

PIOTR POLACZEK

Division of Biology 147-75, California Institute of Technology

Pasadena, California 91125

e-mail: polaczek@cco.caltech.edu

REPERACJA ŹŁE SPAROWANYCH ZASAD W DNA: EWOLUCJA SYSTEMU OD BAKTERII DO CZŁOWIEKA

WSTĘP

Reperacja źle sparowanych zasad w DNA (ang. mismatch repair, MMR) jest systemem obronnym komórki przed mutacjami. Zarówno komórki organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych mają zdolność reperacji źle sparowanych zasad. Błędne parowanie zasad jest najczęściej wynikiem nieprawidłowości w procesie replikacji i rekombinacji DNA. Polimerazy DNA mają aktywność korygującą własne błędy (ang. proofreading activity). Inne mechanizmy naprawcze: naprawa poprzez wycinanie (ang. excision repair), naprawa podwójnych pęknięć DNA (ang. double strand break repair) i fotoreaktywacja zapewniają stabilność materiału genetycznego i powodują, że błędy w kopiowaniu DNA są rzadkością (FRIEDBERG i współaut. 1995).

U bakterii produkty czterech genów są niezbędne dla sprawnego i precyzyjnego funkcjonowania systemu reperacyjnego MMR (MODRICH i LAHUE 1996). Defekty w tych genach prowadzą do wysokiego poziomu akumulacji mutacji. W ostatnich latach w organizmach wyższych odkryto szereg białek o wysokiej homologii do białek bakteryjnego systemu MMR. Wykazano, że pełnią one bardzo podobne funkcje do systemu bakteryjnego.

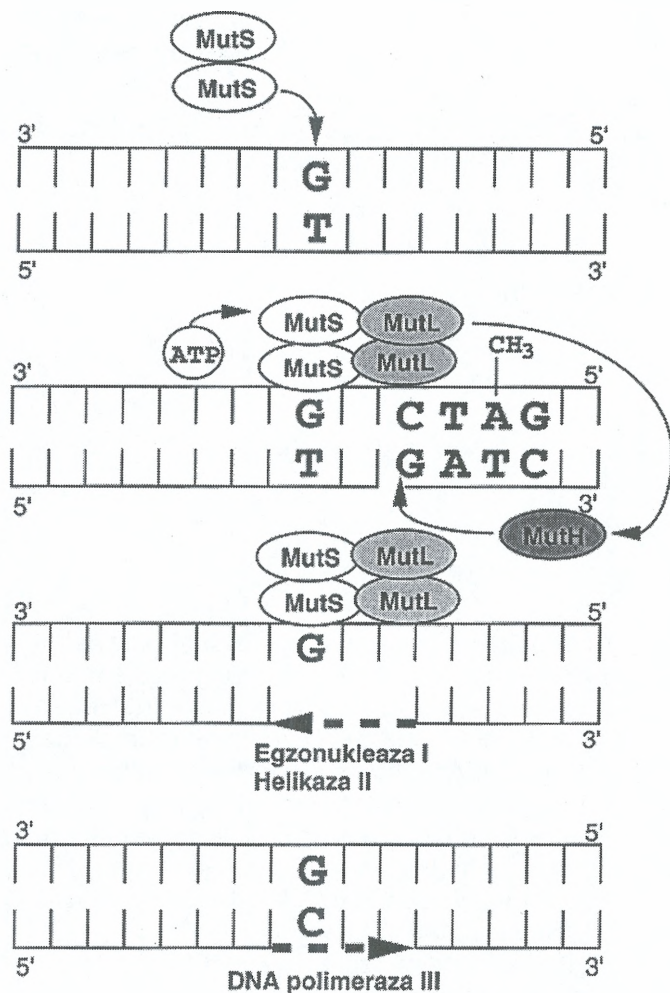
Badania dowodzące, że defekty genetyczne MMR są głównym powodem dziedzicznego raka jelita (ang. hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC) stanowią dramatyczną ilustrację niesłychanej wagi tego systemu, wzmagając zainteresowanie wielu laboratoriów badaniami molekularnych podstaw działania systemu naprawy DNA (AALTONEN i współaut. 1993).

SYSTEM MMR U BAKTERII

Błędy w replikacji DNA i rekombinacji mogą prowadzić do parowania zasad niezgodnych z regułą Watsona i Cricka, która określa, że zasady purynowe A (adenina) lub G (guanina) na jednej z nici DNA tworzą odpowiednio pary z zasadami pirymidynowymi T (tymina) i C (cytozyna) na drugiej z nici DNA. W czasie syntezy DNA zdarzają się błędy w parowaniu zasad prowadzące na przykład do par G-T lub wprowadzanie dodatkowych niesparowanych zasad (insercja). Reperacja MMR ma za zadanie rozpoznawanie takich błędów w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA i ich eliminację (Ryc. 1).

