

---

## **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 Hybridisierungsprobe 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 Hybridisierungsprobe 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
81 CAGATTGCAGATCTGAGGCAGTTTCCCCCTCCTGCGTCCCTCACTGAAACCTTGAACCCCATTTGAGAAGTCCCTTTAGG

CT11s
HSBCLXP      9 GTTTCGGACGCCTCCACCTCACCTGGGCTGGTGCCTAAATAGAAAAAGAAAAACAAAACCAACTAAATCCATACCAG
161 GTTTCGGACGCCTCCACCTCACCTGGGCTGGTGCCTAAATAGAAAAAGAAAAACAAAACCAACTAAATCCATACCAG

CT11s
HSBCLXP      89 CCACCTCCGGGAGAGTACTCCTGGCTCCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGG_T_GGC__
241 CCACCTCCGGGAGAGTACTCCTGGCTCCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGGCTGGGCTCC

CT11s
HSBCLXP      164 _____AGGAGGAAGCAAGCAGGGGGCTGGTT
321 CGGGTGGCAGGAGGCCGCGGCTGCGGAGCGGCCCTCGATCCGGGCGATGGAGGAGGAAGCAAGCAGGGGGCTGGTT

CT11s
HSBCLXP      191 CCTGAGCTTCGCAATTCCTGTGTGCTTCTGGGCTCCCAGCCTGCCGGGTGCGATGATCCCTCCGGCCGAGCTGGTTT
401 CCTGAGCTTCGCAATTCCTGTGTGCTTCTGGGCTCCCAGCCTGCCGGGTGCGATGATCCCTCCGGCCGAGCTGGTTT

CT11s
HSBCLXP      271 TTTTGCAGCCACCGGAGGCCGGCTGAGTTACCGGCATCCCCGAGCCACCTCCTCTCCCGACCTGTGATACAAAAGAT
481 TTTTGCAGCCACCGGAGGCCGGCTGAGTTACCGGCATCCCCGAGCCACCTCCTCTCCCGACCTGTGATACAAAAGAT

CT11s
HSBCLXP      351 CTTCCGGGGGCTGCACCTGCCTGCCTTTGCCTAAGGCGGATTGAAT
561 CTTCCGGGGGCTGCACCTGCCTGCCTTTGCCTAAGGCGGATTGAATCTAGCTGGTGGGGGAGCGGGAGTGGGGCGG

CT11s
HSBCLXP      398 _____
641 GGGGGACTGCCAGGGAGTGACTTTCCGAGGAAGGCATTTCCGAGAAGACGGGGGTAGAAAAGGCTGGTGGGAGATTGAG

CT11s
HSBCLXP      398 _____
721 AGTCCACTGGTGTCTTCGATTGACTTAAGTGAAGTATCTTGAACCTAGACCCAGACCTTCGTAAGACCCACAAAGAAA

CT11s
HSBCLXP      398 _____CT
801 CCAGTTCTGGTACCTGGAGGGGGAATTTTGGGTAATGGCATGCATATTAATTATTTTTTTTCTCTGAATCT

CT11s
HSBCLXP      400 CTTTCTCTCCCTTCAGAAATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAG.....
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 Hybridisierungssonde 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 Hybridisierungssonde  $bcl-x_{5'-NTR/Ct11}$  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 Hybridisierungssonde  $bcl-x_{5'-NTR/Ct11}$  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	AGTACTCCTGGCTCCAGTAGGAGGCGGAGAGCCAAGGGGCGTGCAAGAGAGAGGGGGTGGGCTCCCG
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	GAATGTAGGTGGTGCGGGGGAGCGGGAGTGGGGGCGGGGGGACTGCCAGGGAGTGACTTTCGAGGA
bcl-x(Ct11)	394	GAAT
bcl-x(C1A)	413	GAAT A GACTTTCGAGGA
bcl-x(F4D)	1085	GAAT
bcl-x(B1A)	1611	GAAT
HSBCLXP	674	GGCATTTCGGAGAAGACGGGGGTAGAAAAGGCTGGTGGGAGATTTCAGAGTCCACTGGTGCCTTCGATTT
bcl-x(Ct11)	398	
bcl-x(C1A)	432	GGCATTTCGGAGAAGACGGGGGTAGAAAAGGCTGGTGGGAGATTTC
bcl-x(F4D)	1089	
bcl-x(B1A)	1615	
HSBCLXP	744	ACTTAAGTGAAGTATCTTGAACCTAGACCCAGACCTTCGTAAGACCCACAAA
bcl-x(Ct11)	398	AAA
bcl-x(C1A)	481	AAA
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	TCCTCCCTTCAATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA
bcl-x(Ct11)	403	TCCTCCCTTCAAGATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAG.....
bcl-x(C1A)	491	AATCTTATTTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA
bcl-x(F4D)	1089	AATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA
bcl-x(B1A)	1615	AATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGACGAGACTCA

