

# Leben mit gestückelten Genen

H. König, ITG

## Einleitung

Aussehen, Entwicklung und Funktionen von Lebewesen werden im Wesentlichen durch Proteine (Eiweiße) bestimmt. Sie steuern die biochemischen Vorgänge in den Zellen. Die Information für Proteine ist in den Genen verschlüsselt, welche aus einem doppelsträngigen Nukleinsäuremolekül, der DNA be-

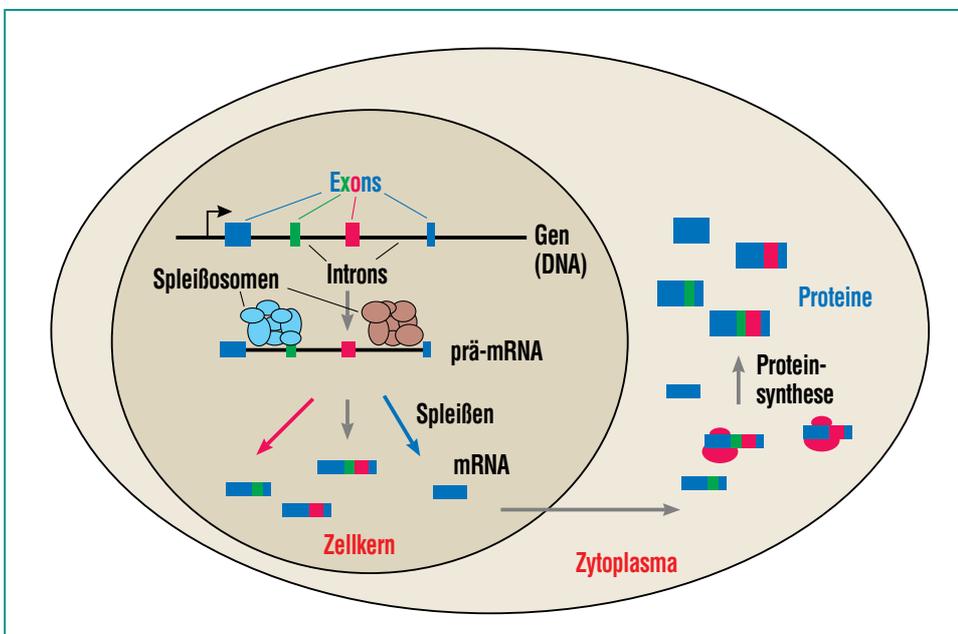
stehen. Diese Information wird zunächst in ein Botenmolekül aus RNA (einer anderen Nukleinsäureform) umgeschrieben, von dem dann die Information für die Proteinherstellung durch eine komplexe zelluläre Maschinerie ausgelesen werden kann. Allerdings ist die Information zur Herstellung eines Proteins nur in den Genen von Bakterien (und in vielen Genen mancher

einzelliger Organismen, wie z. B. der Hefe) als zusammenhängende Abfolge niedergelegt.

## Gestückelte Gene und Spleißen

In höheren Organismen (einschließlich des Menschen) wurde Ende der 1970er Jahre die erstaunliche Entdeckung gemacht, dass die allermeisten Gene gestückelt sind („Split Genes“) [1]. Das heißt, sehr kurze (für Teile eines Proteins) kodierende Blöcke, sogenannte Exons, sind von langen nicht kodierenden Bereichen (Introns) voneinander getrennt (siehe Abb. 1). Um die zusammenhängende Information zur Herstellung eines Proteins zu erhalten, müssen die kodierenden Stückchen zusammengebracht werden. Dies geschieht nach Umschreiben des gestückelten Gens in ein Vorläufer-RNA-Botenmolekül. Aus diesem werden dann die nicht-kodierenden Bereiche (Introns) herausgeschnitten und die kodierenden Stücke (Exons) zusammengefügt. Dieser Prozess heißt Spleißen und erfolgt in dem durch ein spezielles Membransystem abgegrenzten Bereich der Zellen, dem Zellkern, der auch die Gene enthält (Abb. 1). Danach wird das fertig gespleißte Boten-RNA-Molekül aus dem Zellkern ausgeschleust und steht zur Proteinherstellung bereit.

