

Zwischen Genen, biologischer Komplexität und Krankheiten: Alternatives Spleißen von Botenmolekülen

H. König, ITG

Eine der größten Überraschungen bei der Analyse des menschlichen Erbgutes war die Identifizierung von nur 30.000-40.000 proteinkodierenden Genen [1, 2] – nur circa zweimal mehr als bei der Fliege oder einem einfachen Fadenwurm (s. Abb.1). Die Entwicklung der hohen biologischen Komplexität des Menschen (und wahrscheinlich auch anderer Säugetiere), basierend auf einer solch relativ kleinen Zahl von Genen, erklärt sich hauptsächlich durch zelluläre Mechanismen, über die aus einem einzigen Gen verschiedene Proteine (Eiweiße) hergestellt werden können.

Der weitaus häufigste dieser Mechanismen ist alternatives prä-mRNA-Spleißen [3, 4] (s. Abb. 2). Es beruht auf der Eigenschaft von Genen aller Organismen (außer Bakterien) die Information zur Herstellung eines Proteins in kleinen Stücken (Exons) zu enthalten, die voneinander durch lange nichtkodierende Genbereiche (Introns) getrennt sind. Während der Reifung eines Vorläufer-Botenmoleküls (prä-mRNA) zum funktionellen Botenmolekül (mRNA) müssen die Introns herausgeschnitten werden und die Exons zu einer zusammenhängenden, proteinkodierenden RNA-Sequenz zusammengefügt werden. Man bezeichnet dies als Spleißen. Exons können dabei in unterschiedlicher Weise miteinander kombiniert werden, wodurch aus einem Gen bzw. Vorläufer-Botenmolekül unterschiedliche mRNAs und Proteine hergestellt werden können. Dies wird als alternatives Spleißen bezeichnet. Nach gegenwärtigen Schätzungen spielt alternatives

Spleißen bei der RNA- und Proteinbildung von mindestens 60% aller menschlichen Gene eine Rolle [1]. Proteinformen, die durch alternatives Spleißen hergestellt werden (sog. Spleißvarianten) spielen in der normalen Entwicklung von Organismen und – wenn zur falschen Zeit oder in der falschen Zelle hergestellt – bei der Entstehung menschlicher Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen oder Krebs, eine wichtige Rolle [5, 6]. Damit Zellen am richtigen Ort im Organismus zur richtigen Zeit Spleißvarianten herstellen kön-

nen, müssen sie entsprechende Signale (z.B. Wachstumsfaktoren oder entwicklungssteuernde Substanzen) aus ihrer Umgebung detektieren und über zelluläre Signalwege die Spleißmaschinerie entsprechend instruieren. Wie solche extrazellulären Signale alternative Spleißprozesse steuern können ist weitgehend unbekannt.

Das Ziel unserer Arbeiten ist es Eiweißstoffe zu identifizieren, welche alternatives Spleißen in normalen Körperfunktionen und bei der Entstehung von Krebs