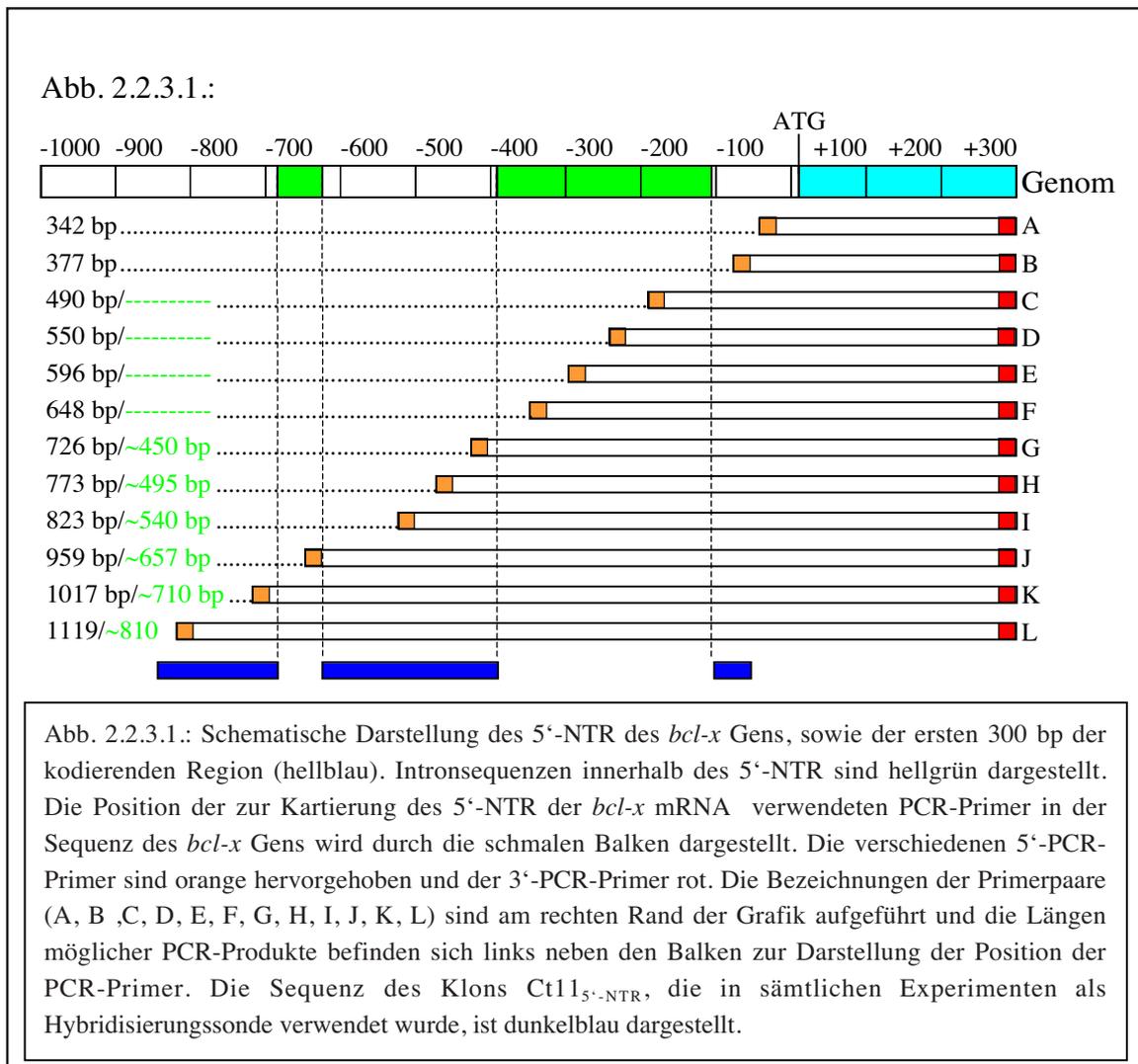
Abb. 2.2.2.1.: Multiples Alignment der cDNA-Sequenzen *bcl-x(Ct11)*, *bcl-x(C1A)*, *bcl-x(B1A)* und *bcl-x(F4D)* mit der Sequenz des 5'-NCR des *bcl-x* Gens. Intronbereiche sind grün unterlegt, übereinstimmende Sequenzabschnitte durch rote Nukleotidsymbole (ACGT) gekennzeichnet, Spleißdonor - bzw. Akzeptorstellen 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

