

Jena – Alternatives Spleißen

Drei Nukleotide mehr oder weniger...

■ In der AG Genomanalyse des Leibniz-Instituts für Altersforschung (FLI) gehört die Sequenzierung von Genomen und Transkriptomen zum Alltag. Quasi nebenbei stießen die Forscher um Matthias Platzer dabei auf alternatives Spleißen an NAGNAG-Motiven – und machten einige erstaunliche Entdeckungen.

ter, der Nacktmull (*Heterocephalus glaber*), hat wie der Mensch eine im Verhältnis zur Körpergröße sehr lange Lebensspanne und, im Gegensatz zum Menschen, eine bemerkenswert hohe Resistenz gegenüber Krankheiten, besonders gegen Krebs. Klar, dass der Nager damit ebenfalls zu einem interessanten Modell der Altersforschung avanciert ist. Zumal eine Mull-Königin in der Regel älter wird als ihre Untertanen, obwohl sie die einzige ist, die in der Kolonie Nachkommen gebärt (*Curr. Biol.* 16(4): R117-8). Wie ihre gesunde Langlebigkeit mit der körperlichen Belastung der vielen Schwangerschaften vereinbar ist – auch daran sind die Jenaer interessiert.

zunächst kommissarisch, die Leitung der Arbeitsgruppe.

Bis 2004 war das Humangenomprojekt die Hauptaufgabe der Jenaer Genomsequenzierer. „Danach mussten wir uns neu orientieren, da kam uns auch die Umstrukturierung des Instituts ganz recht“, erinnert sich Platzer. Bereits 1999 wurde dem IMB vom Wissenschaftsrat und einer Kommission des Jenaer Beutenberg-Campus nahe gelegt, sich ein neues Forschungskonzept zu suchen. 2003 entschied man sich am IMB schließlich für die Forschung an „Mechanismen der Alterung und altersbedingter Krankheiten“, zwei Jahre später erfolgte die Umbenennung in „Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI)“. Und so schwenkte auch die AG Genomanalyse von Matthias Platzer auf das neue Forschungsziel um.

Über Genome zum Spleißen

Bei der Analyse von Genomen und Transkriptomen stießen sie jedoch weiterhin immer wieder auf alternatives Spleißen. Und irgendwann konnten die Jenaer einfach nicht mehr wegschauen.

Kurz zur Auffrischung: Wird die DNA abgelesen, entsteht eine prä-mRNA, die noch alle Introns enthält. Erst bei der Reifung zur mRNA müssen diese durch Spleißen, also dem entsprechenden Herausschneiden der Introns und Verknüpfen der Exons, entfernt werden. Dies bewerkstelligt ein RNA-Protein-Komplex namens Spleißosom, welcher Spleißstellen (Exon-Intron-Übergänge) spezifisch an ihrer Sequenz erkennt. Introns beginnen meist mit den Nukleinbasen Guanin und Thymin (GT) und enden mit Adenin und Guanin (AG). Wenn jedoch verschiedene Möglichkeiten der Verknüpfung von Spleißstellen bestehen und die Entscheidung, wie die endgültige mRNA aussehen soll, erst während des Spleißvorgangs fällt, spricht man vom alternativen Spleißen. Dabei können beispielsweise Exons übersprungen und gemeinsam mit den benachbarten Introns aus der prä-mRNA geschnitten werden (*Exon Skipping*), oder Introns werden



Fürs Foto „zusammengespleißt“: Klaus Huse, Entdecker des NAGNAG-Motivs, sowie Karol Szafranski und Matthias Platzer (v.l.n.r.)

