

3. Diskussion

Das humane $bcl-x$ Gen hat eine konservierte Struktur, die aus drei Exons und zwei Introns aufgebaut ist

Mit meinen Untersuchungen zu Struktur und Sequenz des humanen $bcl-x$ Gens und der humanen $bcl-x_L$ mRNA habe ich zunächst die experimentelle Basis zur Untersuchung der Expression des $bcl-x$ Gens geschaffen. Von sämtlichen Varianten der $bcl-x$ mRNA war bisher nur die Sequenz des kodierenden Bereichs bekannt [115 – 120] und vom humanen $bcl-x$ Gen waren nur 1011 bp aus dem 5'-NCR, also von Teilen des ersten Exons, sequenziert worden. Von diesem Bereich des humanen $bcl-x$ Gens sind zwei unterschiedliche Sequenzen publiziert worden [101, 103]. Die Sequenzen von Exon 2 und Exon 3 waren nur teilweise als cDNA Sequenz bekannt (siehe oben). Die hier durchgeführten Experimente bestätigten die von Inohara et al. [103] publizierte Sequenz des 5'-NCR des humanen $bcl-x$ Gens und erweitern sie um ca. 900 bp strangaufwärts. Die Aufklärung der vollständigen Sequenz der $bcl-x_L$ mRNA ermöglichte zusätzlich die Bestimmung des größten Teils der Sequenz von Exon 3 des humanen $bcl-x$ Gens. Durch Restriktionskartierung wurde im Bereich des 5'-NCR in U937- und Namalwa-Zellen eine zusätzliche BamHI Schnittstelle nachgewiesen, die mindestens 9.000 bp vom kodierenden Bereich des $bcl-x$ Gens entfernt ist. In Raji-, Jurkat-, K562-Zellen und den in Abschnitt 2.1.2. beschriebenen Klonen $\lambda 4$ und $\lambda 18$, die das $bcl-x$ Gen aus den Blutzellen gesunder Spender repräsentieren, konnte diese BamHI Schnittstelle nicht nachgewiesen werden. Die Restriktionskartierungen erlauben die Schlußfolgerung, daß die zusätzliche BamHI Schnittstelle durch eine Mutation hervorgerufen wurde, die keinen merklichen Einfluß auf die Transkription des $bcl-x$ Gens unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen hat. Außerdem wurde durch die Restriktionskartierung gezeigt, daß das humane $bcl-x$ Gen ähnlich wie des $bcl-x$ Gen der Maus [101] aus drei Exons und zwei Introns aufgebaut ist, also die gleiche Struktur wie das $bcl-2$ Gen hat [106].

Der 5'-NCR des humanen $bcl-x$ Gens hat eine konservierte Sequenz

Die 5'-NCR-Sequenzen des humanen $bcl-x$ Gens und des $bcl-x$ Gens der Maus haben eine Ähnlichkeit von 80%. Die Lage und Art der Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren sind fast identisch [101]. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren aus der STAT-Familie an die GAS-Sequenz im 5'-NCR des $bcl-x$ Gens in *homo sapiens* und *mus musculus* wurde durch EMSA (electrophoretic mobility shift

assay) und ihr Einfluß auf die Transkription durch Reporteragen-Assays nachgewiesen [107, 180]. Die Sequenz des GAS-Motivs ist in beiden Publikationen identisch, aber im 5'-NCR des *bcl-x* Gens aus Maus bindet ausschließlich STAT5 [180] an diese Sequenz und im 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens bindet STAT1 α [107]. Hier ist anzumerken, daß die Promotoraktivität des 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens in Myocyten aus Rattenherz getestet wurde [107]. Die hier zitierten Untersuchungen geben zumindest einen Hinweis darauf, daß das GAS-Motiv im 5'-NCR des *bcl-x* Gens durch Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie gebunden werden kann. Erst kürzlich konnten die Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Ets-2 an Bindungssequenzen im 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens, sowie ihre Wirkung auf die Transkription nachgewiesen werden [181, 182]. Das GAS Motiv befindet sich [107, 180] zwischen Position -331 und -321, das NF- κ B-Bindungsmotiv [181] zwischen Position -340 und -366 und die Ets-1 Bindungssequenzen strangaufwärts von Position -625 im 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens. Ansonsten wurde ein Zusammenhang zwischen der Transkription des *bcl-x* Gens und den Bindungsmotiven, die in seinem 5'-NCR identifiziert werden konnten, nur dadurch hergestellt, daß die durch Cytokine induzierte Änderung der *bcl-x* mRNA- bzw. des Bcl-x Proteinkonzentration gemessen wurde [111 – 114, 122 – 127].