Spleißen erfordert hochkomplexe molekulare Maschinerien (die sogenannten Spleißosomen), bestehend aus mehr als 150 Proteinen und fünf kleinen RNA-Arten, den sogenannten „small nuclear (sn) RNAs“ (kleine Kern-RNAs) [2]. Die snRNAs spielen eine Schlüsselrol-



**Abb. 1: Gestückelte Gene und Spleißen.** Die Information für die Herstellung eines Proteins liegt in unseren Genen nicht als kontinuierliche Abfolge vor, sondern ist auf kurze Stückchen (sog. Exons) verteilt. Diese sind 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 eine protein-kodierendes, reifes Botenmolekül (mRNA) zu erhalten, müssen die Intron-Bereiche herausgeschnitten und die Exon-Sequenzen zusammengefügt werden. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und findet im Zellkern statt. Spleißen erfordert zwei parallele molekulare Systeme, ein sog. „Major“- und ein „Minor“-Spleißosom. Die fertig gespleißte mRNA verlässt dann den Zellkern und steht im Zytoplasma für die Proteinherstellung zur Verfügung. In mindestens 40–60 % aller menschlichen Gene können die protein-kodierenden RNA-Stücke (Exons) in unterschiedlicher Weise zusammengefügt werden. Hierdurch können aus einem Gen bzw. einem Vorläufer-Botenmolekül unterschiedliche mRNAs und damit Proteine hergestellt werden. Durch solches alternatives Spleißen kann die Kapazität des Erbguts zur Kodierung von Proteinen in höheren Organismen stark erhöht werden.

le bei der Erkennung der Introns und beim Spleißprozess.

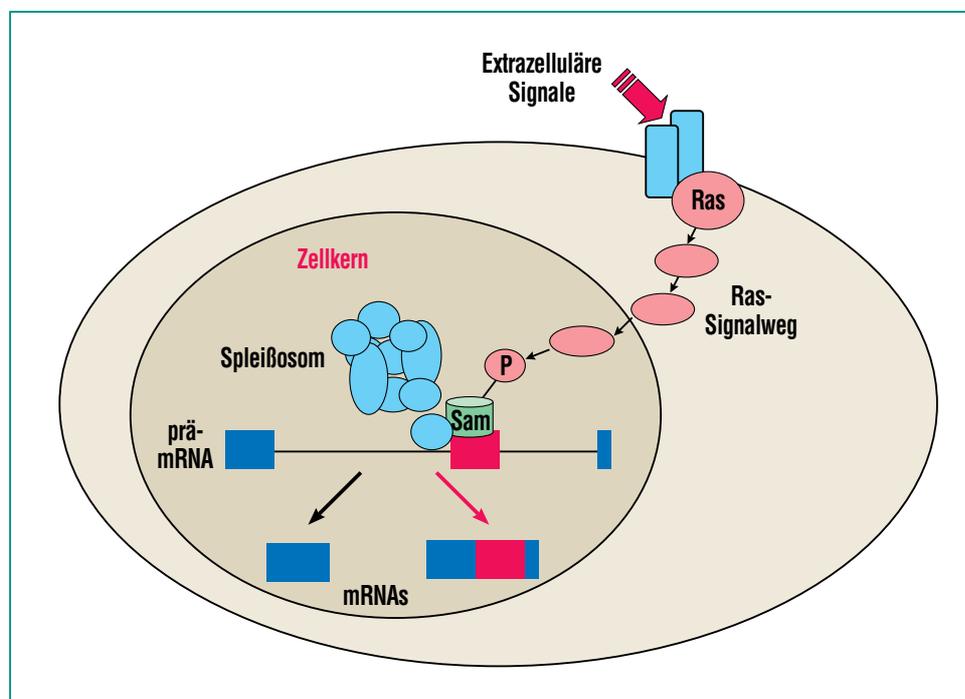
Beim Spleißen können manche kodierenden Stücke zusammen mit den Introns herausgeschnitten oder zusätzliche Stücke mit eingefügt werden. Durch solches alternatives Spleißen können aus einem Gen verschiedene RNA-Botenmoleküle und damit Proteine mit unterschiedlicher Funktion entstehen [3] (siehe Abb. 1). Tatsächlich werden die Botenmoleküle von mindestens 40–60 % aller menschlichen Gene alternativ gespleißt [4]. Die gestückelte Struktur von Genen und das exakte Spleißen von Botenmolekülen erforderten die Evolution sowie die Aufrechterhaltung komplexer und energieaufwändiger molekularer Systeme und Mechanismen. Im Gegenzug kann so die Kapazität des Erbguts zur Kodierung von Proteinen stark erweitert werden [5].

