
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

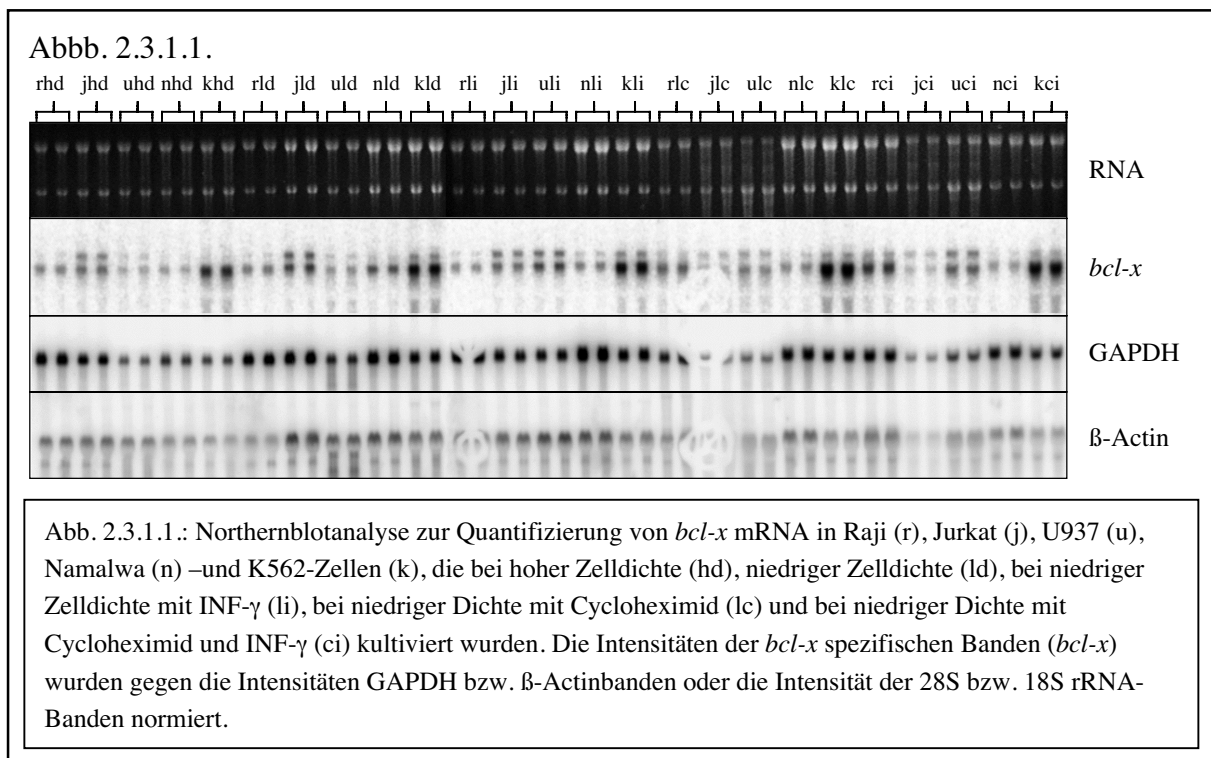
Die Analyse der Sequenz des 5'-nichtkodierenden Bereichs des *bcl-x* Gens zeigte, daß sich zwischen Position -321 und -331 strangaufwärts vom Startkodon eine GAS-Sequenz befindet (siehe Abschnitt 2.1.1.). Diese Sequenz liegt auf dem ersten Intron des *bcl-x* Gens und kann die Promoteraktivität dieses 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- γ , 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- γ 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- γ 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- γ 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.

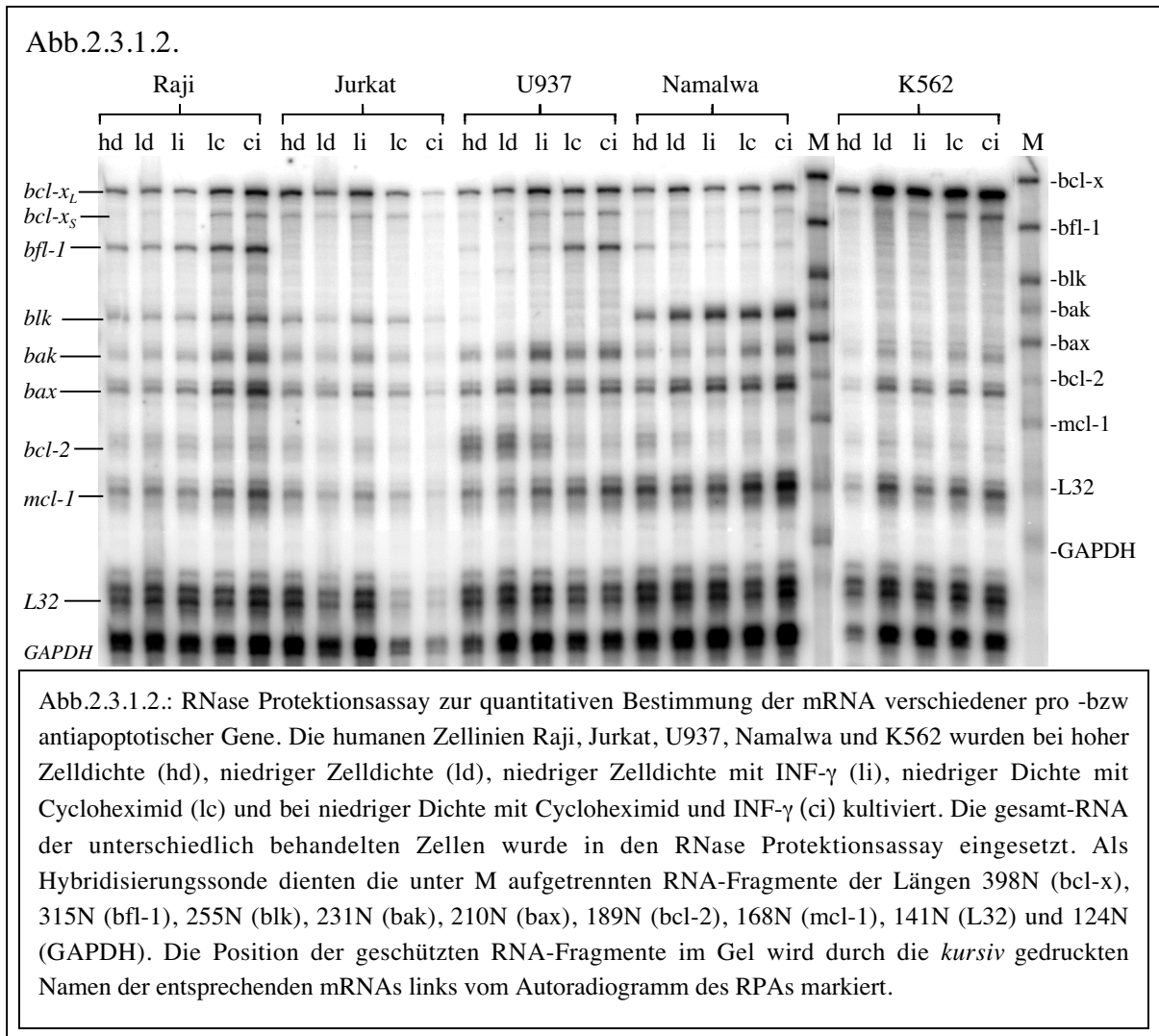
2.3.1. Transkription des *bcl-x* Gens in Abhängigkeit von der Zelldichte, INF- γ und Cycloheximid

