

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.

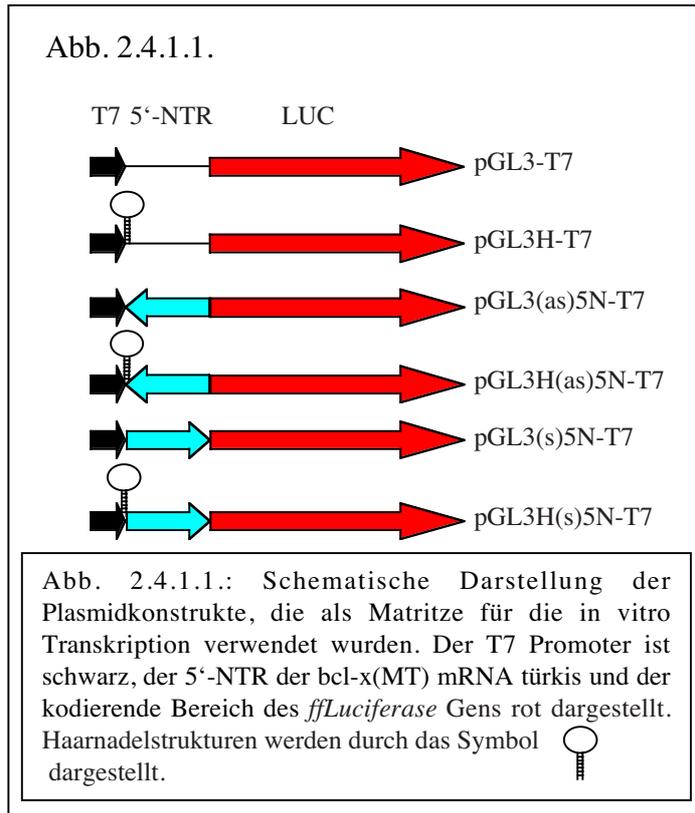
2.4. Funktion des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA

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

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.