Diese Komplexität der Spleißmaschinerie und die Wichtigkeit von alternativem Spleißen spiegelt sich in immer mehr Krankheiten wieder, die durch Veränderungen im Spleißmuster von Botenmolekülen verursacht werden [6]. So betreffen mehr als 15 % der Veränderungen in Genen (Mutationen) bei Erbkrankheiten Gensequenzen, über die die Spleißmaschinerie (Spleißosom) Introns und Exons erkennt. Des Weiteren findet man Mutationen in Genen, die Komponenten der Spleißosomen oder assoziierte Proteine kodieren. Krankheiten, die auf verändertes Spleißen zurückzuführen sind, reichen von neurodegenerativen Erkrankungen, über Muskeldegeneration (Muskelatrophien, -dystrophien) bis zu Krebs [6].

## Krebs und die Regulation von Spleißen

Eines der besten Beispiele für die Verbindung von veränderten Spleißmustern und der Entwicklung von Tumoren ist das Zelloberflächenmolekül CD44. Spleißvarianten von CD44, die durch alternatives Spleißen entstehen und normalerweise auf aktivierten oder wandernden Immunzellen vorkommen, werden während der Entwicklung von vielen Tumoren hergestellt und sind an

deren Metastasierung beteiligt [7]. Wie diese Spleißformen während der Tumorentwicklung entstehen können, ist eine unserer Fragestellungen. Wir fanden, dass das alternative Spleißen, das zu ihrer Herstellung führt, an einen zentralen Signalweg der Zelle gekoppelt ist [8] (Abb. 2). Diese in der Evolution hochkonservierte Signalkaskade steuert wichtige physiologische Prozesse wie die Zellteilung und überträgt Signale (z. B. von Wachstumsfaktoren) von der Zell-



**Abb. 2: Spleißen ist an zelluläre Signale gekoppelt. Wir konnten einen in der Evolution hochkonservierten zellulären Signalübertragungsweg identifizieren über den äußere Signale, wie z. B. Wachstumsfaktoren aber auch bestimmte krebsauslösende Substanzen (Tumorpromotoren), alternatives Spleißen von mRNA-Molekülen des Zelloberflächenmoleküls CD44 regulieren können. Der gefundene Signalweg beinhaltet das Produkt des ras-Krebsgenes (Ras), ein zentrales Signalmolekül der Zelle, welches in vielen Tumoren unkontrolliert aktiv ist. Des Weiteren fanden wir ein RNA-bindendes Spleißregulator-Protein (Sam68), das durch diesen Signalweg chemisch verändert (phosphoryliert) wird und dadurch den Zusammenbau von Spleißosomen an entsprechenden Bereichen der prä-mRNA aktiviert. Es kommt so zum Verbleib bestimmter Exons (rot) in der reifen CD44-mRNA und zur Bildung varianter CD44-Spleißformen, die bei der Entwicklung vieler Tumoren eine Rolle spielen.**

oberfläche in den Zellkern [9]. Dort modifiziert sie Proteine durch Anhängen von Phosphat-Resten (Phosphorylierung) und verändert so deren Aktivität, z. B. beim Ablesen von Genen. Eine wichtige Komponente dieser Signalkette wird durch das Ras-Krebsgen ko-