Der Einfluß von Cycloheximid, INF- γ 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- γ wird durch den Einfluß von INF- γ , Cycloheximid und INF- γ und Cycloheximid auf die Expression eines bestimmten Gens untersucht. Ist die relative Änderung der Expression dieses Gens unter Einfluß von INF- γ genauso hoch wie unter Einfluß von INF- γ und Cycloheximid, so ist die Induktion der Expression unabhängig von der de novo Synthese INF- γ abhängiger Transkriptionsfaktoren. Das Gen wird also direkt durch INF- γ 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- γ auf die Expression der proapoptotischen *bcl-x* Spleißvariante *bcl-x_s* konnte hier nicht untersucht werden, da der Größenunterschied zwischen *bcl-x_L* und *bcl-x_s* zu klein ist, um im Northernblot dargestellt werden zu können. Der Einfluß von INF- γ , der Zelldichte und Cycloheximid auf die Transkription von *bcl-x_L* und *bcl-x_s* wurde mit Hilfe eines RNase-Protektionsassays untersucht, der die gleichzeitige Bestimmung der Transkription der mRNA von *bcl-x_L*, *bcl-x_s*, *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- γ (li), Cycloheximid (lc) und INF- γ und Cycloheximid (ci) behandelt wurden. In U937 Zellen konnte auch hier eine ca. 2,5 fache Steigerung der *bcl-x_L* Expression unter Einfluß von INF- γ gemessen werden. In den anderen

untersuchten Zelllinien wurde keine Änderung der *bcl-x_L* Expression gefunden. In Zellen, die gleichzeitig mit INF- γ 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- γ stellt die Expression von *bak* dar. In HT-29 Zellen wurde eine direkte Induktion der *bak* Expression durch INF- γ beobachtet [127]. In U937 Zellen erfährt die *bak* Expression eine direkte Induktion durch INF- γ und in Jurkat Zellen eine schwache indirekte Induktion. In allen anderen untersuchten Zel-

Abb. 2.3.1.3.:

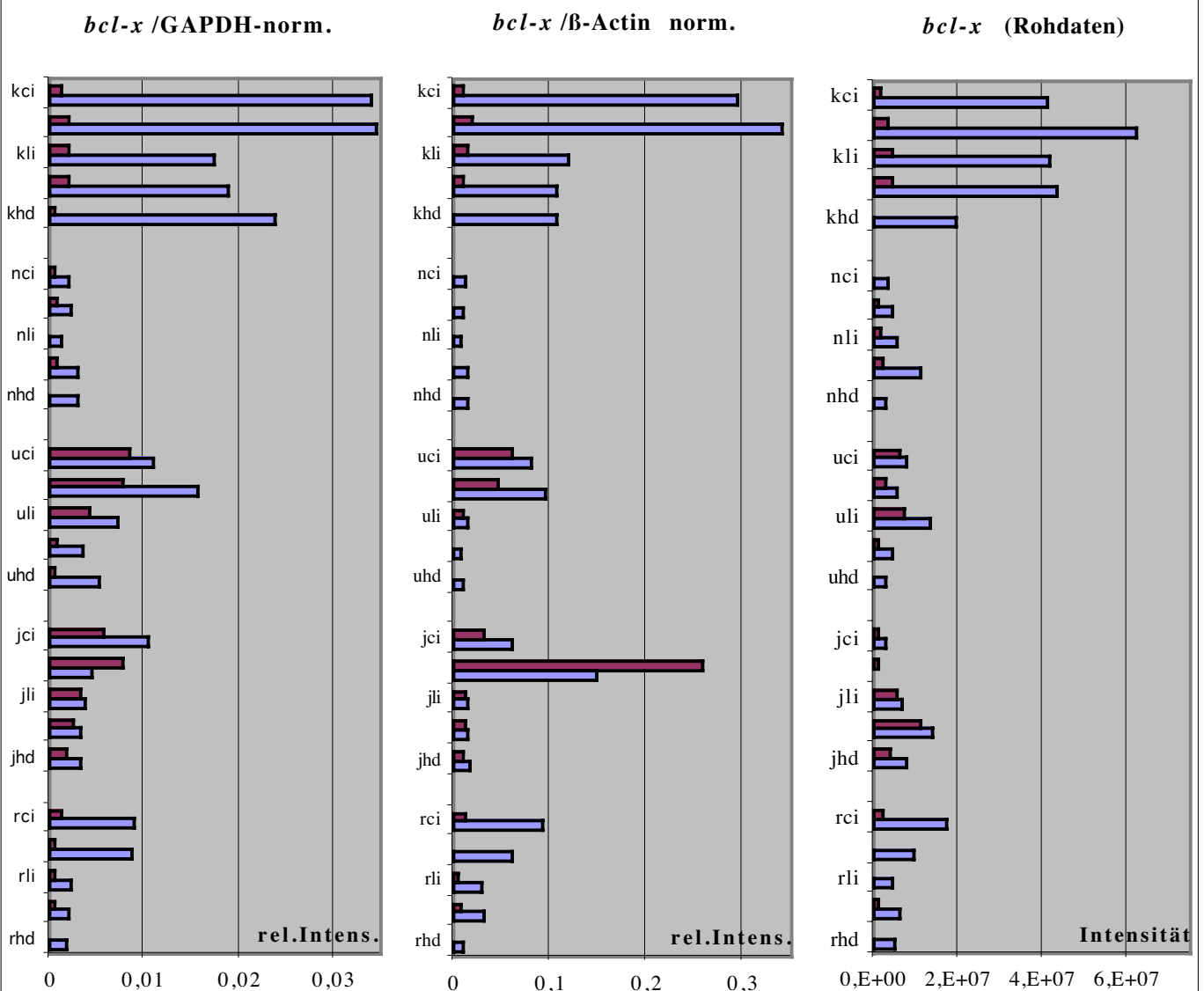
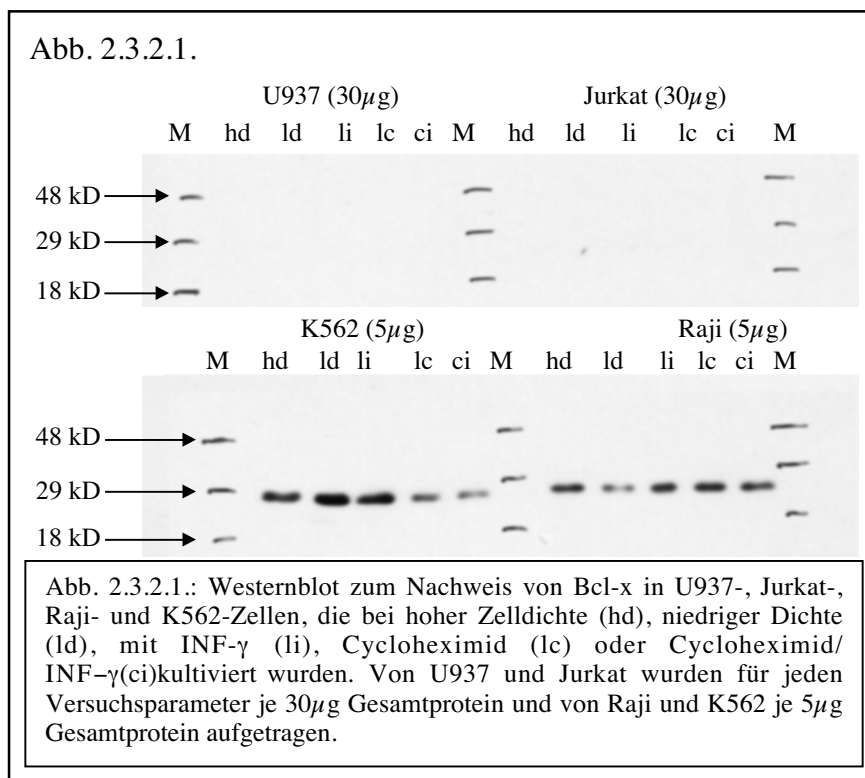