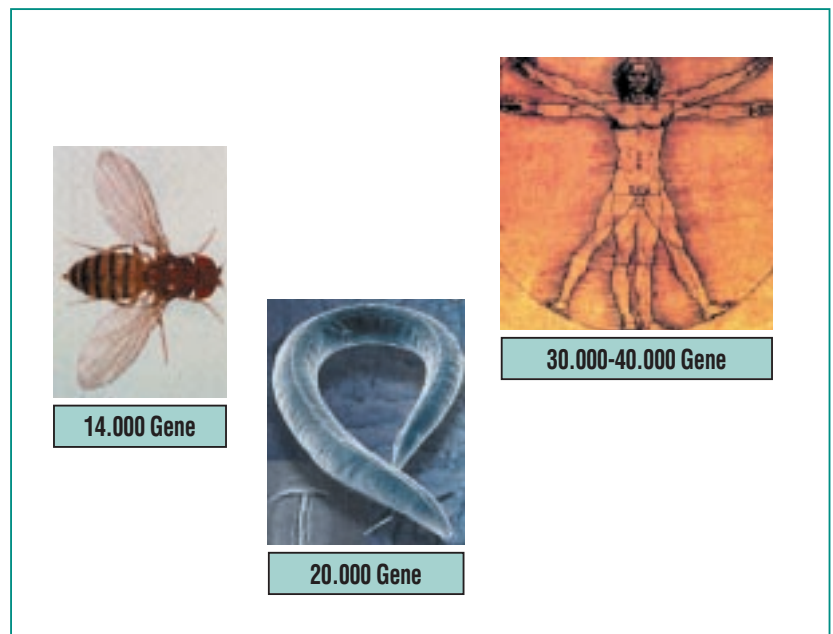


Abb.1: Die Analyse des menschlichen Erbgutes ergab überraschenderweise nur 30.000 bis 40.000 Gene (Abschnitte auf der Erbsubstanz, DNA, welche Eiweiße kodieren). Das sind nur ungefähr zweimal mehr Gene als bei der Fruchtfliege oder bei einem einfachen Fadenwurm. Die erhebliche Diskrepanz zwischen biologischer Komplexität und unserer Genzahl wird durch die Existenz und die häufigere Verwendung von Mechanismen erklärt, durch die aus einem einzigen Gen verschiedene Proteine (Eiweiße) hergestellt werden können. Somit können wir trotz nur wenig mehr Genen eine größere Zahl verschiedener Proteine (also der Moleküle, welche den Körperfunktionen und -formen zugrundeliegen) herstellen als z.B. ein Wurm.