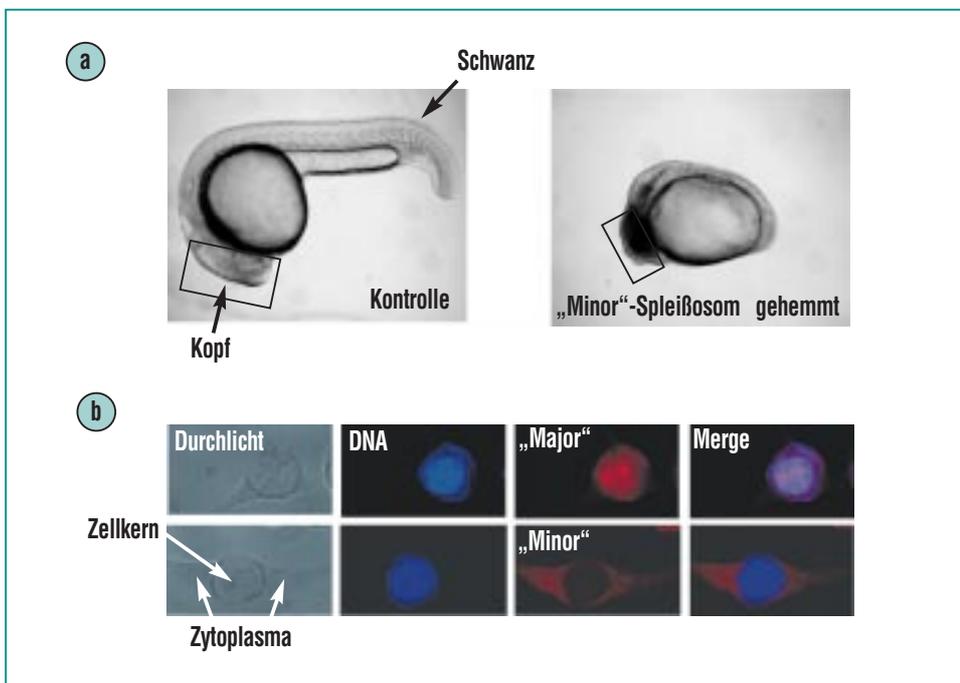
diert, ein Gen das in vielen Tumoren verändert ist und dessen verändertes Proteinprodukt diese Signalkette ständig aktiviert. Wir konnten ein erstes Spleißregulatorprotein (Sam68) identifizieren, das durch diesen Signalweg phosphoryliert wird und so zur Bildung

alternativ-gespleißter CD44-Formen führt [10]. Unsere derzeitigen Arbeiten legen es nahe, dass die ausgelöste chemische Veränderung des Proteins den Zusammenbau von Spleißosomen an entsprechenden Stellen von Boten-RNA-Molekülen aktiviert (Abb. 2).

### Parallele Spleißwelten

Vor ca. zehn Jahren wurde eine zweite parallele Spleißmaschinerie entdeckt, die eine seltene Klasse von Introns entfernt [11]. Dieses sogenannte „Minor“-Spleißosom teilt die meisten Proteinkomponenten mit dem klassischen (oder „Major“-) Spleißosom, besitzt aber andere snRNAs. Die Konzentration dieses zweiten Spleiß-Systems in Zellen ist zudem ca. 100-fach niedriger, und es spleißt RNA-Moleküle wesentlich langsamer. Die vom „Minor“-Spleißosom entfernten Introns scheinen in Wirbeltieren (Fische, Amphibien, Vögel, Säugetieren) am häufigsten vorzukommen. Beim Menschen repräsentieren sie ca. 0,3–0,4 % aller Introns, und viele solcher Introns scheinen während der Evolution in klassische Introns umgewandelt worden zu sein [12, 13].