Abb. 2.3.1.3. : Quantitative Bestimmung der *bcl-x* Expression durch densitometrische Auswertung des in Abb. 2.2.1.1. gezeigten Northernblots. Die relativen Intensitäten der 2700 N langen *bcl-x_L* mRNA Banden sind in den Diagrammen blau dargestellt und die relativen Intensitäten der 3600 N langen *bcl-x* ähnlichen mRNA violett. Die Intensitäten der *bcl-x* spezifischen Banden wurden gegen die Intensitäten der entsprechenden GAPDH -bzw. β -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_s* zu *bcl-x_L* 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

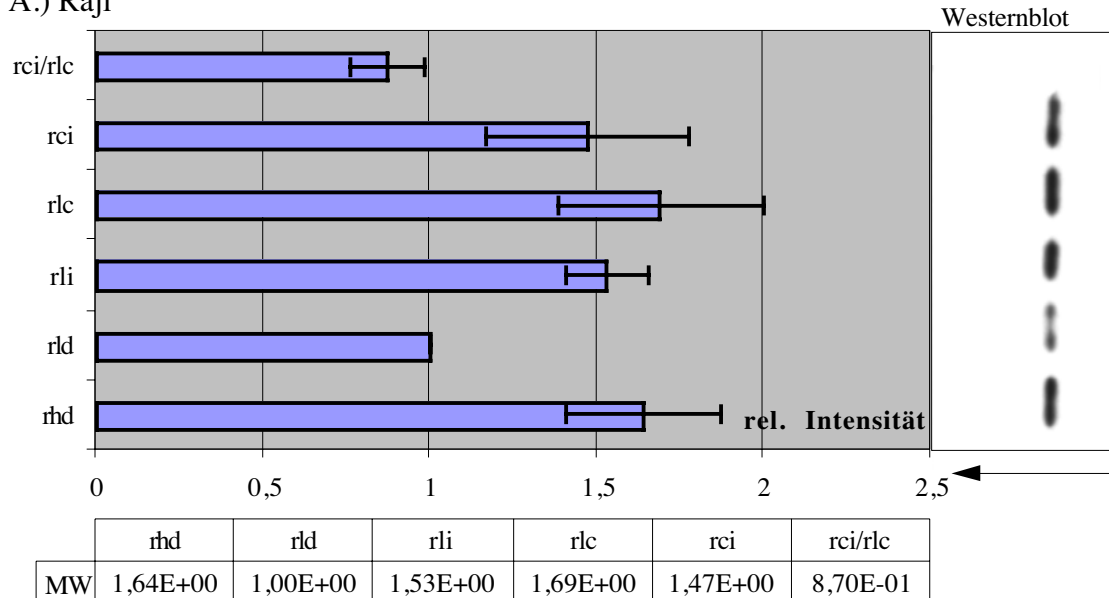
Raji-Zellen, obwohl die *bcl-x* mRNA Menge in K562 Zellen um den Faktor 4.5 – 6.0 mal höher ist als in Raji Zellen (siehe Abb. 2.3.1.3. und 2.3.2.1.). In den anderen untersuchten Zellen, die eine ähnliche Menge an *bcl-x* mRNA wie Raji Zellen aufwiesen, war unter gleichen Bedingungen kein Bcl-x Protein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

