

Alternatives Spleißen: Wie der Mensch aus 35.000 Genen 250.000 Proteine macht

Zusammenfassung

Überraschender Weise besitzt der Mensch höchstens 40.000 Gene, nur etwa doppelt so viele wie die einfacheren Fadenwürmer und Fruchtfliegen. Um trotzdem eine höhere molekulare Komplexität zu erreichen, werden beim Menschen verstärkt posttranskriptionelle Mechanismen, wie das alternative Spleißen verwendet. Hierbei kann genetische Information zelltyp- oder entwicklungspezifisch umgesetzt werden. Um auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren, kann der Organismus alternative Spleißmuster regulieren. Fehlerhaftes alternatives Spleißen wird dabei in zunehmendem Maße als Ursache von Krankheiten erkannt. Die Aufklärung dieser molekularen Mechanismen erlaubt die Entwicklung von neuen Therapieansätzen.

keywords: alternatives Spleißen, Signaltransduktion, Therapie genetischer Defekte

Die Bedeutung von alternativen Spleißen beim Menschen

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat gezeigt, dass der Mensch mit 26.000-40.000 Genen sehr viel weniger Gene besitzt als zuvor angenommen. Menschen haben nur etwa doppelt so viele Gene wie die einfachen Organismen *C. elegans* (19.099, ein Fadenwurm), die Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* (13.601) oder die Pflanze *Arabidopsis Thaliana* (25.498). Um die höhere molekulare und die daraus resultierende physiologische Komplexität zu erreichen, bedient sich der Mensch in hohem Maße posttranskriptioneller Mechanismen. Diese Mechanismen verändern die zuerst hergestellte prä-mRNA (Primärtranskript) durch Anhängen einer cap-Struktur und einer poly-Adenylat Sequenz an den Enden der prä-mRNA, sowie durch Spleißen.

Das durchschnittliche menschliche Gen besteht aus ca. 27.000 Basen. Aus dem daraus hergestelltem Primärtranskript werden im Durchschnitt sieben als Introns bezeichnete Stücke herausgeschnitten und die acht verbleibenden Stücke (Exons) miteinander verknüpft. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet.

Die Introns machen mit 95% den größten Anteil der typischen menschlichen prä-mRNA aus [1]. Die Auswahl von Exons ist regulierbar, d.h. ein Stück der prä-mRNA kann entweder als Intron oder als Exon erkannt und entsprechend herausgeschnitten werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als alternatives Spleißen.

Untersuchungen an Chromosom 22 haben gezeigt, dass dort mindestens 59% aller Gene alternativ gespleißt werden, d.h. aus einem Gen entsteht i.d.R. mehr als ein Produkt. Durch alternatives Spleißen entstehen mRNAs, die für Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften kodieren: etwa ein Viertel aller alternativen Exons führt Stop Kodons ein oder führt zu Leserasterverschiebungen. So entstehen

verkürzte, inaktive Proteine, werden Bindungsdomänen entfernt oder verändern sich Liganden-Affinitäten, Hormonaktivitäten und Eigenschaften von Ionenkanälen [2].

Die Auswahl von Spleißstellen in einem makromolekularen Komplex

Zellbiologische Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Transkription und prä-mRNA Prozessierung gleichzeitig in einem makromolekularen Komplex ablaufen, der als 'RNA Fabrik' oder 'transkriptosomaler Komplex' bezeichnet wird [3, 4] (Abb. 1). Die Erkennung von Exons läuft in diesem Komplex einerseits mit großer Genauigkeit ab, kann aber andererseits vom Organismus verändert werden. Zur Identifikation von Exons sind Signale auf der prä-mRNA notwendig (cis-Elemente) und damit interagierende (ribonukleäre) Proteinfaktoren (trans-Faktoren) [5].

Cis-Elemente können unterteilt werden in die 5' und 3' Spleißstellen, die die Grenzen eines Exons markieren, den Verzweigungspunkt, sowie regulatorische Sequenzen, die den Gebrauch von Exons verstärken (*enhancer*) oder unterbinden (*silencer*). Alle cis-Elemente sind in ihrer Basenabfolge sehr flexibel und lassen sich nur mit einer schwachen Konsensussequenz beschreiben, von der sie an einzelnen Stellen stark abweichen können. Weil von den Exons der prä-mRNA meist Proteine kodiert werden, ermöglicht es diese Sequenzflexibilität, jede notwendige Proteinsequenz herzustellen.