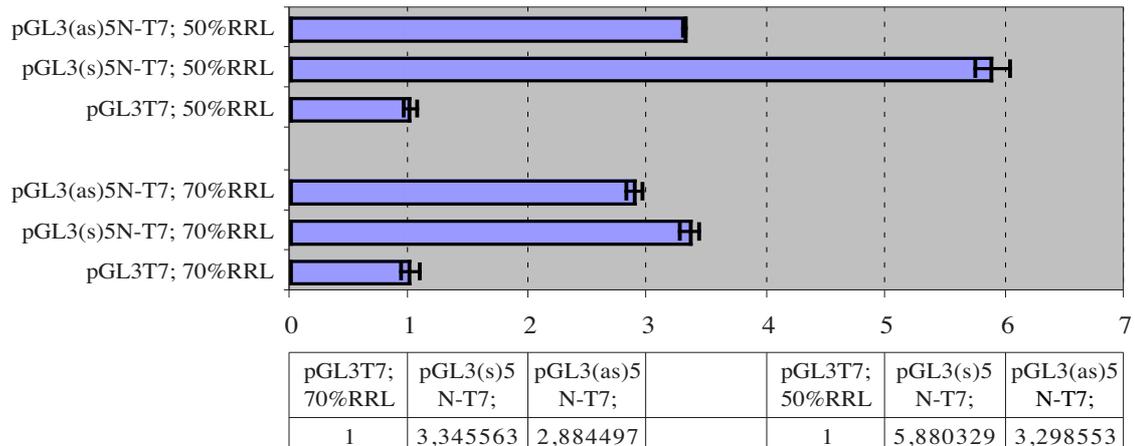
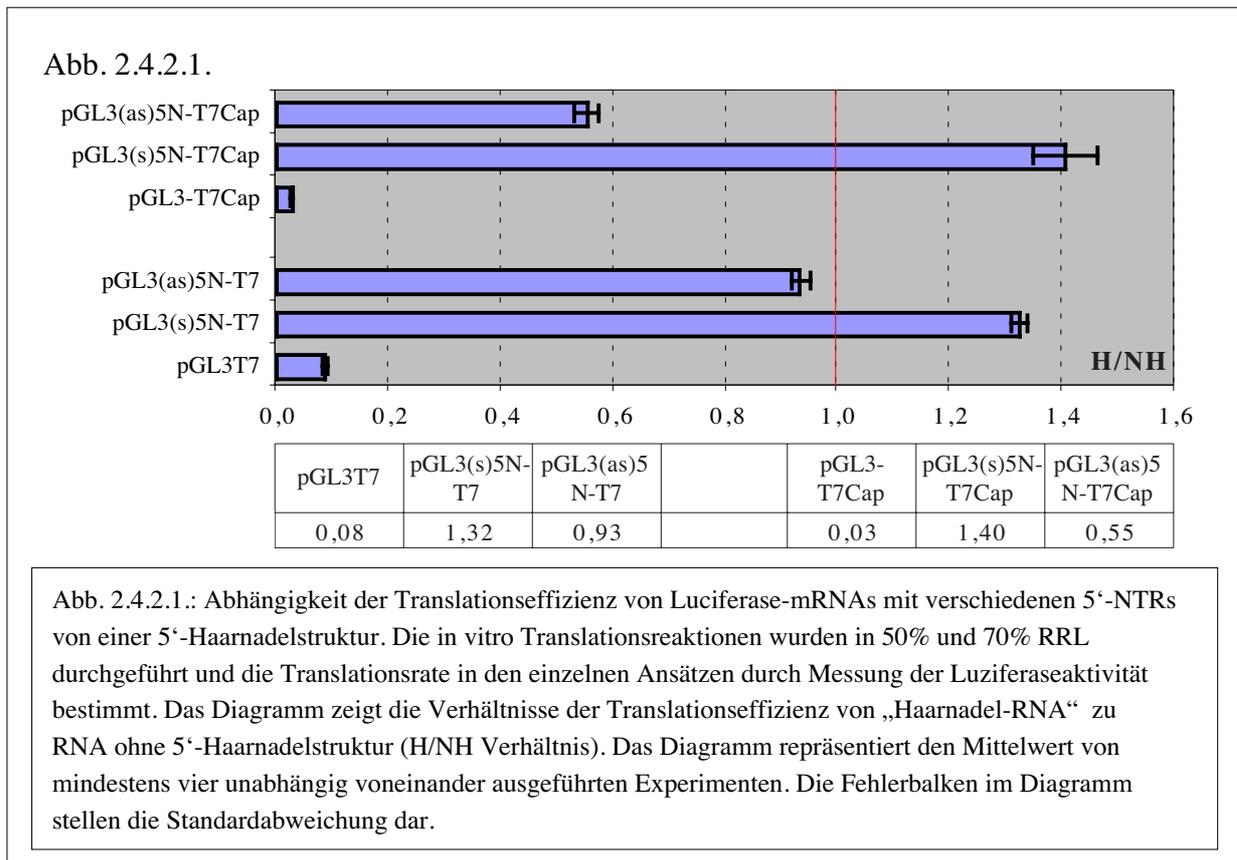


Abb. 2.4.1.2. Translationseffizienz von Luciferase mRNAs mit verschiedenen 5'-NTRs in Abhängigkeit von einer 5'-CAP Struktur. Die *in vitro* Translationsreaktionen wurden in 50% bzw. 70% RRL durchgeführt und die Translationseffizienz in den einzelnen Ansätzen durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. 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

