

Saccharomyces cerevisiae ein molekularbiologisches Universalgenie?

Transkription und Spleißen von Säugergenen in der Hefe

Durch die komplexe Genstruktur höherer Eukaryonten wird die Identifizierung kodierender Bereiche (Exons) z. T. sehr erschwert. Auch wenn größere DNA-Strecken in künstlichen Hefechromosomen (YACs, yeast artificial chromosomes) kloniert vorliegen, war es bisher nur durch aufwendige Techniken möglich, Exons sicher zu erkennen. Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass *Saccharomyces cerevisiae* selbst in der Lage ist, Säugergene korrekt zu spleißen.

Genorganisation bei Eukaryonten

Viele grundlegende Prozesse des RNA-Stoffwechsels sind innerhalb der Eukaryonten gut konserviert. Dies betrifft sowohl die Synthese der RNA (Transkription) als auch die Reifung (Prozessierung) der primären Transkripte. Die Ähnlichkeiten gehen so weit, dass einige Transkriptionsfaktoren im Experiment zwischen Hefe- und Säugerextrakten austauschbar sind [1].

Die meisten Gene von Eukaryonten haben eine Mosaikstruktur; sie bestehen aus kodierenden Abschnitten (Exons) und aus nicht-kodierenden Abschnitten (Introns). Um funktionsfähige Transkripte zu erhalten, müssen die Introns punktgenau ausgeschnitten und die flankierenden Exons wieder zusammengefügt werden (Spleißen).

Beim Vergleich der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Säugierzellen fallen wesentliche Unterschiede bezüglich der Häufigkeit und Verteilung von Introns auf. Während fast alle Säugergene mehrere Introns von z. T. erheblicher Länge (bis 100 kb) enthalten, besitzen lediglich etwa 4% aller Hefegene Introns. Die 253 bekannten Hefe-Introns verteilen sich auf 248 Gene und liegen überwiegend im 5'-Bereich dieser Gene [2]. Die Introns der Hefe sind mit 50-1000 Nukleotiden Länge deutlich kürzer als Introns im Genom der Säuger [3]. Damit ein Intron als solches erkannt und präzise heraus geschnitten werden kann, verfügt es über bestimmte Erkennungssequenzen: die 5'-Spleißstelle, den Verzweigungspunkt mit entsprechender Sequenzumgebung und die 3'-Spleißstelle. Für die beiden zuerst genannten Sequenzmotive gilt, dass die Sä-



Bärbel Kunze



Thomas Hellwig-Bürgel

Keywords

YAC, Primärtranskript, Spleißen, Exon-trapping

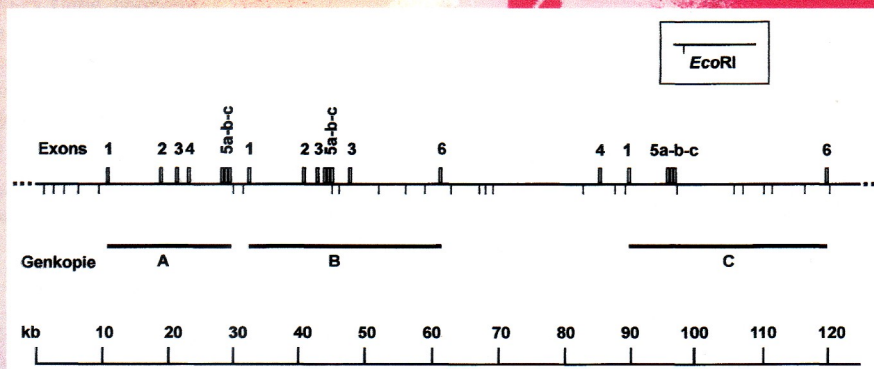


Abb. 1: Struktur der *Sp100-rs* Gene im YAC Insert. Rechtecke markieren Exons; *Sp100-rs* Genkopie A, B und C sind unterstrichen; die Organisation des YAC-Inserts wurde durch überlappende Cosmide und PCR-Produkte aufgeklärt; verändert nach [4]