An die cis-Elemente binden trans-Faktoren, die sich grob in snRNPs, SR-Proteine und hnRNPs einteilen lassen. snRNPs (small nuclear ribonuclear proteins) sind Komplexe aus einer snRNA und daran assoziierten Proteinen. Die RNA Komponenten dieser Komplexe binden an die 5' und 3' Spleißstelle, sowie an den Verzweigungspunkt und sind direkt an der Katalyse der Spleißreaktion beteiligt. Beispielsweise markiert die Bindung von U1 snRNA an die 5' Spleißstelle die Grenzen eines Exons.

SR-Proteine (Serin-Arginin reiche Proteine) können mit ihren RNA Bindungsdomänen an regulatorische Sequenzen (Exon *enhancer/silencer*) und mit ihren RS Domänen an Proteinkomponenten von snRNPs, wie z.B. U170K, binden. Durch Komplexbildung eines SR-Proteines mit einem Exon *enhancer* kann somit die Bindung von U1snRNP an die 5' Spleißstelle stabilisiert und damit die Erkennung eines Exon gefördert werden.

hnRNPs (heteronukleäre ribonukleäre Proteine) sind eine Proteinklasse, die eine RNA Bindungsdomäne, sowie unterschiedliche Protein-Protein Interaktionsdomänen besitzt. Da hnRNPs oftmals mit anderen Proteinen wechselwirken als dies SR-Proteine tun, wirken beide Proteinklassen oft antagonistisch, d.h. eine hohe SR-Protein Konzentration führt zu einem Einbau eines

alternativen Exons, während eine hohe hnRNP Konzentration zu dessen Ausschluß führt.

Somit kann durch das Zusammenspiel von Elementen auf der prä-mRNA, SR-Proteinen und hnRNPs der Gebrauch von alternativen Exons im Organismus geregelt werden.

Die Auswahl von Speistellen verändert sich im Organismus

Die Auswahl alternativer Exons ist vom Organismus veränderbar. Zwischen verschiedenen Geweben sind die Verhältnisse von SR-Proteinen zu hnRNPs unterschiedlich, sodass oftmals auch der Gebrauch alternativer Exons gewebsspezifisch ist. Außerdem werden hnRNPs und SR-Proteine in besonderen Kernkompartimenten, den *speckles*, gelagert, aus denen sie je nach Bedarf von der Zelle durch Phosphorylierung freigesetzt werden können. Die Regulation dieser Freisetzung stellt einen weiteren Mechanismus dar, mit dem die Zelle den Gebrauch alternativer Exons kontrollieren kann. Während die meisten SR-Proteine und hnRNPs ubiquitär exprimiert werden, werden einige regulatorische Proteine nur in bestimmten Geweben gebildet und regulieren dort spezifische alternative Exons.

Im erwachsenen Organismus verändert sich der Gebrauch alternativer Exons, z.B. nach neuronaler Aktivität, zellulärem Stress oder bei maligner Transformation. Zumindest in Zellkultur sind einige dieser Veränderungen des alternativen Spleißens unabhängig von der Proteinbiosynthese und werden wahrscheinlich durch reversible Phosphorylierungen regulatorischer Proteine verursacht. Durch Phosphorylierungen ändert sich sowohl die intranukleäre Konzentration regulatorischer Proteine, als auch die Wechselwirkung mit prä-mRNA und anderen interagierenden Proteinen in der 'RNA Fabrik', was schließlich zu einem veränderten Gebrauch alternativer Exons führt. Die genauen molekularen Mechanismen und Signaltransduktionsketten müssen jedoch noch ermittelt werden.