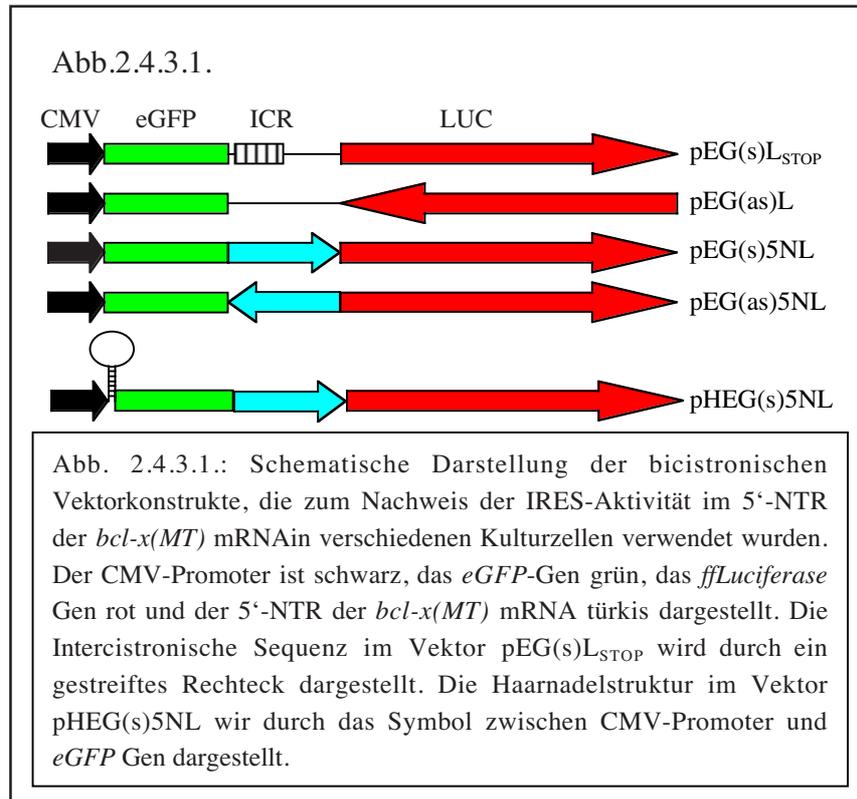
Um die Möglichkeit der internen Initiation der Translation im 5'-nichttranslatierten Bereich der *bcl-x* mRNA zu überprüfen, wurde in den Konstrukten pGL3(s)5N-T7 und pGL3(as)5N-T7 zwischen den T7-Promoter und den 5'NTR der *bcl-x* mRNA und beim Konstrukt pGL3-T7 zwischen T7-Promoter und das *ffLuciferase* 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