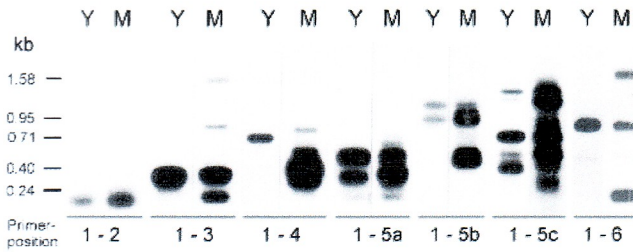


Abb. 2: Hybridisierung und Vergleich von RT-PCR Produkten verschiedener Herkunft. Als Ausgangsmaterial wurde RNA aus YAC-transformierter Hefe (Y) oder RNA aus Mausleber (M) verwendet. Unter den paarweise angeordneten Reaktionsprodukten sind jeweils die Exonnummern angegeben, aus denen die Primer zur Amplifikation generiert wurden; verändert nach [4]

gersequenzen eine größere Variabilität zeigen, als die entsprechenden Hefesequenzen; in der Hefe sind diese Erkennungssequenzen stärker konserviert [1]. Vor diesem Hintergrund ist zu erwarten, dass ein primäres Hefetranskript in einer Säugerzelle korrekt gespleißt werden kann; im umgekehrten Fall ist der Ausgang weniger klar. Es ist nicht sicher, ob die Hefe abweichende Sequenzmotive erkennen und die entsprechenden Primärtranskripte korrekt prozessieren kann.

Spleißen des YAC-kodierten Primärtranskripts

Wir erhielten Hinweise auf die Toleranz der Hefe-Spleißmaschinerie bei der Analyse eines Hefeklons, der mit einem künstlichen Hefechromosom (YAC) transformiert war. Das Insert dieses YACs besteht aus etwa 150 kb (Kilobasen) Maus-DNA und enthält drei Gene der murinen *Sp100-rs* Genfamilie (Abb. 1), [4,5]. Die Hausmaus besitzt etwa 60, z. T. unterschiedliche *Sp100-rs* Gene [6]. Die *Sp100-rs* Gene des YACs bestehen aus maximal 6 Exons, die Länge der Introns liegt zwischen 0,8 und 23 kb (Abb. 1), eine für Säugergene typische Organisation.

Erstaunlicherweise ist der Hefeklon in der Lage, die im YAC vorhandenen Mausgene zu transkribieren. Dabei entstehen Transkripte mit einer Länge von bis zu drei kb, die mit Northern-Hybridisierungen nachgewiesen werden können [4]. Ausgehend von diesem Befund haben wir *Sp100-rs* Transkripte verschiedener Herkunft miteinander verglichen; solche die in der Maus synthetisiert wurden und solche, die im heterologen Hefesystem entstanden sind. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig, dass die Hefe kein endogenes *Sp100-rs* Gen enthält. Wir konnten zeigen, dass die im YAC-klonierten Mausgene von der Wirtshefe in der Maus-typischen Weise transkribiert und gespleißt werden [4]. Die von der Hefe synthetisierten *Sp100-rs* Transkripte sind fast ausnahmslos auch im natürlichen Maussystem zu finden (Abb. 2). Das Produktspektrum nach reverser Transkription und anschließender PCR (RT-PCR) war in der Maus jedoch größer, da sich im Genom der Maus weit mehr verschiedene *Sp100-rs* Gene befinden als in dem YAC (siehe oben). Die Sequenzierung zahlreicher RT-PCR-Produkte zeigte, dass die Hefe-generierten Primärtranskripte in exakt der glei-

chen Weise gespleißt wurden, wie es für die Maus typisch ist. Dabei wurden bis zu fünf aufeinanderfolgende Introns mit einer Länge von maximal 10 kb aus dem Primärtranskript entfernt. Ein solch komplexer Spleißvorgang ist für keines der endogenen Hefegene erforderlich (siehe oben).

Die Spleißmaschinerie der Hefe verfügt offensichtlich über eine größere Kapazität, als sie für Hefegene nötig ist [4, 7, 8]. Dieser Eindruck wird noch verstärkt, wenn man die *Sp100-rs* Spleißstellen mit den Konsensus-Spleißstellen der Hefe vergleicht (Abb. 3). Obwohl die Maus-Sequenzen z. T. erheblich von den Hefe-Konsensus-Sequenzen abweichen, wurden die Signale von der Hefe exakt erkannt und umgesetzt. Diese hohe Kapazität und Toleranz der Hefe-Spleißmaschinerie könnte ein evolutionäres Relikt sein, zurückgeblieben aus einer Zeit, in der es noch mehr und komplexere Intronstrukturen im Genom von *S. cerevisiae* gab [1]. Ein weiterer Beleg für die besondere Fähigkeit der Hefe ist der Befund, dass einzelne Primärtranskripte in alternativer Weise gespleißt werden können [4]. Ein solcher Vorgang wurde kürzlich erstmals für ein endogenes Hefegen gezeigt [9]

Alternatives „Exon-trapping“?