Das humane bcl-x Gen enthält verschiedene Transkriptionsstarts, die strangaufwärts von funktionellen Promotorelementen liegen

Die höchste Promoteraktivität im 5'-NCR des *bcl-x* Gens in Maus liegt zwischen Position -94 und -154 [101], während die höchste Promoteraktivität im 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens zwischen Position -1 und Position -639 lokalisiert wurde [107]. Der Haupttranskriptionsstart des *bcl-x* Gens befindet sich in Thymus-, Milz-, Leber-, Herz- sowie Nierenzellen von Maus bei Position -655, während der Haupttranskriptionsstart in Gehirnzellen von Maus bei Position -727 und Nebentranskriptionsstarts bei Position -83, -96 und -400 lokalisiert wurden [101]. Den Transkriptionsstart des *bcl-x* Gens habe ich in meiner Arbeit in den Zelllinien Raji-, Jurkat-, U937-, Namalwa- und K562 kartiert. Wie auch im *bcl-x* Gen der Maus, gibt es im humanen *bcl-x* Gen mehrere Transkriptionsstarts, von denen aus die *bcl-x*(*Ct11*) mRNA (Start: > -586), die *bcl-x*(*MT*) mRNA (Start: -586), die *bcl-x*(*ms*) mRNA (Start: -561), die *bcl-x*(*J*) mRNA (Start: -526), die *bcl-x*(*ns*) mRNA (Start: -305/-337) und die *bcl-x*(*ss*) mRNA (Start: -305/-337) transkribiert werden (siehe Abschnitt 2.2.4.). Die TATA-Boxen und die *Inr*-Motive, die sich im 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens befinden, stehen in keinem funktionellen Zusammenhang mit den hier kartierten Transkriptionsstarts. Zu-

sätzlich zu den funktionslosen TATA-Boxen enthält die Promoterregion des *bcl-x* Gens jedoch eine große Anzahl von Erkennungsmotiven für den Transkriptionsfaktor HIP1, der die Transkription von TATA-losen Promotoren ermöglicht und den Transkriptionsstart festlegt [183]. Der Transkriptionsstart der *bcl-x(MT)* mRNA und *bcl-x(J)* mRNA liegen jeweils in direkter Nachbarschaft eines HIP1 Erkennungsmotivs, während in der Nachbarschaft des Transkriptionsstarts der anderen *bcl-x* mRNA Varianten keine bekannten Initiatorelemente identifiziert werden konnten. Die Position des GAS-Motivs im 5'-NCR des *bcl-x* Gens ist strangabwärts vom Transkriptionsstart der *bcl-x* mRNA Varianten *bcl-x(Ct11)*, *bcl-x(MT)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(J)*, *bcl-x(ns)* und *bcl-x(ss)* lokalisiert. Der Transkriptionsstart der *bcl-x(MT)* mRNA, dem Haupttranskriptionsstart des humanen *bcl-x* Gens, und die Transkriptionsstarts der *bcl-x(Ct11)*-, der *bcl-x(ms)*- und der *bcl-x(J)* mRNA liegen strangaufwärts von der Position der NF- κ B Bindungsstelle, während der Transkriptionsstart der *bcl-x(ss)*- und der *bcl-x(ns)* mRNA in direkter Nachbarschaft dieses Sequenzmotivs liegen.

Die Transkription und der Transkriptionsstart des humanen bcl-x Gens sind von strangabwärts vom Transkriptionsstart gelegenen Kontrollelementen abhängig

Im allgemeinen liegt der Promoterbereich eines Gens, das von der RNA-Polymerase II transkribiert wird, strangaufwärts vom Transkriptionsstart [178]. Bei Genen, die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden, existieren sogenannte interne Kontrollregionen (ICS), die auch die Promotorfunktion enthalten. Die 5S rRNA- und die tRNA Gene sind die prominentesten Beispiel für RNAs, deren Transkription von einem internen Promoter aus kontrolliert wird [184 – 186]. In den letzten Jahren wurden in den Promoterbereichen verschiedener viraler und eukaryontischer Gene, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden, sogenannte „downstream activating elements“ identifiziert, die strangabwärts vom Transkriptionsstart und teilweise sogar im kodierenden Bereich der mRNA bzw. des Gens liegen [187 – 193] und die Transkription steuern. In einer 400 bis 700 bp strangabwärts vom Transkriptionsstart gelegenen regulatorischen Region im Genom des HI-Virus I wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, AP3 und Sp1, sowie eine IRF-Bindungsstelle nachgewiesen [190]. Im humanen „myosin II heavy chain-A“ Gen konnte 23 kb strangabwärts von den Transkriptionsstarts im ersten Intron des Gens, d.h. bereits im kodierenden Bereich, eine ca. 100 bp lange Region identifiziert werden, welche die Transkriptionsaktivität aktivieren kann. In dieser Region wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren USF1, USF2, Sp1 und Sp3 nachgewiesen [191]. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, daß die strangabwärts vom Transkriptions-