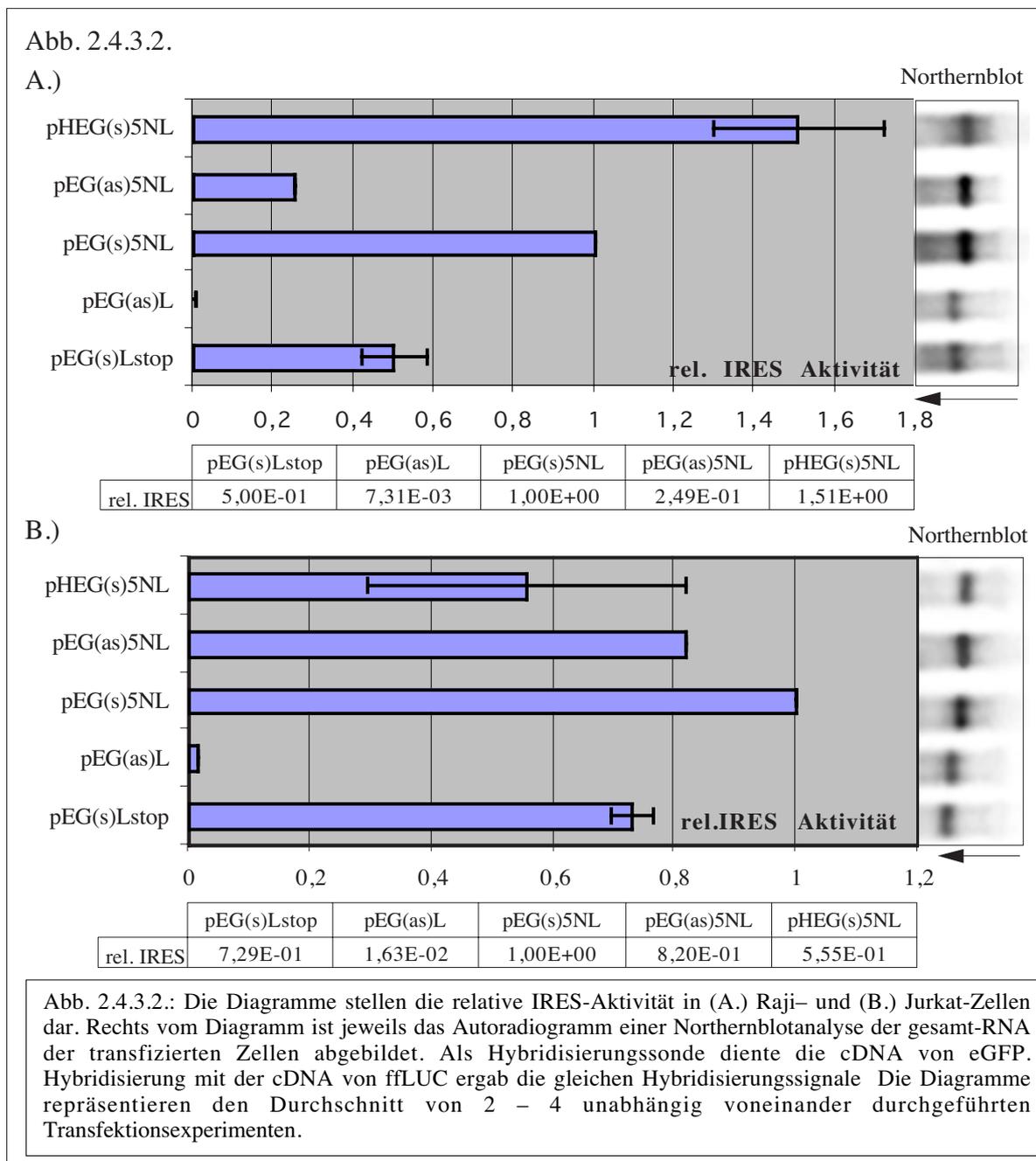
Um zu untersuchen, ob die CAP-unabhängige Translation, die in Kaninchenretikulozytenlysat beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 2.4.1. und 2.4.2.), tatsächlich durch eine IRES im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA ermöglicht wird, wurde eine Reihe