„Eigentlich“, so klärt Matthias Platzer gleich zu Beginn auf, „ist die Forschung an den Tandem-Spleißstellen nur ein Nebenprojekt meiner Arbeitsgruppe.“ Und tatsächlich – schaut man sich die Homepage der AG Genomanalyse am Fritz-Lipmann-Institut (FLI) in Jena an, so findet man vielmehr ein Genomprojekt zum türkisen Prachtgrundkärpfling (*Nothobranchius furzeri*), ein neuer Modellorganismus für die Altersforschung. Oder die vergleichende Analyse der Transkriptome verschiedener Mulspezies. Deren prominentester Vertre-

Überhaupt hat die Arbeitsgruppe Genomanalyse in ihrer langen Geschichte schon viel erlebt. Damals, als das FLI noch Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) hieß, die Genomsequenzierung unter der Leitung von André Rosenthal stand und Matthias Platzer als Postdoc in dessen Gruppe forschte, lieferten die Jenaer den umfangreichsten deutschen Beitrag zum Humangenomprojekt – etwa die Entzifferung des Chromosoms 21. Noch bevor dieses abgeschlossen war, verließ jedoch Rosenthal das Institut und Platzer übernahm,

Sicher, mit RNA geht Spleißen etwas anders...

Foto: sailmagazine.com

in der endgültigen mRNA beibehalten (*Intron Retention*). Durch solches alternatives Spleißen ist es dem Organismus möglich, in einer Gensequenz Informationen für mehrere Proteinvarianten zu speichern. In der Evolution können auf diese Weise neue Varianten in niedriger Expressionsstärke ausprobiert und, bei Bedarf, in ihrer Expression verstärkt werden. Dieser Mechanismus ist derart effektiv und nützlich – weswegen man heute allgemein davon ausgeht, dass 95 % aller menschlichen Gene alternativ gespleißt werden.

Dass alternatives Spleißen nicht nur „im großen Rahmen“, also im Herausschneiden oder Verbleiben ganzer Exons und Introns funktioniert, zeigten Matthias Platzter und Co. bereits 2004. Damals tauchten auf der Suche nach Gendefekten, die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen, in den analysierten Transkript-Sequenzen immer wieder kurze Abschnitte mit Überlagerungen zweier Sequenzen auf. Was sie anfangs für unsaubere Sequenzierungsergebnisse aufgrund von Labor- oder Gerätefehlern hielten, stellte sich jeweils als zwei mRNAs heraus, die sich nur durch drei Nukleotide unterschieden. Als Ursache dafür machte Platzters Team ein Sequenzmotiv mit der Folge NAGNAG (N = A, C, G, T) aus, das eine Tandem-Spleißstelle (TASS) bildete (*Nature Genetics* 36: 1255-7). Das Spleißosom definierte hier das Ende des Introns mal nach dem ersten, mal nach dem zweiten NAG. Ersteres hatte zur Folge, dass die fertige mRNA drei Nukleotide mehr besaß, nämlich das zweite NAG.

Spleißosom entscheidet nicht zufällig

Durch weitere Untersuchungen der NAGNAG-Motive zeigten die Jenaer, dass sie phylogenetisch weit verbreitet sind. „Die TASS sind selbst in Organismen wie Hefe mit wenigen Introns und Spleißaktivität zu finden. Sie repräsentieren wohl eine der ältesten Formen des alternativen Spleißens“, erklärt Karol Szafranski dazu. Er ist Postdoc in Platzers Arbeitsgruppe und publizierte vor kurzem eine weitere interessante Entdeckung. Auch wenn das Spleißosom die Wahl zwischen mehreren

Spleißstellen hat, entscheidet es sich nicht zufällig für eine Spleißvariante. Der Vorgang des alternativen Spleißens ist häufig reguliert, aber für NAGNAG-Motive selten gewebsspezifisch. Wie die Regulation tatsächlich erfolgt, da tappten die Forscher jedoch noch im Dunkeln.

„Spleißfänger“ verlangen Gehorsam

Szafranski konnte nun beobachten, dass sich in Kultur mit zunehmender Zelldichte das Gleichgewicht zwischen der langen und der kurzen Isoform des entsprechenden Proteins verschiebt (*Nucleic Acids Res.* 42(14): 8895-904). Bei den meisten untersuchten Genen wurde mit steigender Dichte zunehmend die kürzere Isoform gebildet, also das zweite NAG der Tandem-Spleißstelle vom Spleißosom benutzt. Nach Verdünnung der Zellkultur stellte sich das ursprüngliche Gleichgewicht wieder ein – der Effekt ist folglich reversibel. Damit konnte Szafranski erstmals zeigen, dass das Spleißosom beim Spleißen der TASS auf Einflüsse von außen reagiert.

