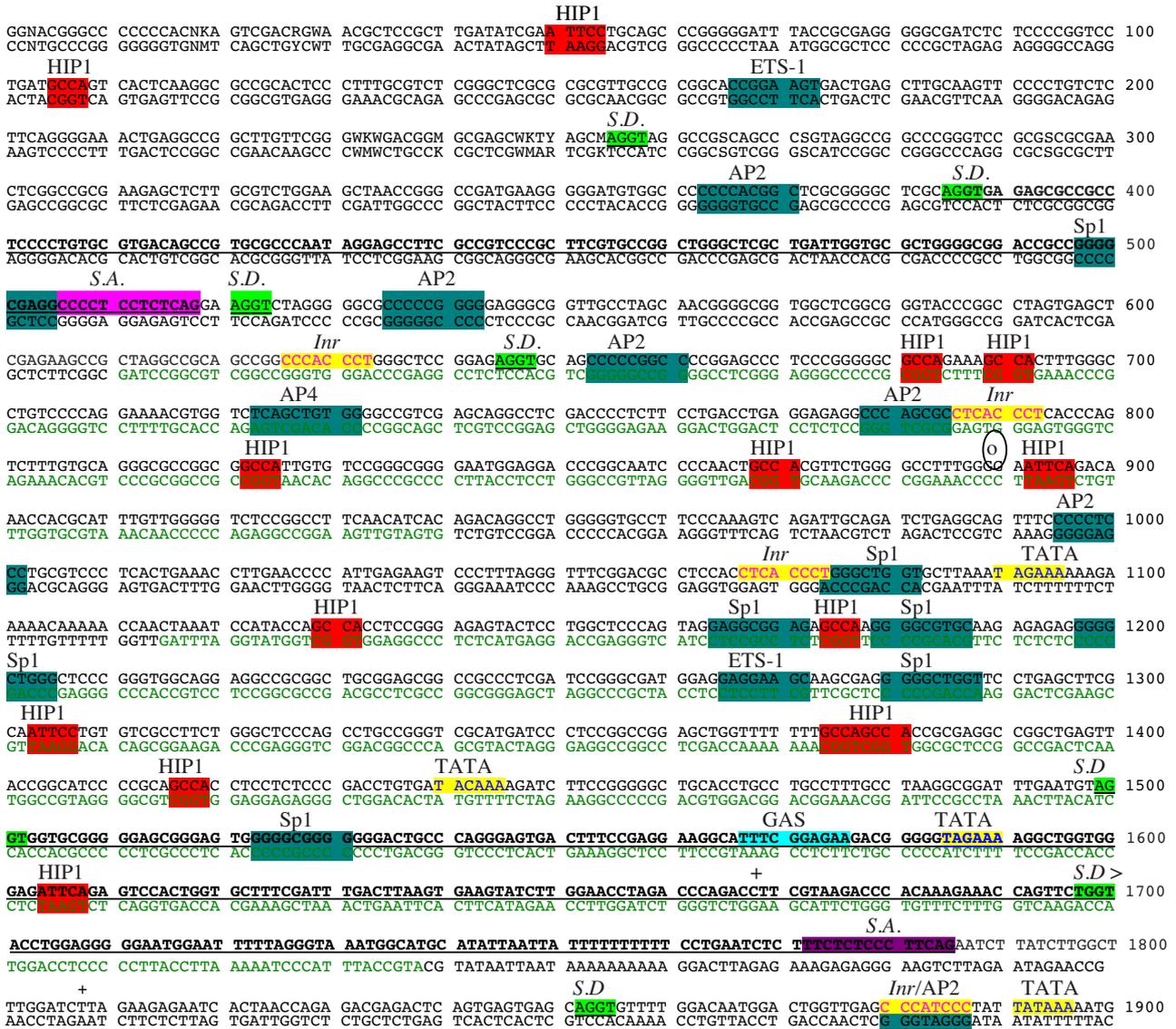


Abb.2.1.3.1.: Erweiterte Sequenz des 5'-NTR des *bcl-x* Gens, doppelsträngige Darstellung. Die Sequenz der offenen Leserahmen (ORFs) in antisense-Orientierung ist grün und Intronsequenzen sind fettgedruckt und unterstrichen dargestellt. Spleißakzeptorsequenzen sind rosa, Spleißdonorsequenzen hellgrün, 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 Hybridisierungs-sonde führte zur Isolierung einer cDNA mit der vollständigen Sequenz der *bcl-x_L* 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_L* mRNA entspricht. Die Sequenz des 5'-NTR der hier isolierten *bcl-x_L* cDNA unterscheidet sich erheblich von der des als Hybridisierungs-sonde eingesetzten cDNA-Fragments und der Sequenz der intercistronischen Region der beiden bicistronischen *bcl-x_L* 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