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

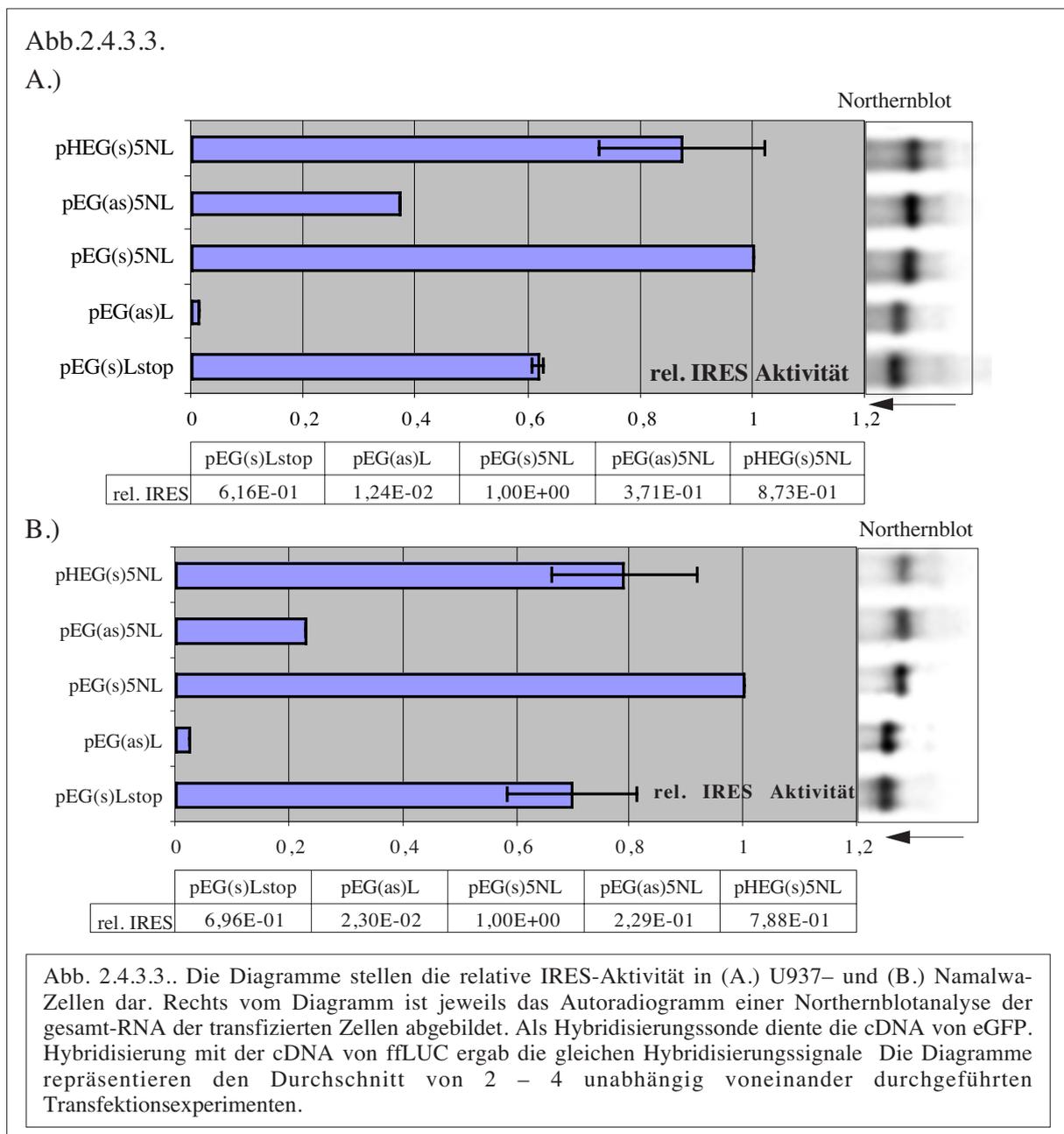
eGFP Gens unter Kontrolle des CMV-Promoters und als zweiten offenen Leserahmen (ORF) die kodierende Sequenz des *ffLuciferase* Gens. In die intercistronische Region (ICR) des Vektors pEG(s)L (siehe Abb.2.4.3.1.) wurde eine 120 bp lange Sequenz eingebaut, die 7 Stop-Kodons im Leseraster des *eGFP* Gens enthielt (pEG(s)_{LSTOP}). 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)_{Lstop}, 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)_{Lstop} 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.