Am bemerkenswertesten war, dass eine Änderung der Spleiß-Isoformen gleichförmig in allen untersuchten Genen erfolgte, obwohl sie ganz unterschiedliche Sequenzeigenschaften hatten. Das Regulationsverhalten war somit ganz anders als beim gut untersuchten *Exon Skipping*. Dabei rufen gewebeabhängig exprimierte und sequenzspezifisch bindende Spleißfaktoren bestimmte Muster von langer (Exon-Einschluss) und kurzer Isoform (Exon-Ausschluss) hervor. „Wir dachten, wir hätten in dem neuen Regulationsmechanismus eine besondere Eigenart von Tandem-Spleißstellen erkannt“, fährt Szafranski fort, „und wurden noch ein zweites Mal überrascht: Als wir im gleichen Zellkultursystem zusätzlich *Exon-Skipping*-Fälle untersuchten, da zeigten auch diese Fälle eine gleichförmige Veränderung der Isoformverhältnisse!“ Der neuartige Mechanismus arbeitet also quasi wie der „Spleißfänger aus Hameln“, der tausende Spleißereignisse einer Zelle nach seiner Pfeife tanzen lässt. Eine mögliche Erklärung für diesen universellen „Gehorsam“ ist, dass der Regulationsweg direkt auf das Spleißosom wirkt.

Auch über die Art, wie das Spleißosom beeinflusst wird, machte sich Szafranski Gedanken. „Wir sind uns sicher, dass die Informationen nicht über direkte Zell-Zell-Interaktion weitergegeben werden. Auch die kontaktgestörten HepG2-Leberkarzinomzellen oder in Suspension wachsende Leukämie-Zellen zeigten das gleiche Phänomen“, beschreibt Szafranski seine Beobachtungen. Möglicherweise wird das Signal, welche Spleißstelle benutzt werden soll, über das Medium weitergegeben. Bestärkt wird diese Vermutung durch einen weiteren Versuch: Gaben die Forscher die Zellkultur in ein Medium, das vorher mit „dichten Zellen“ konditioniert wurde, war die Verschiebung der Isoform-Verhältnisse sogar noch beschleunigt.

Kleine Änderung mit großen Folgen?

Tandem-Spleißstellen verursachen naturgemäß sehr „leise“ Veränderungen in den Protein-Isoformen. Damit stellte sich die Frage, ob und wie diese subtilen Änderungen den Phänotyp einer Zelle und eines Organismus beeinflussen können. Mit Szafranskis Veröffentlichung ist klar: Ein physiologischer Auslöser, der die Verhältnisse tausender Protein-Isoformen gleichzeitig beeinflussen kann, macht funktionelle und phänotypische Konsequenzen der TASS sehr viel wahrscheinlicher. Und wirft zugleich neue Fragen auf: Was verbindet die regulierten Gene miteinander? Was bewirken die Isoform-Änderungen? Handelt es sich um eine Anpassung an veränderte Umweltbedingungen? Die Jenaer Forscher wollen nun erst einmal herausfinden, was der „Spleißfänger“, der auslösende Faktor, genau sein könnte.

Und natürlich sucht die FLI-Gruppe auch nach einem Zusammenhang zwischen alternativem Spleißen und dem Altern. Da Altern mit Störungen der Zell- und Gewebshomöostase einhergeht, stellt sich die Frage, welche Konsequenzen ersteres womöglich auf die koordinierte Verschiebung von Isoform-Verhältnissen hat – und ob diese Prozesse altersbedingte Funktionsverluste womöglich befördern oder verlangsamen.

JETTE SCHIMMEL

OPTICAL FILTERS For Spectroscopy

► STED, TIRF, PALM, STORM



AHF ANALYSENTECHNIK

Visit us at VISION, Stuttgart: Booth #1A03
www.ahf.de :: info@ahf.de