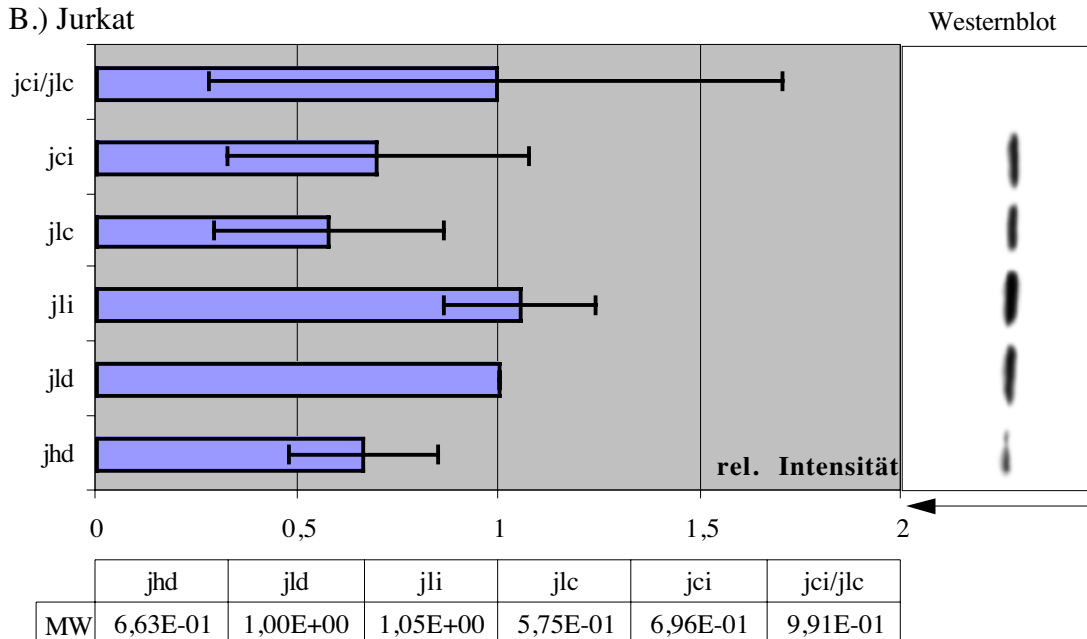
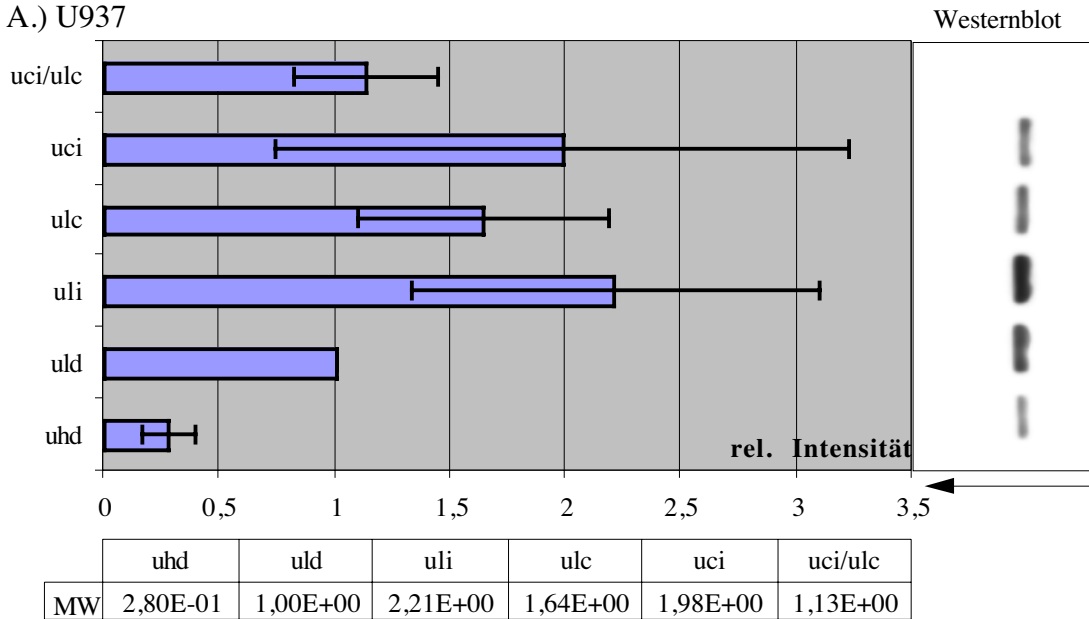


Abb.2.3.2.2.: Westernblot Analyse der Bcl-x Menge in Gesamtprotein aus (A.) Raji- und (B.) Jurkat-Zellen. Die Zellen wurden bei niedriger Zelldichte (ld), hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte mit $\text{INF-}\gamma$ (li), bei niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Zelldichte 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

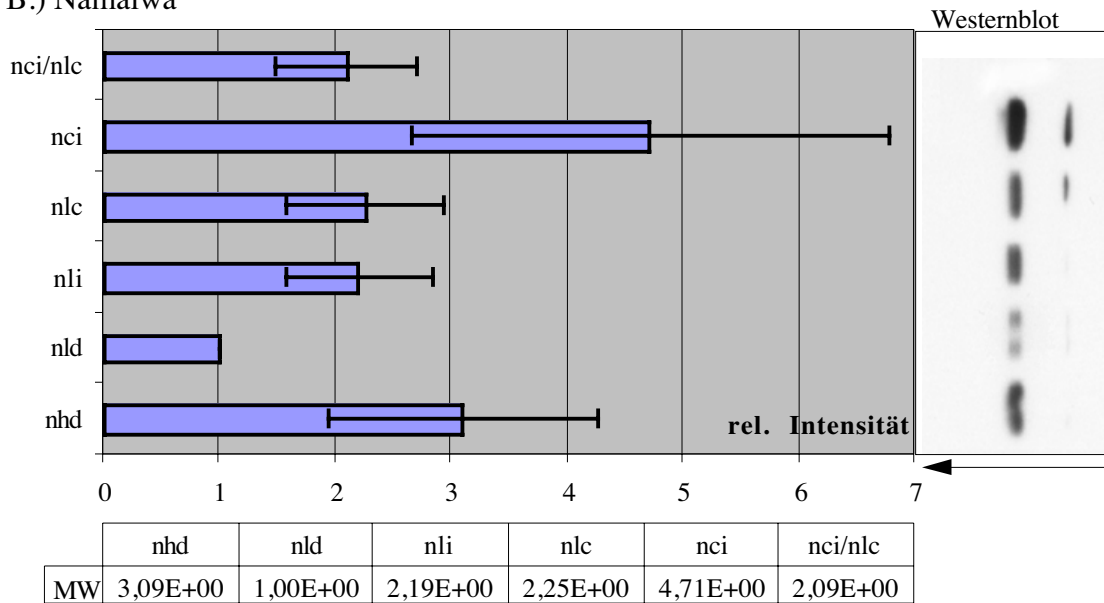


Abb.2.3.2.3.: Westernblot Analyse der Bcl-x Menge in Gesamtprotein aus U937 (A.) –und Namalwa-Zellen (B.). Die Zellen wurden bei niedriger Zelldichte (ld), hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte mit $\text{INF-}\gamma$ (li), bei niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Zelldichte mit 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.