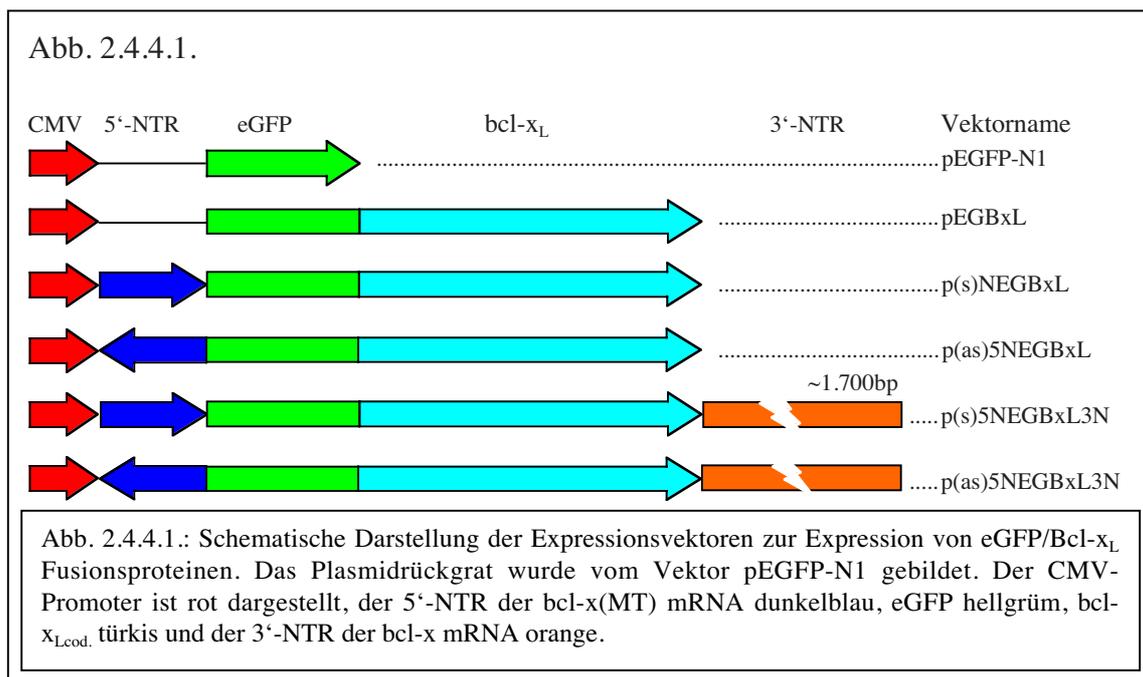
In Raji-Zellen bewirkt der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA eine Steigerung der IRES-Akti-



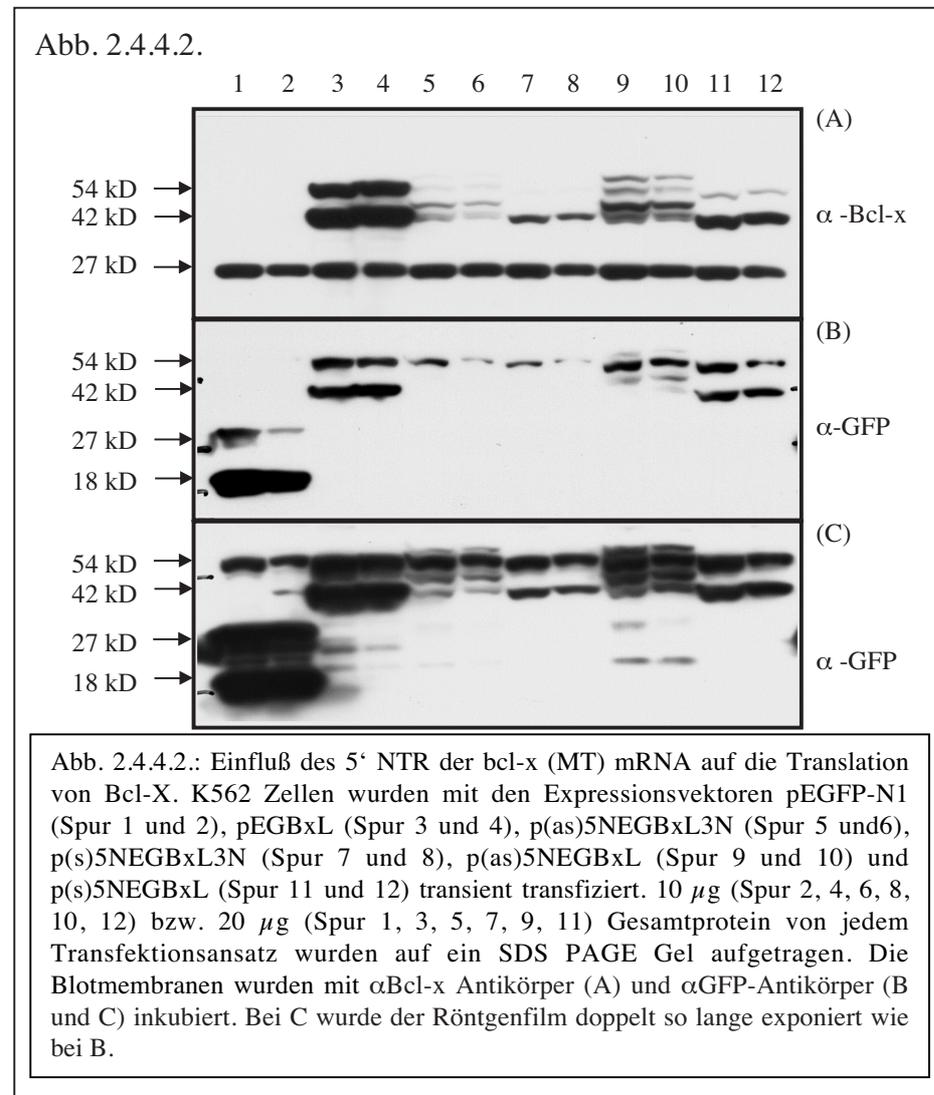
vität um den Faktor 2. Bezieht man die IRES-Aktivität auf das Konstrukt pEG(as)5NL, steigert sich hier die Aktivität um das Vierfache. In U937-Zellen beträgt die relative IRES-Aktivität 1.62, bzw. 2.69 und in Namalwa-Zellen 1.44 bzw. 4.35. In K562-Zellen konnte mit den oben genannten bicistronischen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