Warum dennoch einige wenige dieser Introns und mit ihnen ein komplexes zweites Spleiß-System erhalten blieben und wie sich die beiden Systeme in einer Zelle entwickeln konnten und koexistieren, ist unklar. Um die Rolle des „Minor“-Spleiß-Systems im Organismus zu erforschen, haben wir eine Methode entwickelt um die beiden Spleißosomen in Zellen selektiv zu hemmen [14]. Dabei blockieren wir die unterschiedlichen snRNAs der beiden Systeme selektiv mit klei-



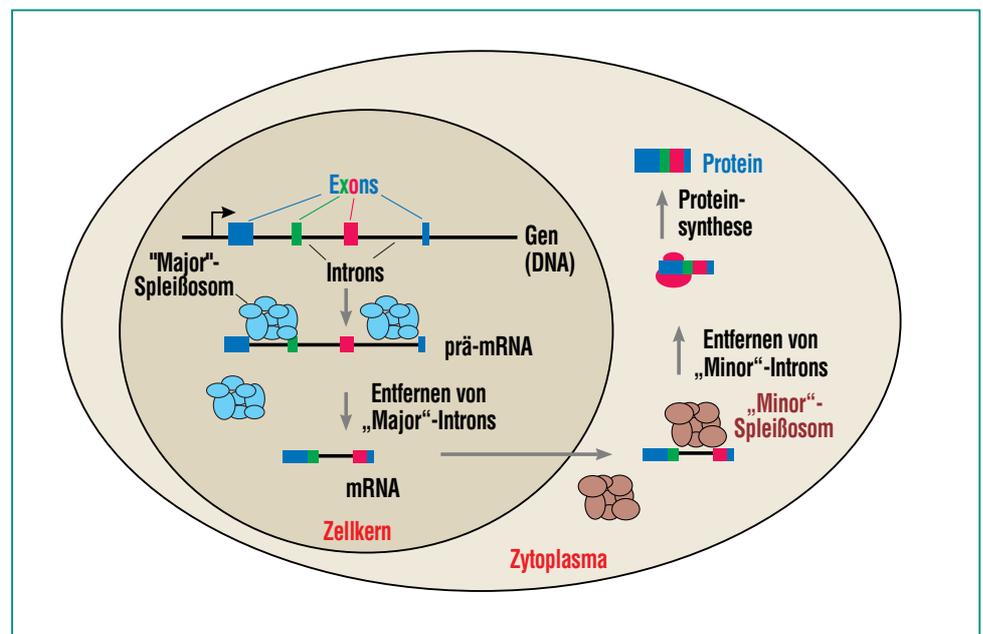
**Abb. 3:** Das parallele „Minor“-Spleiß-System reguliert die Zellteilung und befindet sich außerhalb des Zellkerns. Die Entdeckung einer zweiten Spleißmaschinerie („Minor“-Spleißosom) hat grundlegende Fragen bezüglich der Funktion und Evolution von zwei parallelen Spleiß-Systemen und bezüglich der Evolution von Zellen aufgeworfen. (a) Durch die Entwicklung einer Methode zur selektiven Hemmung der beiden Systeme konnten wir eine spezifische Rolle für das zweite Spleiß-System bei der Zellteilung zeigen. Die Blockierung der Zellteilung nach Hemmung des „Minor“-Spleißosoms führt zu massiven Veränderungen in Bereichen von Zebrafisch-Embryonen mit schneller Zellteilung (mit Rechtecken markierte Bereiche im Kopf) und hemmt das Wachstum von menschlichen Tumorzellen. (b) Bei unseren Untersuchungen machten wir eine weitere, sehr überraschende Entdeckung. Im Gegensatz zum klassischen „Major“-Spleiß-System (obere Reihe) fanden wir die snRNA-Komponenten (rote Fluoreszenzfärbung) des „Minor“-Spleißosoms (untere Reihe) und seine Aktivität nicht wie erwartet im Zellkern (blaue DNA-Fluoreszenzfärbung), sondern außerhalb im sog. Zytoplasma von Zellen (hier Mausfibroblasten); vgl. mit der Durchlichtaufnahme und der Überlagerung der blauen und roten Fluoreszenzfärbungen (Merge). Die beiden Spleiß-Systeme sind also räumlich voneinander getrennt.