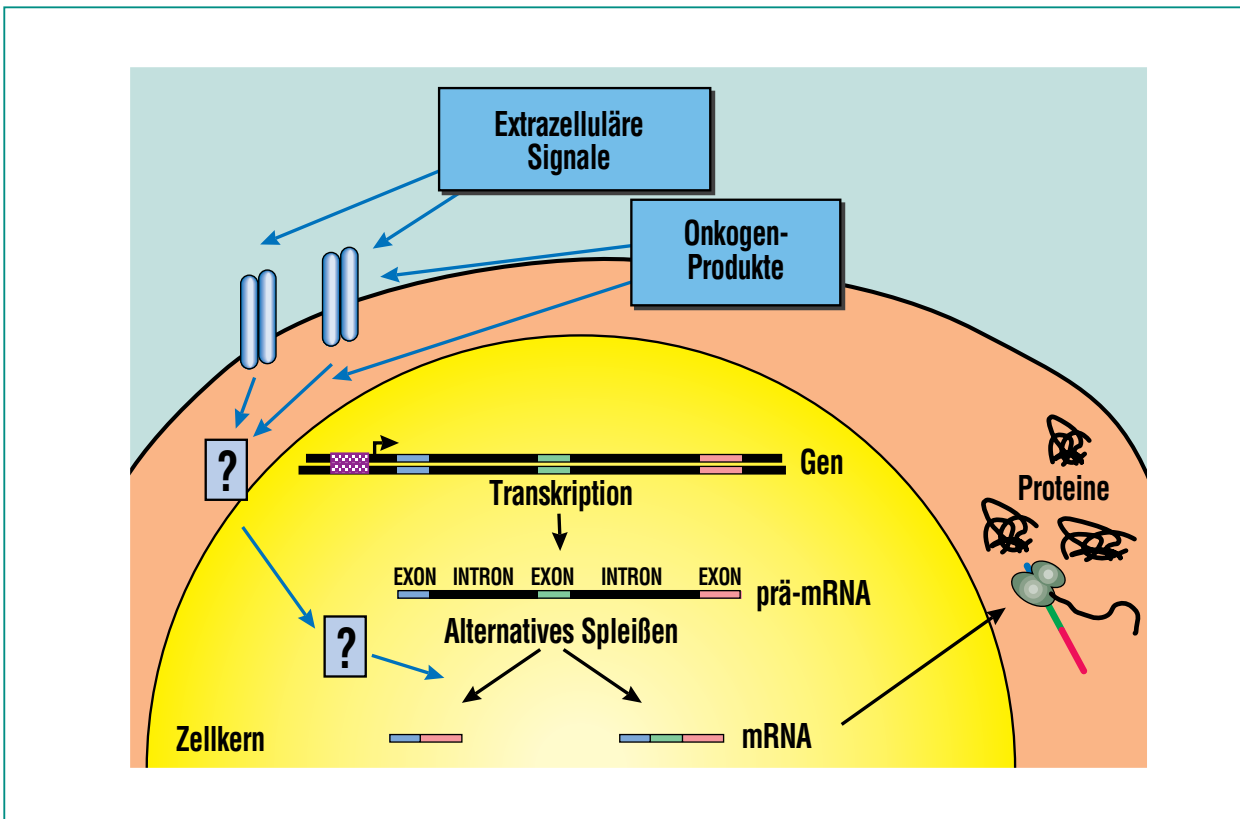


Abb. 2 : Die Information für die Herstellung eines Proteins liegt in unseren Genen nicht als kontinuierliche Informationsabfolge vor, sondern ist auf kurze Stückchen (sog. Exons) verteilt. Diese sind voneinander durch lange nicht-kodierende Genbereiche (sog. Introns) voneinander getrennt. Diese gestückelte Natur der Erbinformation bleibt bei der Abschrift (Transkription) des Gens in ein Vorläufer-Botenmolekül (prä-mRNA) zunächst erhalten. Um ein proteinkodierendes, reifes Botenmolekül (mRNA) zu erhalten, müssen die Intronbereiche herausgeschnitten und die Exonsequenzen zusammengefügt werden. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet. In mindestens 60% aller menschlichen Gene können die proteinkodierenden RNA-Stücke (Exons) in unterschiedlicher Weise zusammengefügt werden. Hierdurch können aus einem Gen bzw. einem Vorläufer-Botenmolekül unterschiedliche mRNAs und damit Proteine (Eiweiße) hergestellt werden können. Man bezeichnet dies als alternatives Spleißen. Alternatives Spleißen wird durch instruierende Signale aus der Umgebung der Zelle oder durch zelluläre Signalmoleküle, zu denen viele Onkogen-Produkte (Produkte von Genen, deren Veränderung Zellen zu Krebszellen machen können) reguliert. Es spielt in der Embryonalentwicklung und bei der Entstehung von Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. bestimmte Formen der Alzheimerschen Krankheit) oder Krebs eine wichtige Rolle.

steuern. Darüberhinaus wollen wir die zellulären Signalrouten finden und erforschen, die es Zellen ermöglichen Spleißmuster in Antwort auf äußere Signalstoffe oder nach Veränderung bestimmter Gene (z.B. Krebsgene) über diese Eiweißstoffe zu verändern.

Das „Modell-Gen“ mit Hilfe dessen wir solche Proteine und Signalwege finden und untersuchen wollen, ist das CD44-Gen. Es kodiert ein Zelloberflächenmolekül von dem durch alternatives prä-mRNA-Spleißen verschiedene Formen, sog. CD44-Varianten

entstehen (s. Abb. 3). Diese varianten CD44-Formen sind in der Embryonalentwicklung, bei der Immunantwort und bei der Bildung vieler bösartiger Tumore von entscheidender Bedeutung [7, 8, 9]. Die Identifizierung von Proteinen, welche alternatives