Eine fehlerhafte Auswahl von Spleißstellen führt zu Krankheiten

Wie wichtig die richtige Auswahl von Spleißstellen für den Organismus ist, belegen Krankheiten, bei denen hier Störungen vorliegen [6]. Etwa 15% aller menschlichen Krankheiten, die durch Mutationen verursacht werden, sind auf Fehlspleißen zurückzuführen. Bisher wurden hauptsächlich Mutationen an den 5', 3' Spleißstellen und dem Verzweigungspunkt untersucht. Bekannte Beispiele hierfür sind die beta-Thalassämien, bei denen durch Mutationen fehlerhafte Spleißstellen im beta-Globin Gen hervorgerufen werden. In zunehmendem Maße werden auch Mutationen in Exon-*enhancern* als Krankheitsursachen erkannt (Tabelle 1). Diese Mutationen ändern oftmals nicht die vorhergesagte Aminosäuresequenz eines Proteins, sondern führen zu einem fehlerhaften alternativen Spleißen. Ein wichtiges Beispiel dieser Gruppe ist die frontotemporale Demenz und Parkinsonismus, mit Kopplung zu Chromosom 17

(FTDP-17) [7]. Hier liegen Mutationen im alternativen Exon 10 von Neurofilament Tau vor. Exon 10 codiert für eine von vier Mikrotubuli Bindungsstellen von Tau. Mutationen im Exon-*enhancer* von tau, die das normale Gleichgewicht verändern, führen zu neuropathologischen Veränderungen.

Die fehlerhafte Auswahl von Spleißstellen kann in Zellkultur korrigiert werden

Durch die genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen, die die Auswahl von Spleißstellen regulieren, sind Therapieansätze möglich. Beispielsweise können Mutationen, die FTDP-17 hervorrufen, in Zellkultur durch Expression von SR Protein-Kinasen, kompensiert werden [8]. Im Falle der spinalen muskulären Atrophie (Tabelle 1) kann ein fehlendes Genprodukt durch die Veränderung des Spleißmusters eines verwandten Genes ersetzt werden [9]. Diese Beispiele belegen eindrucksvoll, dass fehlerhafte prä-mRNA Prozessierung korrigiert werden kann. Eine genaue Analyse der Spleißstellenauswahl in Abhängigkeit von Phosphorylierung, sowie der regulierenden Signaltransduktionswege kann zur Identifizierung niedermolekularer Verbindungen führen, mit denen diese Krankheiten in Zukunft behandelt werden können [10].

Literatur

1. The Genome International Sequencing Consortium, Nature 409: 860-921 (2001)
2. Graveley, B.R., Trends Genet. 17: 100-107 (2001)
3. McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., et al., Nature, 385: 357-361 (1997)
4. Misteli, T., J., Cell Sci. 113: 1841-1849 (2000)
5. Smith, C.W. and Valcarcel, J., Trends Biochem. Sci. 25: 381-388 (2000)
6. Stoss, O., Stoilov, P., Daoud, R., et al., Gene Ther. Mol. Biol. 5: 9-28 (2000)
7. Spillantini, M.G. and Goedert, M., Trends Neurosci. 21: 428-433 (1998)
8. Hartmann, A., Rujescu, D., Giannakouros, et al., Mol. Cell. Neurosci., in press (2001)
9. Hofmann, Y., Lorson, C.L., Stamm, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 9618-9623 (2000)
10. "Reversal of tau missplicing which leads to dementia", European patent; 99122141.7-2107

Dr. med. Dan Rujescu

Studium der Medizin in Essen, Brisbane und Cape Town, 1993 Promotion in Heidelberg, 1993 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Psychiatrischen Universitätsklinik Mainz, seit 1995 an der Psychiatrischen Universitätsklinik München. 1997-1998 Post Doc in der Neurobiochemie am Max-Planck-Institut für

Neurobiologie, Martinsried, seit 1998 Leiter der Arbeitsgruppe und des Labors für Molekulare Neurobiologie an der Psychiatrischen Uniklinik München.

Psychiatrische Uniklinik München

Molekulare Neurobiologie

Nussbaumstr. 7

80336 München

Tel. 089 / 5160-5756

Fax. 089 / 5160-5779

Email: Dan.Rujescu@psy.med.uni-muenchen.de

Dipl. Biol. Annette M. Hartmann

Dipl. Biologin, Studium der Biologie in München, 1996 Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von S. Stamm, seit 2001 an der Psychiatrischen Universitätsklinik München, Molekulare Neurobiologie.