start gelegenen Kontrollelemente in TATA-losen Promotoren nicht nur die Transkriptionsaktivität steuern, sondern auch die Verwendung mehrerer Transkriptionsstartpunkte [192, 193]. Werden diese strangabwärts vom Transkriptionsstart gelegenen Kontrollelemente aus der Sequenz des Gens entfernt, verringert sich die Anzahl der verwendeten Transkriptionsstartpunkte [192] und auch die gesamte Transkriptionsaktivität. In einer großen Anzahl von eukaryontischen Genen mit TATA-losen Promotoren konnte strangabwärts vom Transkriptionsstart ein sogenanntes MED-1 (Multiple start site element downstream) identifiziert werden, das die Lage und Auswahl verschiedener Transkriptionsstarts kontrolliert (Übersicht in [193]). Im humanen *bcl-x* Gen konnte dieses MED-1 Motiv nicht nachgewiesen werden, was daran liegen kann, daß diese Motive im allgemeinen keine stark konservierte Sequenz haben. Da im *bcl-x* Gen der Maus verschiedene Transkriptionsstarts nachgewiesen werden konnten, wurde die Existenz von alternativ verwendeten Promotoren postuliert [101], die bisher nur im *bcl-2* Gen experimentell belegt ist [106]. Die *bcl-x* Promotor des humanen *bcl-x* Gens wurde zwischen -1bp und -600 bp lokalisiert. Weiter strangaufwärts gelegenen Sequenzen im 5'-NCR des humanen *bcl-x* Gens zeigten keine Promotoraktivität [101, 107, 180 – 182]. Außerdem wurden keine weiteren GAS-Motive oder NF-κB Bindungsstellen strangaufwärts der hier kartierten Transkriptionsstarts im humanen *bcl-x* Gen gefunden (Ein weiteres GAS-Motiv liegt allerdings zwischen +50 bp und +61 im kodierenden Bereich des humanen *bcl-x* Gens). Die Lage der *Inr*-Motive, der funktionslosen TATA-Boxen, der Transkriptionsstarts und der Promoterregion lassen unter Berücksichtigung der in [187 – 193] dargestellten Mechanismen der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription nur die Schlußfolgerung zu, daß sowohl die Transkription des *bcl-x* Gens wie auch die Auswahl der Transkriptionsstarts von „downstream acting elements“, also einer strangabwärts vom Transkriptionsstart gelegenen Promoterregion, kontrolliert werden.

Alle Varianten der bcl-x mRNA haben einen langen 5'-NTR der auf eine translationskontrollierte Expression des bcl-x Gens hinweist

Die in Abschnitt 2.2.2. beschriebene *bcl-x(C1A)* mRNA sowie die durch die Kartierung des Transkriptionsstarts identifizierten *bcl-x* mRNA Varianten *bcl-x(Ct11)*, *bcl-x(MT)*, *bcl-x(ms)*, *bcl-x(J)*, *bcl-x(ns)* und *bcl-x(ss)* haben alle einen 5'-NTR, der eine Länge von 270 N bis über 400 N hat. Die 5'-NTRs der meisten mRNAs sind zwischen 10 N und 200 N lang [138, 139]. Das „ribosome scanning“ Modell der Translationsinitiation besagt, daß die Proteinsynthese am 5'-proximalen Startkodon beginnt [145]. Es existiert eine Reihe von mRNAs mit langen 5'-NTRs, die ein oder mehrere zusätz-