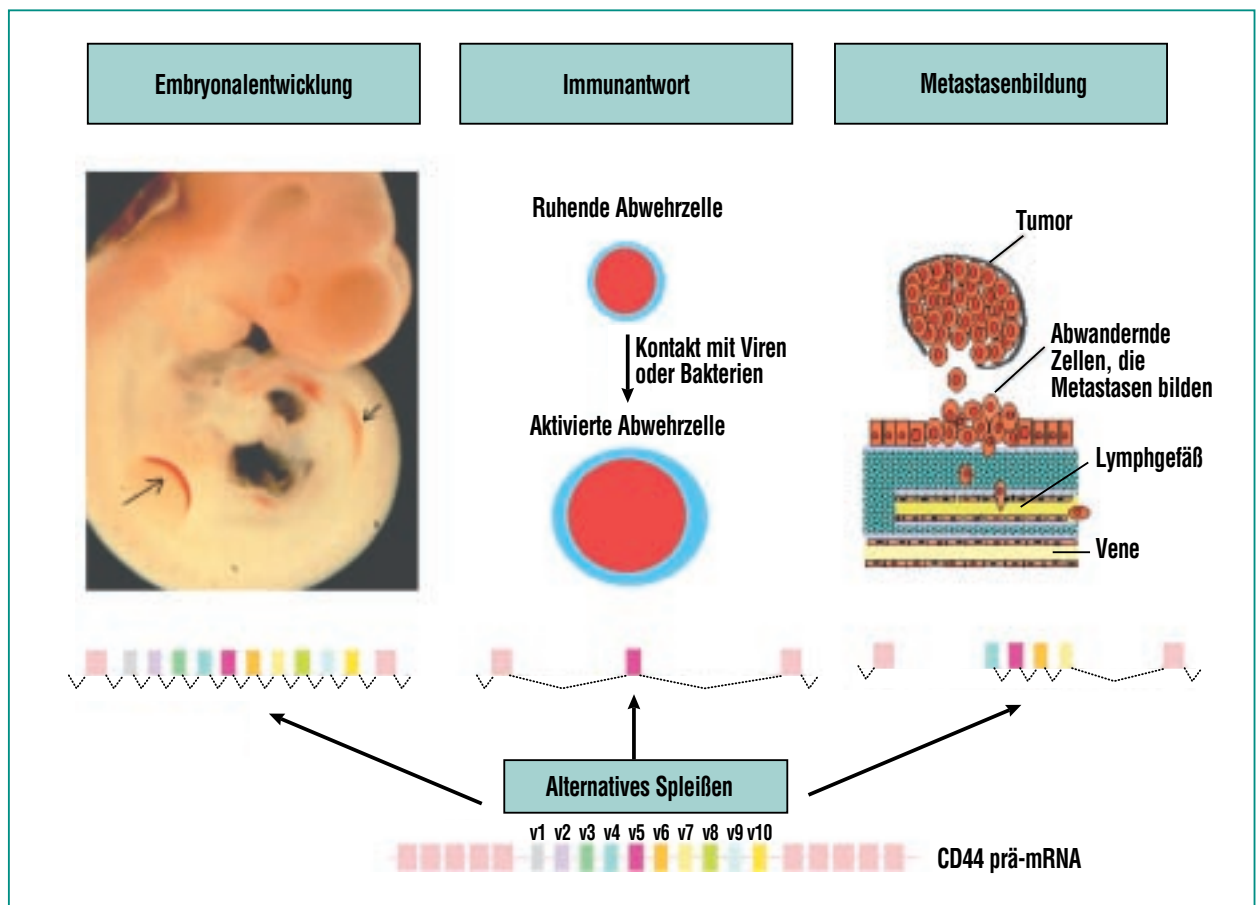


Abb. 3 : Verschiedene Proteinformen des Zelloberflächenmoleküls CD44 entstehen durch alternatives Spleißen unter Verwendung von bis zu zehn sog. varianter Exonsequenzen (v1-v10). Die daraus resultierenden varianten CD44-Formen spielen in der Embryonalentwicklung, bei der Aktivierung körpereigener Abwehrmechanismen (Immunantwort) und bei der Entstehung von Krebsmetastasen (tödliche Tochtergeschwülste) eine wichtige Rolle.

Spleißen von CD44 in diesen Prozessen steuern, wird es uns ermöglichen, die Rolle dieser Eiweißstoffe im Organismus zu studieren und mögliche Funktionen dieser Proteine in der Regulation anderer medizinisch relevanter Gene zu finden.

Kürzlich konnten wir einen in allen Lebewesen (außer Bakterien) vorkommenden Signalweg identifizieren (den sog. MAP-Kinase-Weg) über den Signalstoffe Spleißmuster regulieren [10]. Er wird durch das Produkt des *ras*-

Krebsgenes, einem zentralen Signalmolekül der Zelle (das in vielen Tumoren unkontrolliert aktiv ist), aktiviert und steuert Prozesse in der Embryonalentwicklung, in unseren körpereigenen Abwehrreaktionen (Immunantwort) und in der Entstehung von Tumoren [11, 12, 13]. Als weiteren entscheidenden Schritt konnten wir Eiweiße identifizieren, die an RNA-Exon-Sequenzen [14] in der Vorläufer-Boten-RNA des CD44-Gens binden [15, 16]. Eines dieser Eiweiße wird von die-

sem Signalweg direkt angesteuert (s. Abb. 4). Dabei wird es durch das zentrale Effektormolekül des MAP-Kinase-Weges chemisch verändert (phosphoryliert), wodurch das Exon für die Spleißmaschinerie zum Verbleib in der reifen Boten-(m)RNA markiert wird [16]. Damit konnte zum erstenmal ein spleißregulatorisches Protein identifiziert werden, das Signale aus der Umgebung von Zellen und bei der Krebsentwicklung aktivierte zelluläre Signalwege an die Entste-