nen synthetischen DNA-ähnlichen Molekülen. Zusammen mit Ferenc Müllers Gruppe am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) gelang es uns, diese Strategie in Zebrafisch-Embryonen anzuwenden und so die Rolle des „Minor“-Spleiß-Systems in der Wirbeltierentwicklung zu untersuchen [15]. Die Hemmung dieses Systems führte zu erstaunlich spezifischen Veränderungen in Bereichen der Embryonen mit schneller Zellteilung (Abb. 3a). Analysen des Zellteilungszyklus in Zebrafisch-Embryonen und in menschlichen Krebszellen deuten auf eine essenzielle und in der Evolution konservierte Rolle für dieses zweite Spleiß-System in der Zellteilung von Wirbeltieren hin.

Könnte diese wichtige Funktion der Grund für seine Konservierung in der Evolution sein? Und beruht diese wichtige Funktion auf spezifischen Eigenschaften dieses parallelen Spleiß-Systems? Bei unseren Untersuchungen machten wir eine weitere, sehr überraschende Entdeckung. Überraschend deshalb, weil sie mit Dogmen kollidiert, welche die Revolution von gestückelten Genen und Spleißen für unser Bild von der Genexpression mit sich brachte: Spleißen erfolgt allgemein im Zellkern, gekoppelt an das fortschreitende Ablesen (Transkription) von Genen; nur gespleißte reife Boten-RNA kann den Zellkern verlassen; Spleißen und Proteinsynthese sind räumlich getrennt. Im Gegensatz zum klassischen „Major“-Spleiß-System fanden wir die snRNA-Komponenten des „Minor“-Spleißosoms und seine Aktivität nicht wie erwartet im Zellkern, sondern außerhalb im sogenannten Zytoplasma der Zelle (Abb. 3b) [15].

Die räumliche Trennung der beiden Spleiß-Systeme (siehe Abb. 4) bietet eine attraktive Erklärung für ihre Evolution ausgehend von einem gemeinsamen „Ahnsystem“ (nahe gelegt durch die vielen gemeinsamen Komponenten) in einer ursprünglichen Zell-Linie. Sie könnte auch erklären wie die beiden Systeme parallel funktionieren können, trotz vieler gemeinsamer Komponenten aber stark unterschied-

lichen Konzentrationen. Die Regulation und Sicherstellung einer korrekten Proteinherstellung über das Entfernen entsprechender Introns durch ein Spleiß-System außerhalb des Zellkerns könnte notwendig sein, wenn der Zellkern reorganisiert wird und Kernprozesse (wie Transkription und das klassische „Major“-Spleißen) blockiert sind. Eine solche Blockade von Kernprozessen erfolgt inter-



**Abb. 4: Getrennte Spleißwelten.** Unsere Untersuchungen zeigten überraschenderweise, dass das „Minor“-Spleißosom außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist und somit räumlich getrennt vom nukleären „Major“-Spleiß-System. Dies fordert die Modifikation von Dogmen, welche die Revolution von gestückelten Genen und Spleißen für unser Bild von der Genexpression mit sich brachte. So galt bisher, dass Spleißen allgemein auf den Zellkern beschränkt und an die fortschreitende Transkription von Genen gekoppelt ist; dass nur gespleißte reife Boten-RNA den Zellkern verlassen kann; und dass Spleißen und Proteinsynthese räumlich getrennt sein müssen. Die von uns gefundene räumliche Trennung der beiden Spleißmaschinerien bietet eine attraktive Erklärung für die Evolution der beiden Systeme ausgehend von einem gemeinsamen „Ahnsystem“ in einer ursprünglichen Zell-Linie. Die Regulation und Sicherstellung einer korrekten Proteinherstellung über das Entfernen entsprechender Introns durch ein extra-nukleäres Spleiß-System könnte notwendig sein, wenn Kernprozesse (wie Transkription und das klassische „Major“-Spleißen) blockiert sind. Eine solche Blockade von Kernprozessen erfolgt interessanterweise während der Zellteilung.