liche Startkodons stromaufwärts vom ersten Startkodon des kodierenden Bereichs, oder ein oder mehrere uORFs enthalten, die auf die Translation des stromabwärtsliegenden kodierenden Region inhibierend wirken [137]. Auch GC-reiche Sequenzen und stabile Sekundärstrukturen im 5'-NTR einer mRNA können die CAP-abhängige Initiation der Proteinbiosynthese nach dem „ribosome scanning“ Modell sehr effizient inhibieren, da der „Scanning“ Prozess die Bindung des eukaryontischen Initiationsfaktors 4E (eIF4E) an das ⁷Methyl-G CAP der mRNA und das Aufschmelzen der Sekundärstruktur durch die Helicaseaktivität des Elongationsfaktors eIF4A erfordert [136]. Auf jeden Fall wird eine mRNA, die einen langen 5'-NTR hat, sehr schlecht translatiert. Die in Abschnitt 2.4.4. beschriebenen Experimente zeigen unter anderem deutlich, daß der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA die Translation dieser RNA verglichen mit einer mRNA, die nur einen 10 – 20 N langen 5'-NTR hat, auf ca. 2% bis 10% reduziert. In der Sequenz des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA können drei uORFs sowie eine hohe Anzahl palindromischer Sequenzen, die Haarnaadelstrukturen ausbilden können, nachgewiesen werden. Im 5'-NTR der *bcl-x(ss)* mRNA und der *bcl-x(sn)* mRNA finden sich nur ein- bzw. zwei uORFs und erheblich weniger Palindromsequenzen als im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA. Die Struktur des 5'-NTR der verschiedenen *bcl-x* mRNA Varianten kann die translationskontrollierte Expression des *bcl-x* Gens durch uORFs oder lange strukturierte 5'-NTRs ermöglichen, wie sie für das *bcl-2* Gen [140] bzw. das *bax* Gen [141] nachgewiesen wurde.

Beide Cistrons der bicistronischen bcl-x_L mRNA Varianten kodieren für Proteine mit antiapoptotischer Wirkung

Die Sequenzen der in Abschnitt 2.2.2. beschriebenen bicistronischen *bcl-x_L* mRNAs *bcl-x (F4D)_L* und *bcl-x(B1A)_L* weisen darauf hin, daß die Translation der *bcl-x(MT)* mRNA durch eine IRES (siehe Abschnitt 1.3.3.) gesteuert wird, da die Sequenz ihres 5'-NTR der Sequenz der intercistronischen Region dieser beiden bicistronischen mRNAs entspricht. Viele Gene in Prokaryonten und Mitochondrien werden über polycistronische mRNAs exprimiert [178]. In Vertebraten sind bisher nur sehr wenige funktionelle bicistronische mRNAs, wie die *snurf/snrpn* mRNA [194], die *mpt-synthase* mRNA (Molybdopterin, Untereinheit 1 und 2) [195, 196], die *pp/dsp* mRNA (Dentin-Phosphoryn/Dentin Sialoprotein) [197, 198], die *uog-1/gdf-1* mRNA [199] und die *hcc-1/hcc-2* mRNA [200] beschrieben worden. In *Drosophila melanogaster* sind ebenfalls einige bicistronische mRNAs identifiziert worden [201, 202, 203]. Man nimmt an, daß die Translation des zweiten Cistrons der in den Publikationen [194 – 203] beschriebenen bicistronischen mRNAs durch Reinitiation oder internen Ribo-