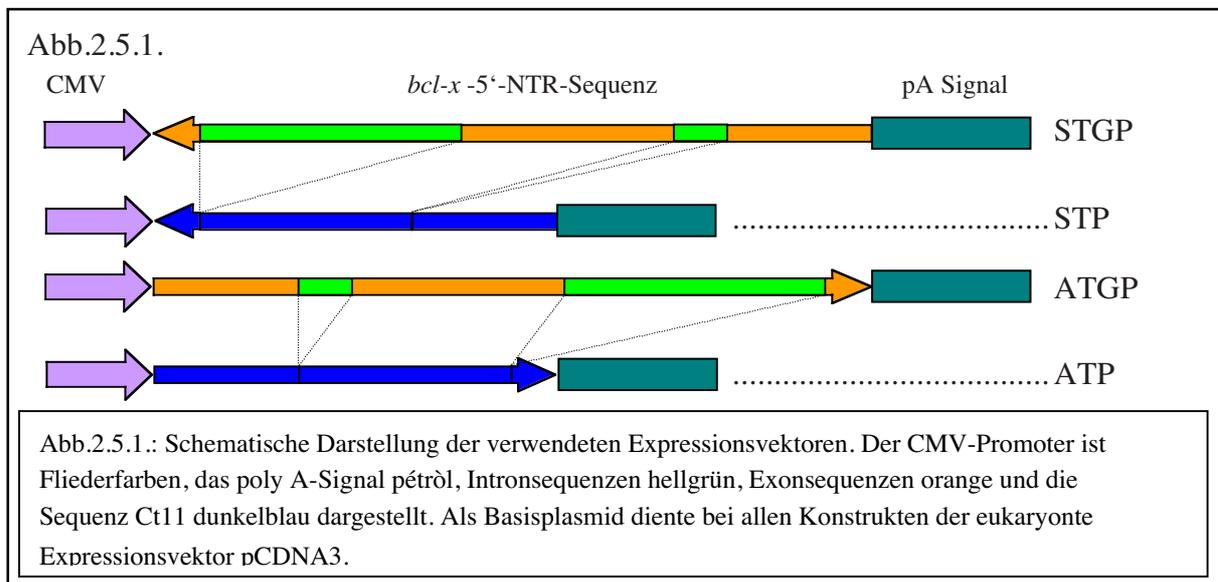


die Proteine eGFP (~ 27 kD) bzw. eGFP/Bcl-xL (~ 54 kD) ohne Hintergrundbanden nachgewiesen werden. Die zusätzlichen, kürzeren Banden, die einem Protein mit dem Molekulargewicht von ca. 18 kD bzw. 42 kD entsprechen, stellen nicht- oder partiell denaturiertes Protein dar. eGFP ist ein außerordentlich stabiles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