essanterweise während der Zellteilung. Ob das „Minor“-Spleiß-System tatsächlich auf diese Weise dort eine Rolle spielt und ob es diese besondere Eigenschaft des Systems ist, die es für Zellen so unabdingbar macht, wollen wir in unserer zukünftigen Arbeit untersuchen.

### Zusammenfassung

Die gestückelte Struktur von Genen in höheren Organismen macht die Entfernung von nicht-kodierenden Sequenzen durch das Spleißen von Boten-RNA-Molekülen notwendig. Spleißen wird durch zwei komplexe molekulare Systeme bewerkstelligt, einem „Major“- und ei-

nem „Minor“-Spleißosom. Kommt es zur Fehlregulation von Spleißen entstehen verschiedene Krankheiten, einschließlich Krebs. Durch unsere Arbeiten versuchen wir zu verstehen, wie das Spleißen von Boten-RNAs durch zelluläre Signale in normalen und in Tumorzellen reguliert wird und warum höhere Organismen zwei parallele Spleiß-Systeme benötigen. Wir entdeckten die Verbindung eines wichtigen zellulären Signalwegs mit einem Regulatorprotein für ein Spleißereignis, das bei der Entwicklung bestimmter Tumoren eine Rolle spielt. Bei der Untersuchung der beiden Spleißosomen konnten wir eine essentielle Rolle des „Minor“-Spleißosoms bei der Kontrolle der

Zellteilung nachweisen. Überraschenderweise fanden wir dieses zweite Spleiß-System außerhalb des Zellkerns und somit räumlich getrennt von der nukleären „Major“-Spleißmaschinerie. Die Trennung der beiden Systeme bietet eine attraktive Erklärung dafür, wie sich zwei parallele Spleiß-Systeme in Zellen entwickeln konnten. Sie könnte es Zellen ermöglichen, die Herstellung von Proteinen auch dann zu regulieren und sicherzustellen, wenn Prozesse im Zellkern gehemmt sind, wie bei der Zellteilung.

### Literatur

- [1] P.A. Sharp, *Cell* 77, 805 (Jun 17, 1994)
- [2] M.S. Jurica, M.J. Moore, *Mol Cell* 12, 5 (Jul, 2003)
- [3] T. Maniatis, B. Tasic, *Nature* 418, 236 (Jul 11, 2002)
- [4] B. Modrek, C. Lee, *Nat Genet* 30, 13 (Jan, 2002)
- [5] H. Kim, R. Klein, J. Majewski, J. Ott, *Nat Genet* 36, 915 (Sep, 2004)
- [6] N.A. Faustino, T.A. Cooper, *Genes Dev* 17, 419 (Feb 15, 2003)
- [7] H. Ponta, L. Sherman, P.A. Herrlich, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33 (Jan, 2003)
- [8] S. Weg-Remers, H. Ponta, P. Herrlich, H. König, *Embo J* 20, 4194 (Aug 1, 2001)
- [9] L. Chang, M. Karin, *Nature* 410, 37 (Mar 1, 2001)
- [10] N. Matter, P. Herrlich, H. König, *Nature* 420, 691 (Dec 12, 2002)
- [11] A.A. Patel, J.A. Steitz, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 960 (Dec, 2003)
- [12] C.B. Burge, R.A. Padgett, P.A. Sharp, *Mol Cell* 2, 773 (Dec, 1998)
- [13] A. Levine, R. Durbin, *Nucleic Acids Res* 29, 4006 (Oct 1, 2001)
- [14] N. Matter, H. König, *Nucleic Acids Res* 33, e41 (2005)
- [15] H. König, N. Matter, R. Bader, F. Müller, *Manuscript submitted*