someneintritt kontrolliert wird. Bisher wurde jedoch nur im Fall der bicistronischen *LINE* mRNA in Ratte die Regulation der Translation des zweiten Cistrons durch Reinitiation oder internen Ribosomeneintritt nachgewiesen [204]. Die Proteine, die in Prokaryonten auf einer polycistronischen mRNA kodiert werden, haben im allgemeinen eine ähnliche biologische Funktion oder sind Teil eines Operons [178, 205]. Die Cistrons der in Vertebraten und *Drosophila Melanogaster* identifizierten bicistronischen mRNAs kodieren in den meisten Fällen für verschiedene Untereinheiten eines Proteins oder für verschiedene Proteine, die eine ähnliche biologische Aufgabe haben [194 – 204]. Das erste Cistron der *bcl-x(B1A)_L* mRNA entspricht dem kodierenden Bereich der *hla-e* mRNA. Die Proteine der MHC-1 Familie (HLA-B, C und E) regulieren die cytotoxische Wirkung von NK-Zellen und cytotoxischen T-Zellen [53]. Die Präsentation der Leitpeptide verschiedener MHC-1 Moleküle durch HLA-E aktiviert den inhibitorischen Rezeptor CD94/NKG2 auf der Oberfläche von NK-Zellen und die Sekretion von Perforin und Granzym durch die NK-Zelle, d.h. ihre cytotoxische Aktivität, wird inhibiert [54, 55, 56]. In diesem Zusammenhang haben HLA-E und Bcl-x_L eine eindeutig antiapoptotische Wirkung, die einen wirksamen Schutz gegen die cytotoxische Wirkung von NK-Zellen darstellt, da Bcl-x_L zusätzlich die durch GranzymB vermittelte Aktivierung der Procaspase 9 blockieren kann [96 – 99]. Beide Proteine üben also eine ähnliche biologische Funktion aus. Die Sequenz des ersten Cistrons der *bcl-x(F4D)_L* mRNA entspricht der kodierenden Region der *ctip/rim* mRNA. Die biologische Funktion von CtIP/Rim ist bisher noch nicht aufgeklärt worden. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, daß CtIP/Rim mit den Tumorsuppressoren Rb [50], BRCA1 [51, 52] und dem Korepressor der Transkription CtBP [43 – 48] assoziieren kann. Die Assoziation von CtIP, BRCA1 und CtBP inhibiert die Transkription von p21^{Cip1/Waf1} und verhindert so eine Arretierung des Zellzyklus [52]. Die Inhibition eines Tumorsuppressorproteins kann als Hinweis auf eine mögliche antiapoptotische Wirkung von CtIP gewertet werden. Da auch Bcl-x_L die Wirkung von Tumorsuppressoren wie p53 [37, 92] inhibiert, kann man auch hier sagen, daß Bcl-x_L und CtIP eine ähnliche biologische Aufgabe erfüllen.

Die beiden bicistronischen bcl-x_L mRNA Varianten werden durch trans-Spleißen generiert

Der Nachweis der beiden bicistronischen *bcl-x_L* mRNAs *bcl-x (F4D)_L* und *bcl-x(B1A)_L* in den humanen Zelllinien Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562, die ähnliche biologische Funktion beider Cistrons dieser RNAs und ihre Isolierung aus zwei verschiedenen cDNA-Banken (siehe Abschnitt 2.3. und 2.2.2.) zeigen deutlich, daß sowohl Sequenz als auch Existenz dieser beiden bicistronischen *bcl-x_L* mRNAs nicht als Klo-

nierungsartefakt zu bewerten sind, obwohl sie in den hier untersuchten Zelllinien nur schwach exprimiert werden. Beide Cistrons der bicistronischen *snurf/snrpn*-, der *mpt-synthase*-, der *pp/dsp*-, der *uog-1/gdf-1*-, der *hcc-1/hcc-2* und der *LINE* mRNA sowie verschiedener bicistronischer mRNAs aus *Drosophila melanogaster* werden von einem Locus transkribiert [194 – 204]. Das *hla-e* Gen liegt beim Menschen im MHC-Locus auf Chromosom 6 [8], das humane *ctip/rim* Gen wurde auf Chromosom 18 nachgewiesen [50] und das humane *bcl-x* Gen wurde unter Zuhilfenahme von Maus-Mensch Homologien auf Chromosom 20 lokalisiert [101, 102]. Die beiden in Abschnitt 2.2.2. beschriebenen bicistronischen *bcl-x_L* mRNAs können nur durch *trans*-Spleißen generiert werden, da zum einen in den hier untersuchten Zelllinien keine Translokation des *bcl-x* Gens, des *ctip/rim* Gens oder des *hla-e* Gens nachzuweisen war und die Wahrscheinlichkeit, daß fünf verschiedenen humane Zelllinien die gleiche Chromosomentranslokation haben, verschwindend gering ist. Bei Vertebraten sind nur sehr wenige Beispiele von zellulären RNAs bekannt, die durch *trans*-Spleißen entstanden sind. Dazu gehören die *Carnitinoctanoyltransferase* pre-mRNAs in Ratte [206], die *CaM Kinase II* mRNA im Menschen [207] und eine Variante der *Östrogenrezeptor* mRNA [208]. Die Mechanismen und molekularen Voraussetzungen für ein erfolgreiches *trans*-Spleißen sind bisher im wesentlichen in *Trypanosoma Brucei* und *Caenorhabditis elegans* untersucht worden [209 – 213]. Auch die mRNA, die für das Bcl-x_γ Protein kodiert [120], dessen C-terminale Sequenz nicht im dritten Exon des *bcl-x* Gens nachzuweisen ist, scheint durch *trans*-Spleißen generiert worden zu sein, wobei die vielen Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA (siehe Abschnitt 2.2. und [115 – 120]) sehr deutlich zeigen, daß diese mRNA das Ziel einer ungewöhnlich starken Spleißaktivität ist. Die möglichen Mechanismen des *trans*-Spleißens im Bereich des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA müssen eingehender untersucht werden.