Psychiatrische Uniklinik München

Molekulare Neurobiologie

Nußbaumstr. 7

80336 München

Email: Annette.Hartmann@psy.med.uni-muenchen.de

Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stamm

Dipl. Biochemiker, Studium der Biochemie in Hannover, Promotionsarbeit am Mount Sinai Hospital New York und Cold Spring Harbor Laboratory, 1992 Promotion, 1995 Leiter einer selbständigen Nachwuchsgruppe am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried, seit 2001 Professor (C3) für Biochemie und medizinische Molekularbiologie am Institut für Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Universität Erlangen

Institut für Biochemie

Fahrstrasse 17

91054 Erlangen

e-mail: stefan@stamms-lab.net

<http://www.stamms-lab.net>

Abbildung 1: Regulation der Auswahl von Exons der prä-mRNA

A) Faktoren, die (alternatives) Spleißen der prä-mRNA regulieren. Exons sind als hellgraue Rechtecke dargestellt, Introns als Linien. Regulatorische Elemente (*silencer* oder *enhancer*) auf der prä-mRNA sind als dunkelgraue Banden in den Exons oder Introns dargestellt. Die 5' Spleißstelle (CAGGuaagu), die 3' Spleißstelle (y)10ncagG

und der Verzweigungspunkt (bp) (ynyyray) sind schematisch eingezeichnet (y = c oder u; n = a, c, g oder u). Nukleotide, die mit Großbuchstaben gekennzeichnet sind, verbleiben in der fertigen mRNA. Zwei Hauptklassen von Proteinen, hnRNPs (gelb) und SR-Proteine (orange) binden an die regulatorischen Elemente (*silencer* oder *enhancer*) der prä-mRNA. Zusätzlich binden diese Proteine aneinander. Die Bindungen von Protein an RNA ist mit grün, Protein:Protein Bindungen sind rot markiert. Der Proteinkomplex, der sich um einen exonischen *enhancer* bildet, stabilisiert die Bindung des U1 snRNPs an die 5' Spleißstelle, weil SR-Proteine mit der RS Domäne von U1-70K wechselwirken (rot) können. Hierdurch wird die Bindung der U1 snRNA (rote Linie) an die 5' Spleißstelle stabilisiert. Die Bildung eines Multi-Protein-RNA Komplexes erlaubt die Unterscheidung zwischen tatsächlichen Spleißstellen (fett) und fehlerhaften Spleißstellen (gu/ag) die häufig in der prä-mRNA vorkommen.

B) Die RNA Fabrik. prä-mRNA wird von RNA Polymerase II (polII) synthetisiert, nachdem Transkriptionsfaktoren (TF) den Anfang eines Genes erkannt haben. Die DNA ist als Doppelstrang dargestellt, Rechtecke stellen schematisch spätere exonische Sequenzen dar. Ein durchschnittliches menschliches Gen besitzt acht Exons, die nur etwa 5% des Primärtranskriptes ausmachen. SR-Proteine können mit Transkriptionsfaktoren und der Carboxy-terminalen Domäne der RNA Polymerase II (polII-CTD) wechselwirken. Transkription und prä-mRNA Prozessierung laufen gleichzeitig ab. Die fertige mRNA wird als Protein-RNA Komplex in das Zytoplasma transportiert, wo die RNA normalerweise in Protein übersetzt wird. SR Proteine und hnRNPs werden in speziellen Kernsubstrukturen, den *speckles*, gespeichert. Aus den *speckles* können sie durch Phosphorylierung freigesetzt werden.

Tabelle 1. Beispiele für Mutationen in regulatorischen Sequenzelementen, die Krankheiten hervorrufen

Der Name des betroffenen Genes befindet sich unter dem Krankheitsnamen und ist unterstrichen. Punktmutationen, die Spleißstellen verändern sind nicht aufgeführt, können aber im Internet (www.cookie.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/asdb.html) gefunden werden. ESE: exonisches Sequenzelement, ESI: exonischer Sequenz Inhibitor, ISI: intronischer Sequenz Inhibitor, stille Mutationen: Mutationen, die die vorhergesagte Proteinsequenz nicht verändern. Literatur zu den Krankheiten findet sich in [6].