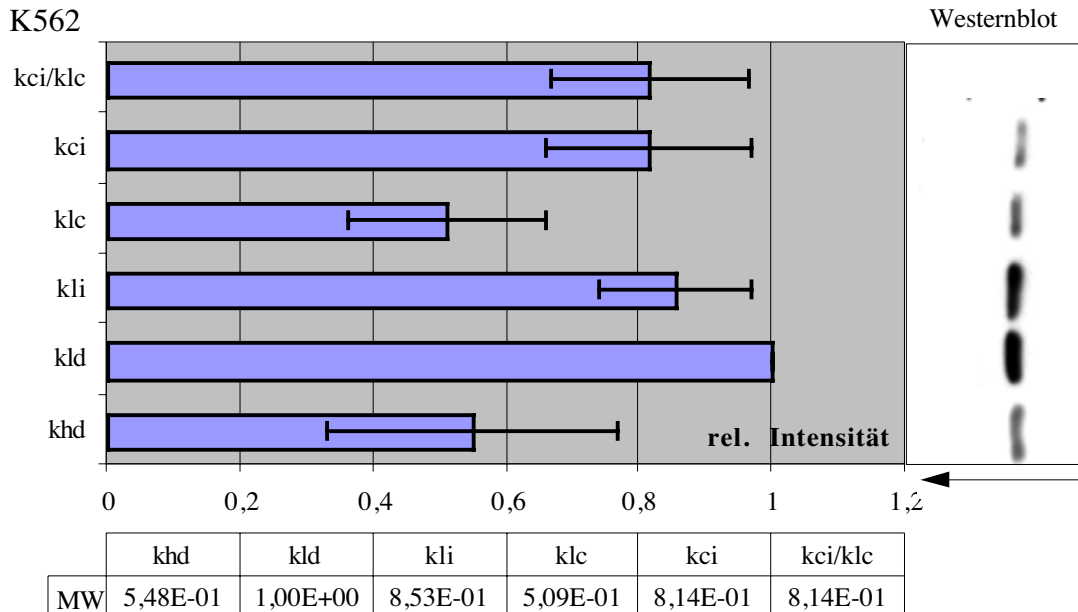


Abb.2.3.2.4.: Westernblot Analyse der Bcl-x Menge in Gesamtprotein aus K562-Zellen. Die Zellen wurden bei niedriger Zelldichte (ld), hoher Zelldichte (hd), bei niedriger Zelldichte mit INF-g (li), bei niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Zelldichte mit INF- γ und Cycloheximid (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- γ und Cycloheximid

Abb.2.3.3.1.. (K562)

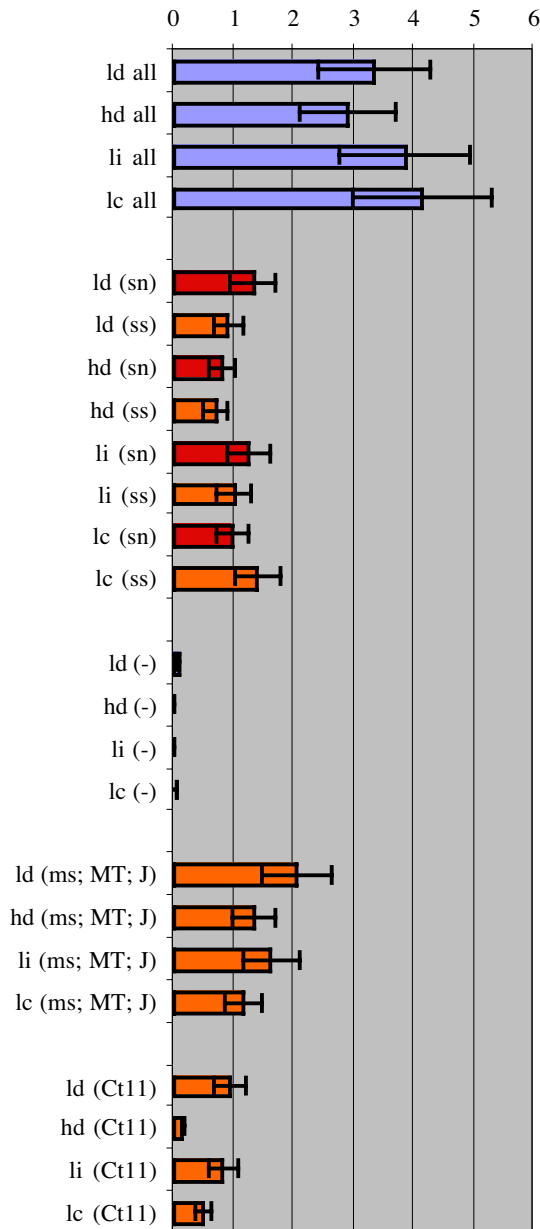


Abb. 2.3.3.1.: Einfluß von Zelldichte (hohe Dichte = hd; niedrige Dichte = ld), INF- γ und Cycloheximid auf Spleißaktivität und Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA in K562 Zellen. Rote Balken repräsentieren die ungespleißte *bcl-x(sn)* mRNA, orange Balken die gespleißte *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(MT)*, *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- γ 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- γ oder Cycloheximid auf wie die *bcl-x_L*- und *bcl-x_S* mRNA im Northernblot, im RNase Protektionsassay und in der RT-PCR unter Verwendung für den kodierenden Bereich spezifischer Hybridisierungssonden 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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 ~ 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_L* und der *bcl-x_S* 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)