Die translationskontrollierte Expression des bcl-x Gens wird durch IRES Elemente im 5'-NTR der bcl-x mRNA reguliert

Die Sequenz des 5'-NTR verschiedener Spleißvarianten der *bcl-x* mRNA (siehe Abschnitt 2.2.3. und 2.2.4.) und die Sequenz der intercistronischen Region der zwei bicistronischen *bcl-x_L* mRNAs (siehe Abschnitt 2.2.2.) können Strukturen ausbilden, welche die translationskontrollierte Expression des *bcl-x* Gens durch internen Ribosomeneintritt ermöglichen. Die in den Abschnitten 2.3.1. und 2.3.2. dargestellten Experimente zeigen, daß die Transkription der *bcl-x* mRNA, die durch PCR-Primer und Hybridisierungssonden, die spezifisch für den kodierenden Bereich der *bcl-x* mRNA sind, in anderer Weise von INF- γ , Cycloheximid oder der Zelldichte beeinflusst wird

als die Translation des Bcl-x Proteins. Dieser Unterschied in den Expressionsmustern ist ein weiterer Hinweis auf eine translationskontrollierte Expression des *bcl-x* Gens [136, 137]. Die in Abschnitt 2.4. beschriebenen Experimente beweisen, daß die Sequenz des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA eine IRES enthält, so daß die Translation dieser mRNA durch internen Ribosomeneintritt initiiert wird. Der 5'-NTR der *bcl-x(Ct11)* mRNA ist länger, die 5'-NTRs der *bcl-x(ms)* und der *bcl-x(J)* mRNA sind 25 N bzw. 60 N kürzer als der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA, so daß die im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA nachgewiesene IRES mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Translation der *bcl-x(Ct11)*-, der *bcl-x(ms)*- und der *bcl-x(J)* mRNA kontrolliert. Da die Sequenz der intercistronischen Region der bicistronischen *bcl-x(B1A)_L*- bzw. *bcl-x(F4D)_L* mRNAs mit der Sequenz des 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA übereinstimmt, ist damit auch bewiesen, daß das zweite Cistron der beiden bicistronischen *bcl-x_L* mRNAs kontrolliert translatiert werden kann und diese RNAs eine funktionelle Einheit darstellen. Die IRES im 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA und in der intercistronischen Region der bicistronischen *bcl-x(B1A)_L*- bzw. *bcl-x(F4D)_L* mRNA ermöglicht eine Steigerung der Translation des zweiten Cistrons einer bicistronischen mRNA, je nach Zelllinie, um den Faktor 1,5 bis 5 (siehe Abschnitt 2.4.3.) und stellt einen definierten Translationsstart sicher (siehe Abschnitt 2.4.4.). Die IRES-Elemente der zellulären *vegf*, *pdgf2*, *igfII* und *bip* mRNA stimulieren die Translation des zweiten Cistrons einer bicistronischen mRNA 2- bis 10fach [147, 151 – 155], während die IRES Elemente im 5'-NTR der *c-myc* mRNA oder in der RNA von Picorna-Viren die Translation des zweiten Cistrons einer bicistronischen mRNA 50- bis 100 fach stimulieren [147, 148, 157, 160]. Die Struktur der hocheffizient translatierten IRESs aus dem 5'-NTR der *c-myc* bzw. viralen mRNAs ist relativ stark konserviert [160]. Die Sequenz dieser Bereiche ermöglicht die Bildung einer Y-förmigen Haarnadelstruktur, die von einer kleineren Haarnadelstruktur direkt strangaufwärts vom Translationsstart gefolgt wird [147, 148, 157, 160]. Die Struktur der „schwachen“ IRES Elemente im 5'-NTR der *vegf*-, *pdgf2*-, *igfII*- und *bip* mRNA ist weniger stark konserviert, wobei die Struktur des 5'-NTR der *pdgf2* mRNA [155] überhaupt keine Ähnlichkeit mehr mit der Struktur der „starken“ IRES Elemente hat. Der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA kann eine Vielzahl von Haarnadelstrukturen ausbilden. Das 5'-Ende der Sequenz bildet eine relativ kurze Haarnadelstruktur aus, die von zwei langen, stark verzweigten Haarnadelstrukturen und einer kurzen Haarnadelstruktur direkt strangaufwärts vom Translationsstart gefolgt wird (Daten nicht gezeigt). Alle computer-gestützten Strukturmodelle von IRES-Elementen zeigen, daß das 5'-Ende der RNA durch Ausbildung der Sekundärstruktur in direkte Nachbarschaft des Translations-