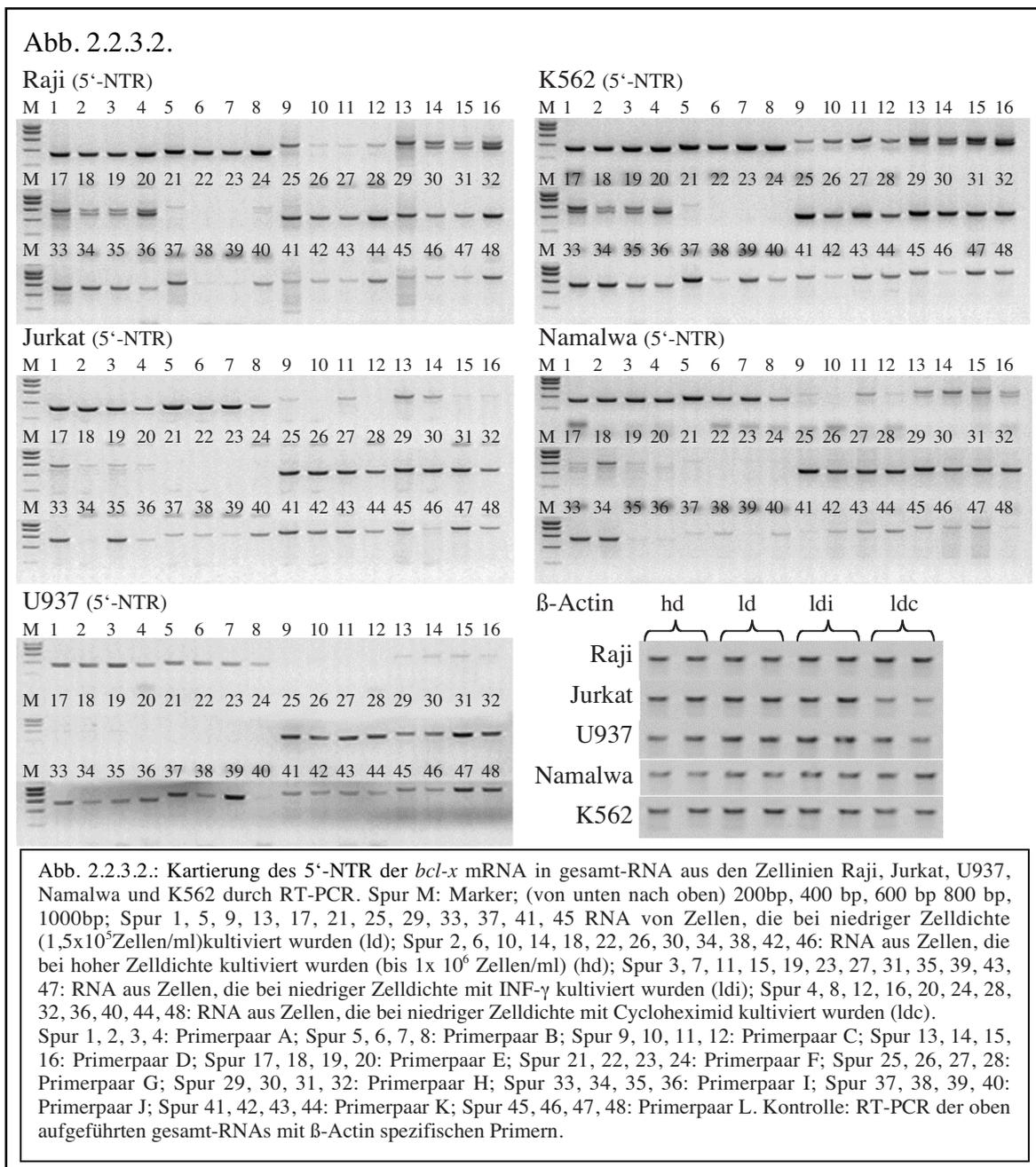
5'-Ende der kodierende Bereich der *CtIP* mRNA gespleißt wurde. Durch Hybridisierung von cDNA-Banken mit Ct11 wurden zwei bicistronische mRNAs isoliert. Die Spleißstelle, an die in den Sequenzen B1A und F4D die MHC-1b bzw. die CtIP/RIM mRNA mit der *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA gespleißt wurde, ist in beiden 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