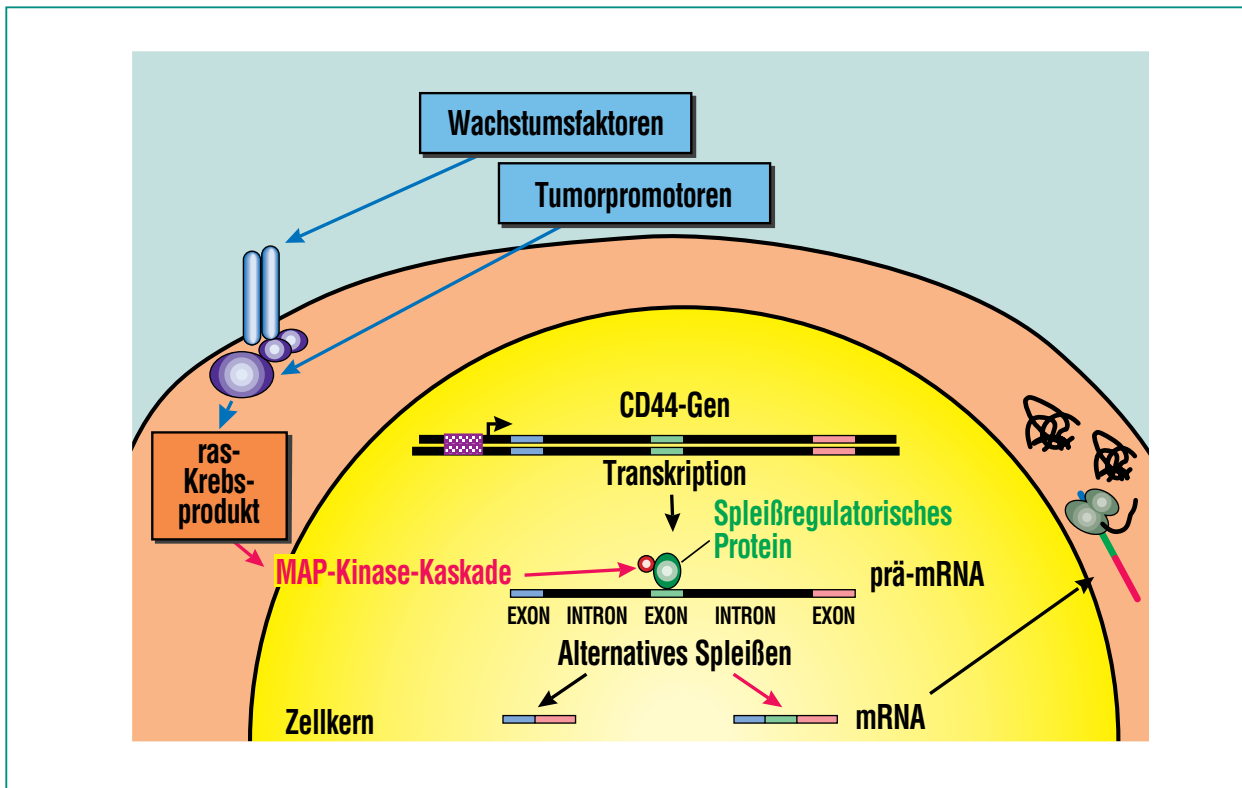


Abb. 4: Wir konnten einen in fast allen Lebewesen vorkommenden zellulären Signalübertragungsweg identifizieren (die sog. MAP-Kinase-Kaskade) über den äußere Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren, aber auch bestimmte krebsauslösende Substanzen (Tumorpromotoren) alternatives Spleißen des CD44-Vorläufer-Botenmoleküls (prä-mRNA) regulieren. Der gefundene Signalweg beinhaltet das Produkt des *ras*-Krebsgenes, ein zentrales Signalmolekül der Zelle, welches in vielen Tumoren unkontrolliert aktiv ist. Der Signalweg spielt in der Embryonalentwicklung, in der Immunantwort und in der Tumorentstehung eine Rolle. Desweiteren konnten wir ein Eiweiß identifizieren, das an eine variante Exonsequenz im Vorläufer-Botenmolekül des CD44-Gens bindet. Es wird von der MAP-Kinase-Kaskade direkt angesteuert und chemisch verändert (phosphoryliert). Diese signal-induzierte Veränderung des spleißregulatorischen Eiweißes führt zu dessen Aktivierung und, auf noch nicht verstandene Weise, zum Verbleib des gebundenen Exons in der reifen CD44-mRNA und damit zur Bildung varianter CD44-Formen. Eine wichtige Aufgabe unserer zukünftigen Arbeit wird es sein zu verstehen wie solche signal-induzierten Veränderungen von regulatorischen Eiweißstoffen die Spleißmaschinerie aktivieren und welche Rolle solche regulatorischen Eiweißstoffe in der normalen Entwicklung des Organismus und bei der Entwicklung von Krebs spielen.

hung von Spleißvarianten koppelt. Eine solche Kopplung über eine chemische Veränderung von spleißregulatorischen Eiweißstoffen könnte ein allgemeines Prinzip für die Regulation bzw. die Veränderung von Spleißmustern in normalen und krankhaften Prozessen sein. Wichtige Aufgaben

unserer zukünftigen Arbeit werden deshalb sein zu verstehen wie solche signal-induzierten Veränderungen spleißregulatorischer Proteine die Spleißmaschinerie aktivieren und welche Rolle solche regulatorischen Eiweißstoffe im gesunden und im kranken Organismus spielen.