Bisher wurden kodierende Bereiche in YAC-Inserts mit aufwendigen Techniken, wie z. B. ‚Exon-trapping‘, identifiziert. Diese aufwendige Methode könnte durch eine einfache RNA-Analyse von YAC-transformierten Hefezellen ersetzt werden. Nach der Isolation von Gesamt-RNA könnte eine RT-PCR entweder mit Genspezifischen oder zufälligen Primern [8] durchgeführt werden. Sollte sich herausstellen, dass die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage ist, auch andere Säugergene zu transkribieren und exakt zu spleißen, wäre dies von generellem Interesse für die Analyse von YAC-Inserts – und die Hefe selbst ein molekularbiologisches Universalgenie.

Danksagung

Die Autoren danken den technischen Assistentinnen Petra Nielsen und Heide Riechers für die engagierte Mitarbeit.

Literatur

[1] Rymond, B.C.; Rosbash, M.: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 143 ff., 1992
 [2] Lopez, P.J.; Séraphin B.: RNA 5, 1135-1137 (1999)
 [3] Spingola, M.; Grate, L.; Hausler, D.; Ares Jr., M.: RNA 5, 221-234 (1999)
 [4] Kunze, B.; Hellwig-Bürgel, T.; Weichenhan, D.; Traut, W.: Gene 246, 93-102 (2000)
 [5] Weichenhan, D.; Kunze, B.; Traut, W.; Winking H.: Cytogenetic and Cell Genetic 80, 226-231 (1998)
 [6] Kunze, B.; Weichenhan, D.; Virks, P.; Traut, W.; Winking, H.: Cytogenetic and Cell Genetic 73, 86-91 (1996)
 [7] Trachtulec, Z.; Forejt, J.: Nucleic Acids Research 27, 526-531 (1999)
 [8] Still, I.H.; Vince, P.; Cowell, J.K.: PNAS USA 94, 10373-10378 (1997)
 [9] Davis, C.A.; Grate, L.; Spingola, M.; Ares Jr., M.: Nucleic Acids Research 28, 1700-1706 (2000)

Dr. Bärbel Kunze

Studium der Biologie an der JLU Gießen; 1989 Promotion am dortigen Institut für Tierphysiologie über Genregulation bei Ciliaten; seit 1990 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biologie der Medizinischen Universität zu Lübeck; Forschungsschwerpunkte im Bereich Chromatinorganisation und Spleißprozesse; 2001 Habilitation im Fach Biologie Institut für Biologie Kunze@molbio.mu-luebeck.de

Dr. Thomas Hellwig-Bürgel

Studium der Biologie an der Universität Hamburg; Promotion am Institut für Biologie der Medizinischen Universität zu Lübeck; seit 1994 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck mit dem Forschungsschwerpunkt sauerstoffabhängige Genexpression Institut für Physiologie Hellwig@physio.mu-luebeck.de

Medizinische Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck

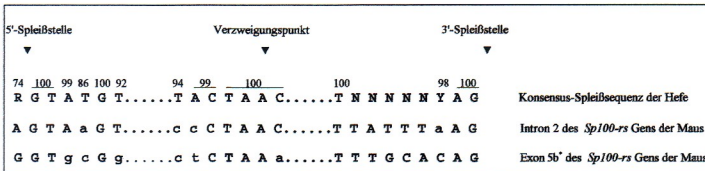


Abb. 3: Vergleich der Konsensus-Spleißstellen von *S. cerevisiae* mit zwei Sequenzen der Maus, die in der Hefe erfolgreich gespleißt werden. Zahlenwerte geben den Konservierungsgrad in Prozent an [1]; kleine Buchstaben – von der Konsensussequenz abweichende Nukleotide; R - Purin; Y - Pyrimidin; * – der mittlere Bereich von Exon 5 (Exon 5b) wird alternativ gespleißt