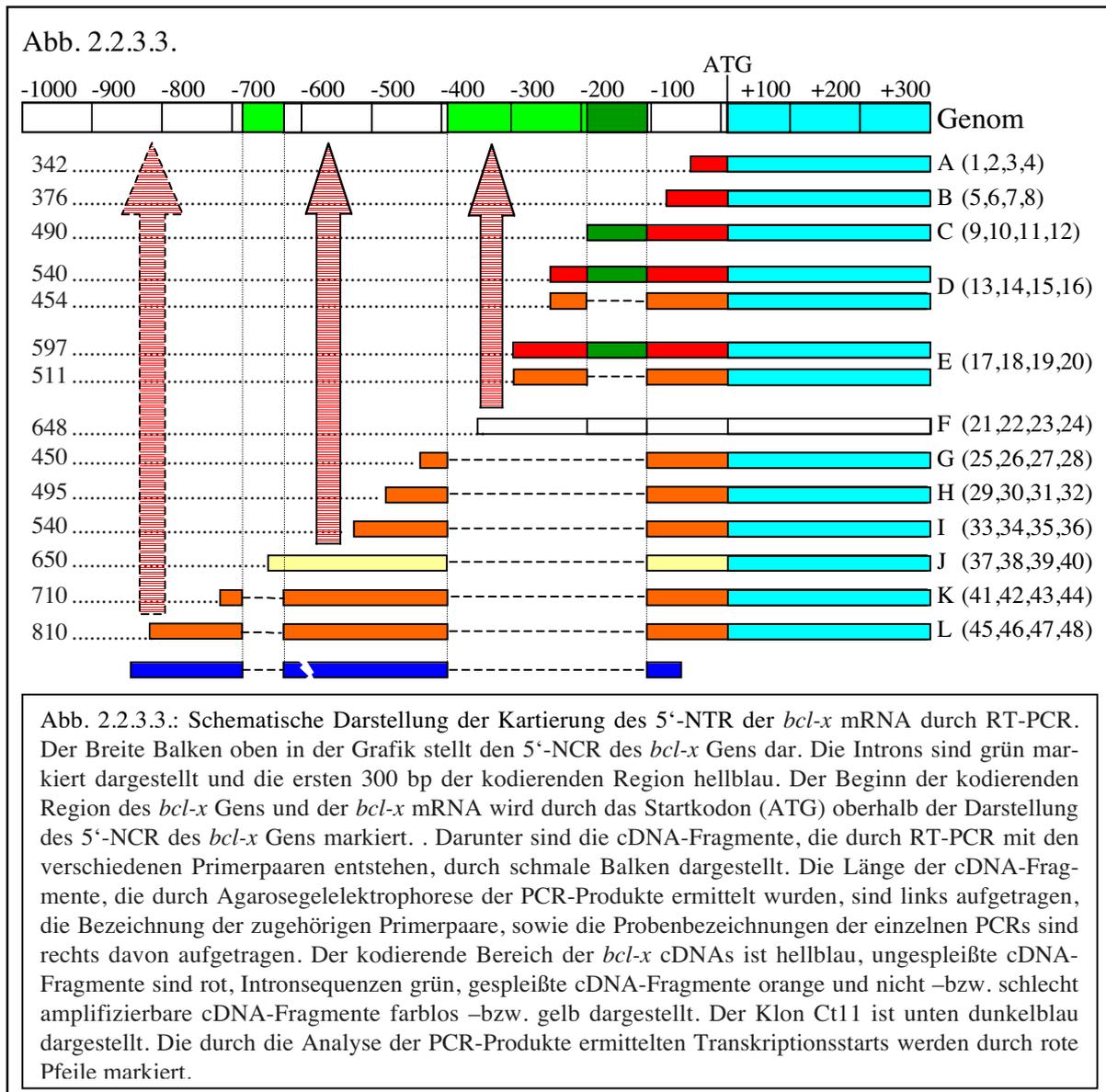
Die Kartierung des Transkriptionsstarts des *bcl-x* Gens wurde mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt (Bedingungen: Siehe Anhang). Die PCR-Primer wurden so ausgewählt, daß sie eine Entfernung von 40 – 100 bp voneinander hatten, und zum Teil auch in den