Zusammenfassung

Alternatives Spleißen von Botenmolekülen ist ein wichtiger Mechanismus für die Entwicklung der biologischen Komplexität höherer Organismen und für die Herstellung von wichtigen Eiweißformen in den Zellen unse-

res Organismus. Wir haben einen zentralen zellulären Signalübertragungsweg gefunden, der die Herstellung von Metastasen-assoziierten Formen des Zelloberflächenmoleküls CD44 durch alternatives Spleißen steuert. Darüberhinaus konnten wir das erste

spleißregulatorische Eiweiß identifizieren, das auf instruierende Signale aus der Zellumgebung und auf in Krebszellen aktivierte zelluläre Signalmoleküle reagiert. Diese Entdeckung eröffnet die Möglichkeit die Rolle dieses und verwandter Eiweißstoffe im Orga-

nismus zu studieren und mögliche Funktionen dieser Proteine in der Regulation anderer medizinisch relevanter Gene zu finden.

Literatur

- [1] *International human genome sequencing consortium. Nature 409, 860-921 (2001).*
- [2] J. C. Venter, et al. *Science 291, 1304-1351 (2001).*
- [3] P. A. Sharp, *Cell 77, 805-815 (1994).*
- [4] B. R. Graveley, *Trends Genet. 17, 100-107 (2001).*
- [5] T. A. Cooper, W. Mattox, *Am. J. Hum. Genet. 61, 259-266 (1997).*
- [6] B. K. Dredge, A. D. Polydorides, R. B. Darnell, *Nat. Rev. Neurosci. 2, 43-50 (2001)*
- [7] R. Arch, et al., *Science 257, 682-685 (1992).*
- [8] D. L. Cooper, G. J. Dougherty, *Nat. Med. 1, 635-637 (1995).*
- [9] L. Sherman, D. Wainright, H. Ponta, P. Herrlich, *Genes Dev. 12, 1058-1071 (1998).*
- [10] S. Weg-Remers, H. Ponta, P. Herrlich, H. König, *EMBO J. 20, 4194-4203 (2001).*
- [11] D. Cantrell, *Ann. Rev. Immunol. 14, 259-274 (1996).*
- [12] L. Chang, M. Karin, *Nature 410, 37-40 (2001).*
- [13] J. S. Sebolt-Leopold, et al., *Nat. Med. 5, 810-816 (1999).*
- [14] H. König, H. Ponta, P. Herrlich, *EMBO J. 17, 2904-2913 (1998).*
- [15] N. Matter, et al., *J. Biol. Chem. 275, 35353-35360 (2000).*
- [16] N. Matter, P. Herrlich, H. König, *Manuscript submitted.*