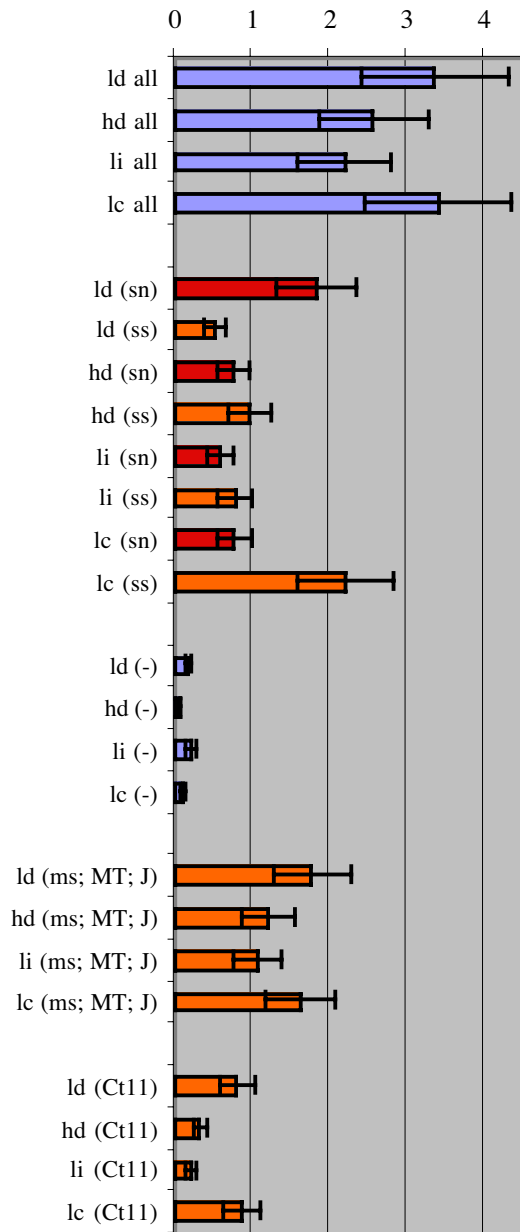


Abb. 2.3.3.2.: Einfluß von Zelldichte (hohe Dichte = hd; niedrige Dichte = ld), INF- γ und Cycloheximid auf Spleißaktivität und Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA in Raji Zellen. Rote Balken repräsentieren die ungespleißte *bcl-x(sn)* mRNA, orange Balken die gespleißte *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(MT)*, *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)

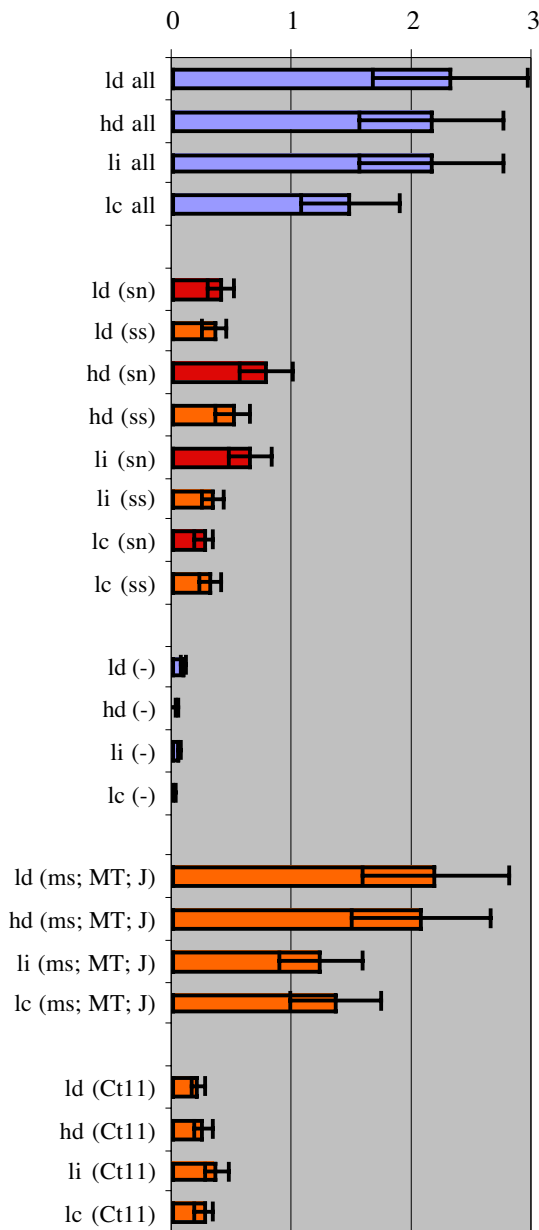


Abb. 2.3.3.3.: Einfluß von Zelldichte (hohe Dichte = hd; niedrige Dichte = ld), INF- γ und Cycloheximid auf Spleißaktivität und Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA in Namalwa Zellen. Rote Balken repräsentieren die ungespleißte *bcl-x(sn)* mRNA, orange Balken die gespleißte *bcl-x(ss)*, *bcl-x(ms)*,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

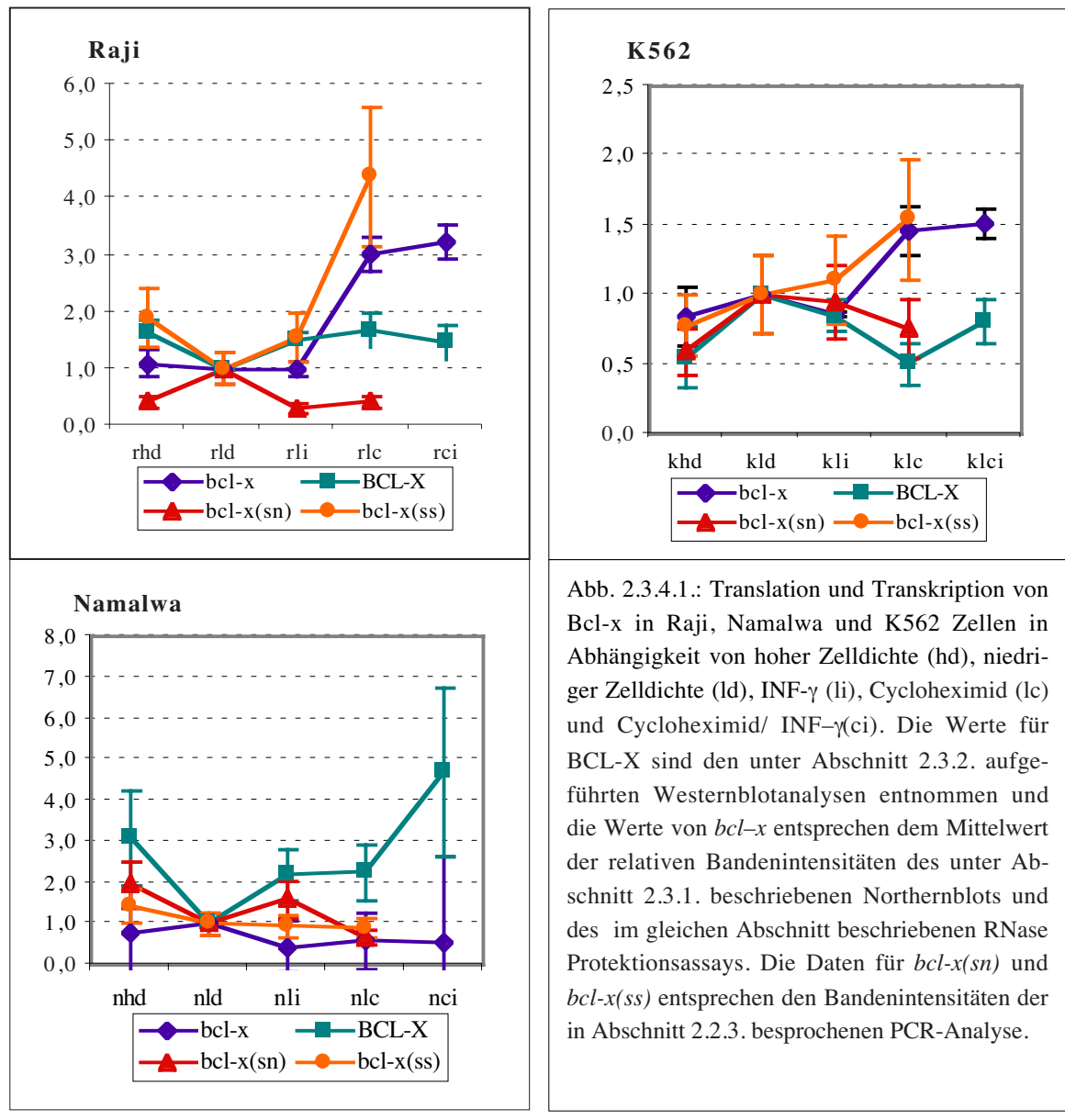
In Namalwa Zellen ist bei hoher Zelldichte, bzw. nach INF- γ Gabe eine Steigerung der Transkriptionsrate vom Startpunkt in Position $-305/-337$, also der *bcl-x(sn)* –bzw. der *bcl-x(ss)* mRNA, zu beobachten. Im Gegensatz zu Raji –oder K562 Zellen ändert sich in Namalwa Zellen das Verhältnis von ungespleißter *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- γ 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- γ (li), niedriger Zelldichte mit Cycloheximid (lc) und niedriger Zelldichte mit Cycloheximid/INF- γ 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.:

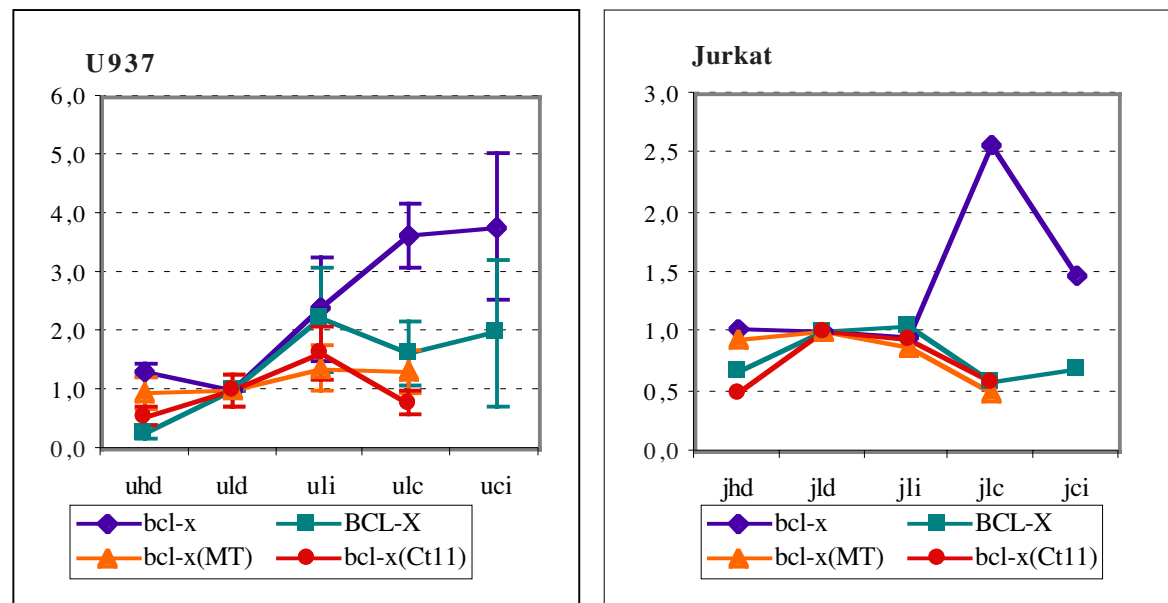


Abb. 2.3.4.2.: Translation und Transkription von Bcl-x in Jurkat und U937 Zellen in Abhängigkeit von hoher Zelldichte (hd), niedriger Zelldichte (ld), INF- γ (li), Cycloheximid (lc) und Cycloheximid/ INF- γ (ci). Die Werte für BCL-X sind den unter Abschnitt 2.3.2. aufgeführten Westernblotanalysen entnommen 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 $bcl-x_{\text{cod.}}$ konnte nachgewiesen werden, daß im Bereich der kodierenden Region der *bcl-x* mRNA keine zelluläre antisense RNA existiert. Die Sonde $bcl-x_{5'-\text{NTR}}$ 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 $bcl-x_{5'-\text{NTR}}$ 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