starts gebracht wird. Durch Bindung der zellulären Proteine La und PTB [136, 137, 147, 162 – 166] wird die Initiation der Translation von einer viralen IRES aus ermöglicht bzw. gesteigert. Auf die IRES abhängige Translation zellulärer mRNAs (siehe oben) haben diese Proteine keinen Einfluß. Es konnte allerdings für zwei zelluläre mRNAs, deren 5'-NTR eine IRES enthält, nachgewiesen werden, daß ihre Translation durch extrazelluläre Stimuli induziert werden kann. Die IRES-abhängige Translation der *pdgf2* mRNA wird stimuliert, wenn die Zellen durch Einfluß von TPA differenzieren [155] und die IRES-abhängige Translation der *vegf* mRNA wird unter Sauerstoffmangel aktiviert und durch Bindung des *von Hippel-Lindau* Proteins, einem Tumorsuppressor, an den 3'-NTR stabilisiert [214, 215, 216]. Welche extrazellulären Stimuli die Translation der *bcl-x(B1A)_L*-, *bcl-x(F4D)_L*- und der *bcl-x(MT)* mRNA induzieren können und welche Proteine an der Signaltransduktion beteiligt sind, ist bisher noch nicht untersucht worden. Auf jeden Fall können die *bcl-x(B1A)_L*-, *bcl-x(F4D)_L*- und die *bcl-x(MT)* mRNA CAP-unabhängig translatiert werden, wenn die CAP-abhängige Translation der zellulären mRNAs zum Beispiel infolge einer Entero- oder Aphotovirusinfektion (Picornaviren) durch Spaltung des Translationsfaktors eIF4G verhindert wird. Ob das antiapoptotische Bcl-x_L Protein so eine Virusreplikation unterstützt, oder ob die antiapoptotische Wirkung von Bcl-x_L die Bekämpfung virusinfizierter Zellen ermöglicht, muß ebenfalls noch untersucht werden.

Die verschiedenen Varianten der bcl-x mRNA werden unterschiedlich effizient translatiert

Wie in Abschnitt 2.3.2. dargestellt, weisen Raji- und K562-Zellen eine ähnlich hohe Bcl-x-Translationsrate auf, obwohl sich die Menge der exprimierten *bcl-x* mRNA in beiden Zelllinien drastisch unterscheidet. Durch Untersuchung der Expression aller *bcl-x* mRNA Varianten unter Einfluß von Zelldichte, INF- γ und Cycloheximid konnte ein Zusammenhang zwischen den mRNA- und den Proteinexpressionsmustern hergestellt werden. Auch hier zeigt sich, daß die *bcl-x(ss)*- und die *bcl-x(sn)* mRNA erheblich effizienter translatiert wird als die *bcl-x(MT)* mRNA. In Raji-, Namalwa- und K562-Zellen wurde eine Kongruenz der Expressionsmuster des Bcl-x Proteins mit den Expressionsmustern der *bcl-x(ss)*- bzw. der *bcl-x(sn)* mRNA nachgewiesen. In U937- und Jurkat Zellen ist dagegen eine Kongruenz der Expressionsmuster des Bcl-x Proteins mit dem Expressionsmuster der *bcl-x(Ct11)* mRNA nachweisbar. Das kann daran liegen, daß die *bcl-x(ss)*- und die *bcl-x(sn)* mRNA eine effizientere IRES haben, oder daran, daß ihr 5'-NTR kürzer, weniger strukturiert und GC-haltig ist als der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA. Ob die *bcl-x(ss)* und *bcl-x(sn)* 5'-NTRs eine IRES enthalten, ist noch nicht untersucht worden. In Jurkat-, und U937-Zellen werden

diese mRNAs nur sehr schwach- oder gar nicht transkribiert. Hier wird die *bcl-x(Ct11)* mRNA effizienter translatiert als die *bcl-x(MT)* mRNA, was zumindest einen Hinweis darauf ist, daß der 5'-NTR der *bcl-x(Ct11)* mRNA eine „stärkere“ IRES beinhaltet, als der 5'-NTR der *bcl-x(MT)* mRNA. Diese Experimente zeigen deutlich, daß diejenige mRNA bevorzugt translatiert wird, die eine einfache Initiation der Translation ermöglicht. Welche Form der *bcl-x* mRNA in gesunden Körperzellen bevorzugt transkribiert wird, muß noch analysiert werden. Allerdings deuten die Expressionsmuster in den hier untersuchten Zelllinien darauf hin, daß die Transkription der *bcl-x(MT)*- oder der *bcl-x(Ct11)* mRNA den „Normalfall“ darstellt, während eine starke Transkription der *bcl-x(ss)*- und der *bcl-x(sn)* mRNA eher mit einer malignen Entartung der Zelle in Verbindung zu bringen ist.