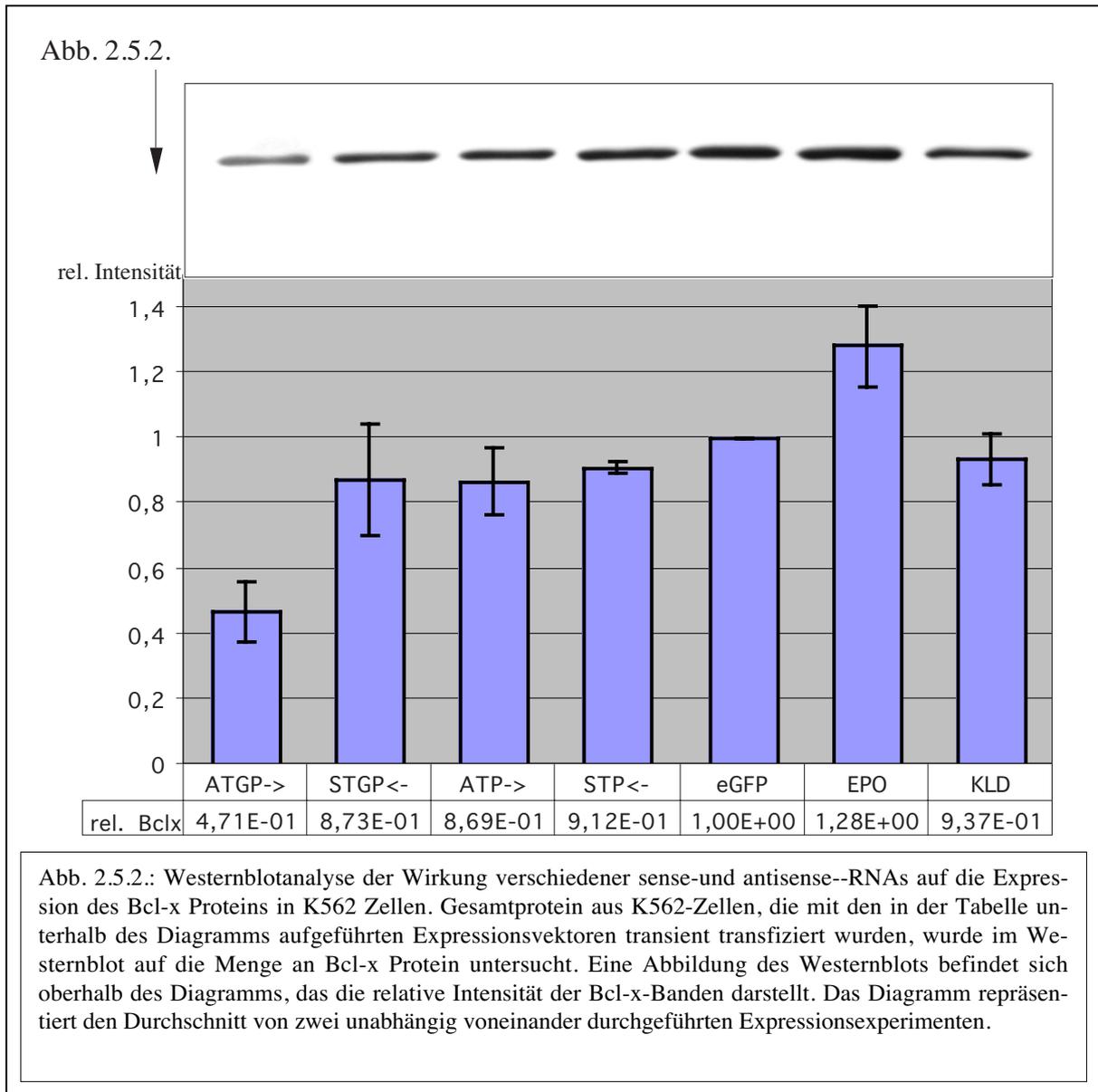
2.5. Inhibition der Bcl-x Translation durch Expression von sense- und antisense RNA in K562 Zellen

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*_(5'-NTR) 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.