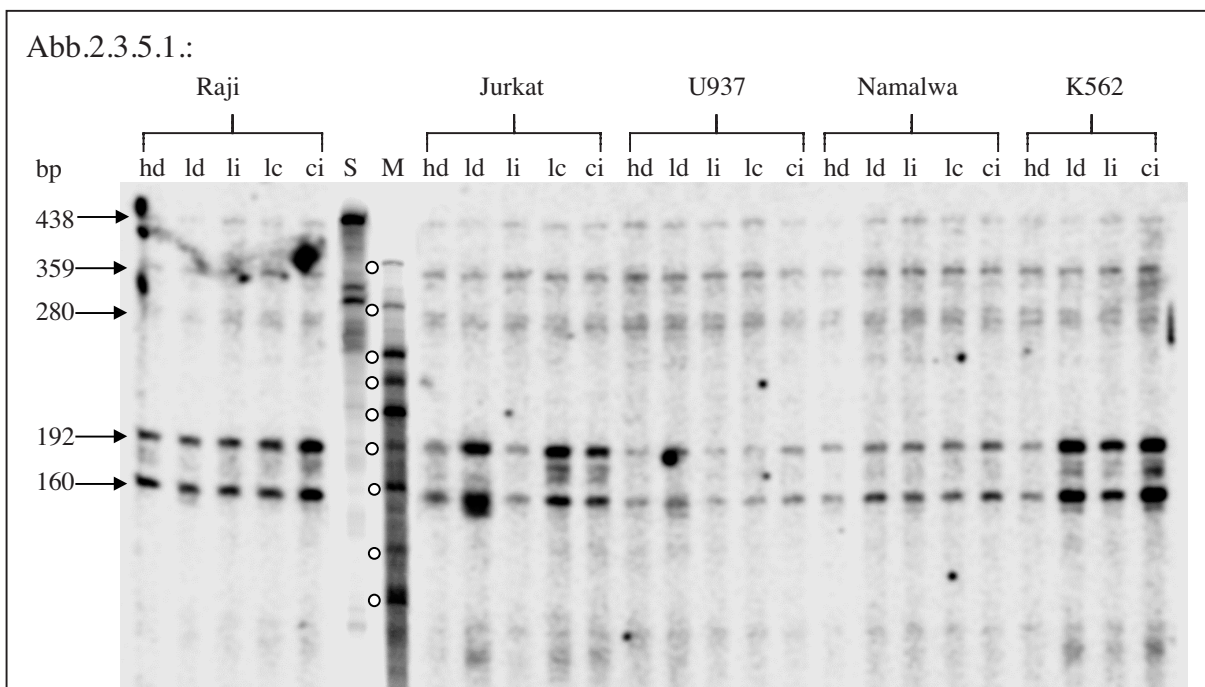
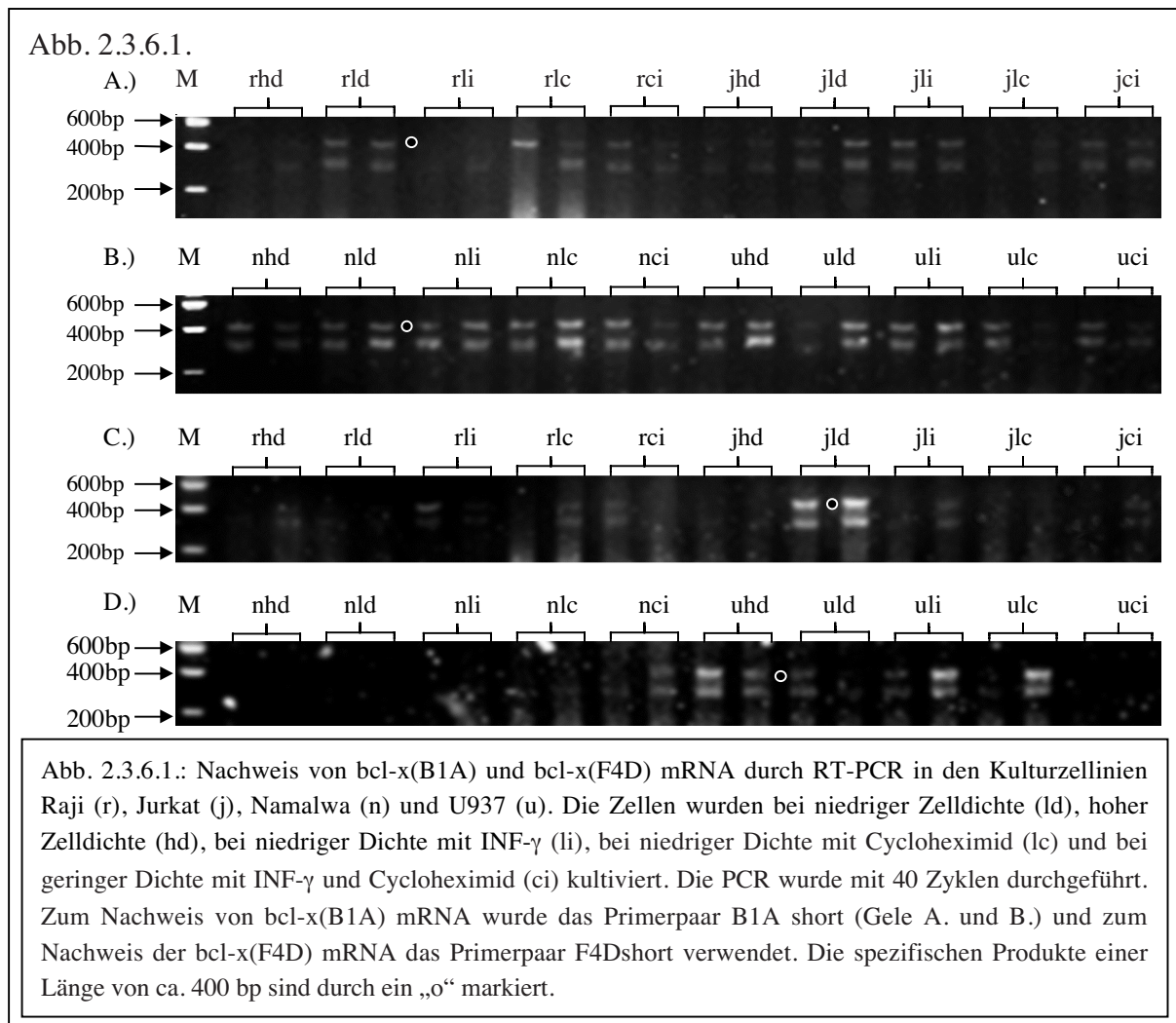


Abb. 2.3.5.1.: Nachweis und Kartierung einer *bcl-x* $5'-\text{NTR}$ antisense-RNA in gesamt-RNA aus den Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und Jurkat durch RNase Protektionsassay. Die Zellen wurden bei hoher Dichte (hd), niedriger Dichte (ld), niedriger Dichte mit $\text{INF-}\gamma$ (li), niedriger Dichte mit Cycloheximid (lc) und bei niedriger Dichte mit $\text{INF-}\gamma$ und Cycloheximid kultiviert (ci). Als Hybridisierungssonde diente die [^{32}P] markierte, ca. 450 N lange Ct11 $5'-\text{NTR}$ RNA (Spur S). Als Größenmarker (Spur M, mit „o“ gekennzeichnete Banden) dienen [^{32}P] markierte RNA-Fragmente der Länge 398, 315, 255, 231, 210, 189, 168, 141 und 124 N. Die *bcl-x* $5'-\text{NTR}$ 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)_L*, bzw. *bcl-x(F4D)_L* 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- γ abhängig ist [60], wurde die Abhängigkeit der B1A-Expression von INF- γ in den Kulturzellen Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562 überprüft. Die Expression von B1A ist in keiner der untersuchten Zelllinien von INF- γ abhängig, sondern ausschließlich von der Zelldichte, d.h. von Wachstumsfaktoren. In Raji-Zellen führt der Einfluß von INF- γ 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- γ Einfluß und in Jurkat Zellen bei niedriger Zelldichte und INF- γ 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