Die zelluläre bcl-x antisense RNA hat möglicherweise eine katalytische Funktion beim trans-Spleißen

In allen hier untersuchten Zelllinien konnte eine zelluläre *bcl-x* antisense RNA nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 2.3.5.), deren Transkriptionsstart bei Position -441 relativ zum ersten Startkodon im kodierenden Bereich des *bcl-x* Gens liegt. Diese zelluläre *bcl-x* antisense RNA wird nur in sehr geringem Ausmaß in antisense Orientierung, also strangaufwärts, transkribiert. Der Einfluß einer zellulären *bcl-2* antisense RNA auf die Expression des *bcl-2* Gens ist vor kurzem nachgewiesen worden [134, 135]. Die transiente Expression von *bcl-x* antisense RNAs in K562-Zellen hatte keinen Effekt auf die Bcl-x Biosynthese. Die transiente Expression einer *bcl-x* anti-antisense RNA, deren Sequenz teilweise mit der Sequenz der *bcl-x(ss)* und *bcl-x(sn)* mRNA übereinstimmte, bewirkte eine Reduzierung der Bcl-x Proteinmenge um 40%–60%, während eine *bcl-x* anti-antisense RNA, deren Sequenz dem 5'-NTR der *bcl-x(Ct11)* mRNA entsprach, keinerlei Einfluß auf die Bcl-x Menge hatte. Diese Experimente zeigen, daß die zelluläre *bcl-x* antisense RNA im Gegensatz zur zellulären *bcl-2* antisense RNA keinen Einfluß auf die Genexpression hat. Möglicherweise erfüllt die zelluläre *bcl-x* antisense RNA als Komponente eines für *trans*-Spleißen spezifischen snRNPs (SL RNP) [217] katalytische Aufgaben beim *trans*-Spleißen des 5'-NTR der *bcl-x* mRNA mit anderen mRNAs, wie zum Beispiel der *hla-e*- oder der *ctip/rim* mRNA.

Die IRES-abhängige Translation der bcl-x mRNA kann durch transiente Expression von translationskontrollierenden Sequenzen kompetitiv gehemmt werden

Die transiente Überexpression einer bestimmten RNA, die ca. 10 bis 15 fach stärker transkribiert wird als die zelluläre RNA, beeinflußt im allgemeinen nicht die CAP-

abhängige Translation der anderen zellulären mRNAs, wie die Ergebnisse der in Abschnitt 2.5. beschriebenen Experimente unter anderem deutlich zeigen. Die in K562 Zellen gemessene Verringerung der Bcl-x Proteinmenge als Folge der transienten Überexpression einer *bcl-x* anti-antisense RNA, deren Sequenz teilweise mit der Sequenz der *bcl-x(sn)* mRNA übereinstimmt (siehe Abschnitt 2.5.) deutet darauf hin, daß die Translation der *bcl-x(sn)* mRNA spezifische Faktoren benötigt, die nur in einer begrenzten Menge in der Zelle vorhanden sind. Die Translation der *bcl-x(sn)* mRNA wird durch die Expression der oben genannten *bcl-x* anti-antisense RNA offensichtlich kompetitiv gehemmt, da diese anti-antisense RNA den 5'-NTR der *bcl-x(sn)* mRNA darstellt, der möglicherweise Sequenzelemente enthält, die die Initiation der Translation beeinflussen. So zeigen diese Experimente nicht nur, welche Variante der *bcl-x* mRNA in K562-Zellen translatiert wird, sondern auch, daß die Translation der *bcl-x(sn)* mRNA nicht nach dem klassischen „ribosome scanning“ Modell initiiert wird, sondern von bisher noch nicht identifizierten Faktoren abhängig ist, die sich von den allgemeinen Initiationsfaktoren der Translation unterscheiden und nur in begrenzter Menge verfügbar sind.