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

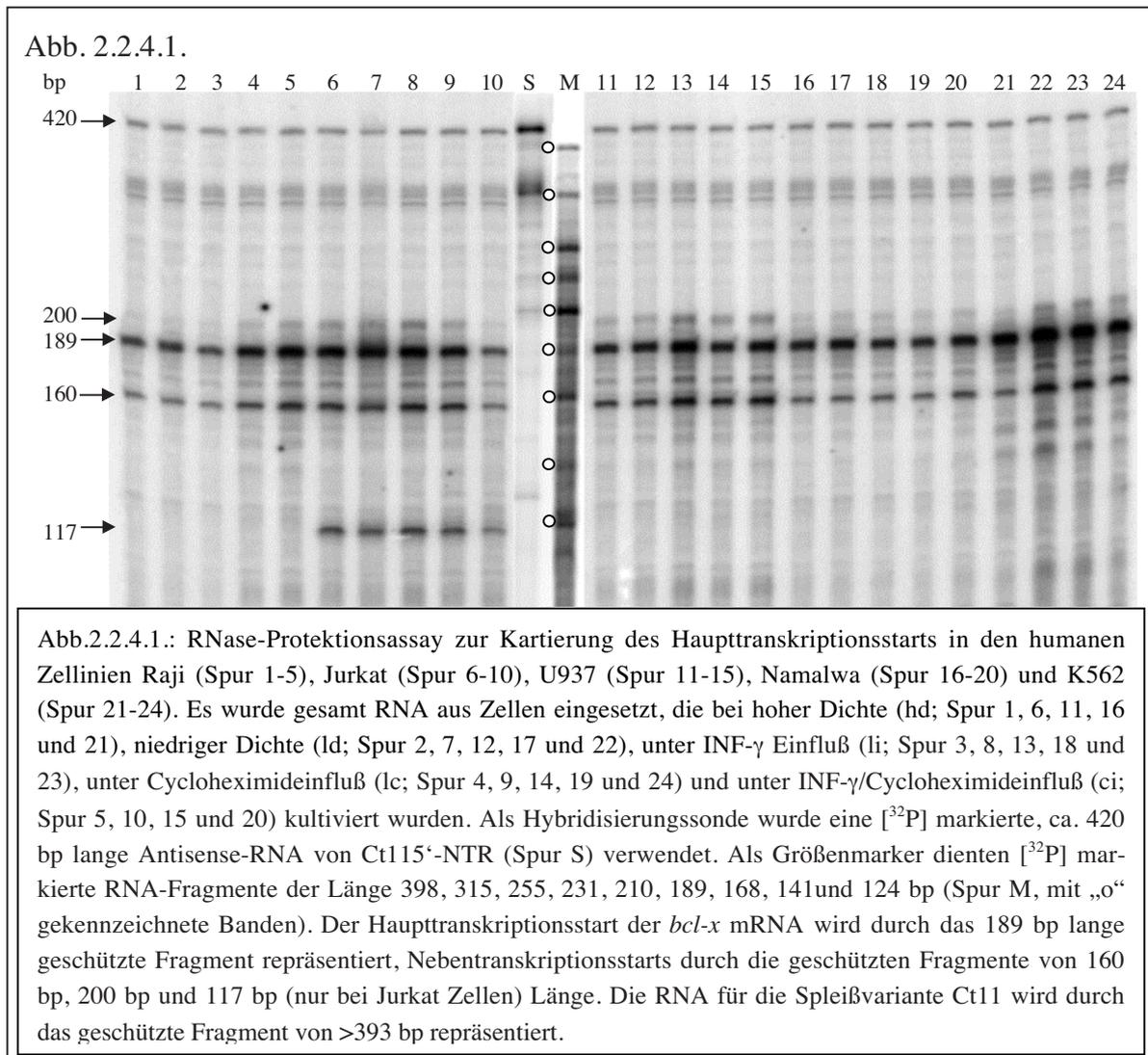


aus transkribiert werden. Der 5'-NTR der einen *bcl-x* mRNA, die als *bcl-x (sn)* (sn = short distance; not spliced) bezeichnet wird, ist ungespleißt und hat eine Länge von ca. 310 N. Aus der zweiten Spleißvariante, die als *bcl-x (ss)* (ss = short distance; spliced) bezeichnet wird, ist ein ca. 80N 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-