U bakterii *Escherichia coli* DNA ulega metylacji: *dam* metylaza wprowadza grupę metylową

(CH₃) w pozycji N⁶ adeniny w sekwencji GATC. Tak więc, każda adenina w sekwencji GATC ulega modyfikacji. Ponieważ modyfikacja adeniny następuje dopiero po zakończeniu syntezy DNA, przez krótki okres nowo syntetyzowana nić jest niezmetylowana. Brak metylacji na jednej z nici jest rozpoznawany przez kompleks reperacyjny komórki. W pierwszym etapie, białko MutS w formie dimeru wiąże się do źle sparowanych zasad. Następnie dimer białka MutL tworzy kompleks z MutS. Ciekawe jest, że MutS ma dwie aktywności: w reakcji niezależnej od ATP rozpoznaje i wiąże się do źle sparowanych zasad, a następnie, w reakcji wymagającej ATP, zmiana konformacyjna białka pozwala na



Ryc. 1. Schemat przedstawiający kolejne etapy reperacji źle sparowanych zasad DNA. Górna nić (3U-5U) jest nicią rodzicielską. Sekwencja GATC może znajdować się po drugiej stronie źle sparowanych zasad, zmieniając kierunek reakcji egzonukleolitycznej. Szczegóły w tekście.

translokacje MutS wzdłuż DNA (prawdopodobnie w kompleksie z MutL). Mikroskopia elektronowa wykazała istnienie przejściowych struktur typu α (pętli) (ALLEN i współaut. 1997). Wydaje się, że taka struktura umożliwia współdziałanie MutS/MutL z MutH. Tworzenie się kompleksu DNA/MutS/MutL stanowi sygnał prowadzący do aktywacji endonukleazy związanej z białkiem MutH, które nacina niezmodyfikowaną nić DNA w hemimetylowanej sekwencji GATC (nić rodzicielska jest zmodyfikowana).

Nacięcie nici może nastąpić w GATC po jednej lub drugiej stronie źle sparowanych zasad. MutS i MutL wycinają fragment DNA zawierający błędnie sparowane zasady w współ-

działaniu DNA helikazą II (produkt genu *mutU*) i jedną z egzonukleaz: ExoI, ExoVII lub RecJ. Wycięciu ulega fragment często odległy o kilkadziesiąt nukleotydów od sekwencji GATC do miejsca błędnie sparowanych zasad, a reakcja ta jest dwukierunkowa. W zależności od kierunku wycinania, w procesie tym uczestniczą egzonukleazy o różnej specyficzności: ExoI (3'-5'), RecJ (5'-3') lub ExoVII (3'-5' i 5'-3'). Następnie DNA polimeraza III resyntetyzuje uprzednio wycięty segment DNA używając jako matrycy nici rodzicielskiej (nie zawierającej błędnego nukleotydu), a ligaza integruje kowalencyjnie nowo zszyntetyzowany fragment do DNA.

SYSTEMY MMR ORGANIZMÓW WYŻSZYCH

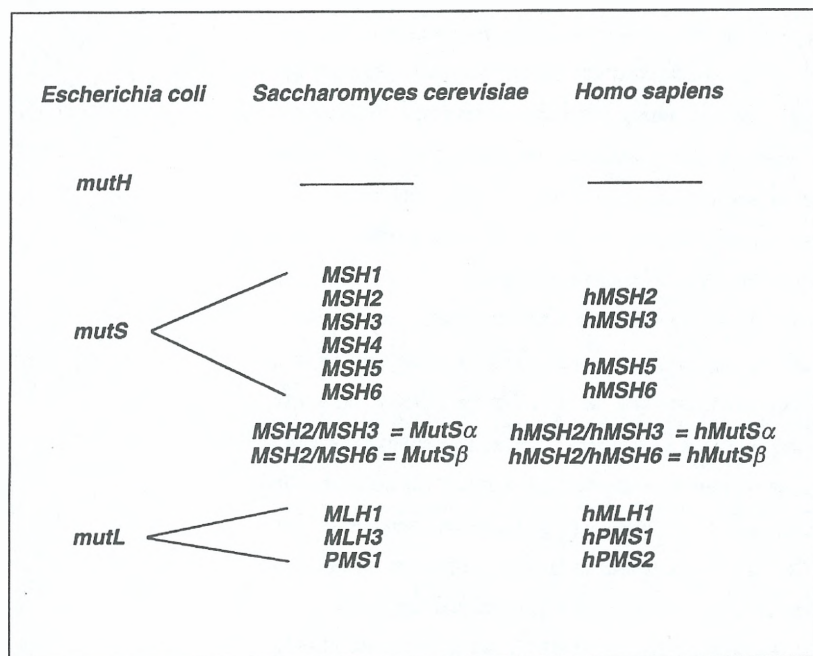
Ponieważ system reperacji jest tak ważny dla stabilności genomu, istnienie podobnego systemu w organizmach wyższych nie powinno być zaskoczeniem. Rzeczywiście, w ostatnich latach, zidentyfikowano odpowiedniki białek MutS i MutL w organizmach eukariotycznych,

od drożdży do człowieka (KOLODNER i MARSISCHKY 1999). Białka te na ogół nazywano opierając się na homologii do białek bakteryjnych. Tak więc, MSH2 (MutS homologue) jest homologiczne do MutS a MLH1 do MutL (MutL homologue). W odróżnieniu od organizmów prokariotycz-

nych, sekwencje GATC w organizmach eukariotycznych nie ulegają metylacji i brak jest eukariotycznego odpowiednika białka MutH.

U Eukaryota, w porównaniu do systemu bakteryjnego, system reperacyjny jest bardziej złożony (Ryc. 2). Na przykład, drożdże *Saccharomyces cerevisiae* mają sześć poznanych homologów MutS (MSH1-MSH6) i trzy homologi

miast kompleks MSH2/MSH6 (MutS β) naprawia pojedyncze źle sparowane zasady lub insercje/delecje pojedynczego nukleotydu. Ponieważ mutacje w genie *msh2* charakteryzują się brakiem zdolności naprawy obu typów błędów, przypuszcza się, że MSH2 stanowi rusztowanie dla wiązania się z czynnikami specyficzności (MSH3 i MSH6).



Ryc. 2. Homologiczne białka systemu MMR u bakterii (*E. coli*), drożdży (*S. cerevisiae*) i w komórkach ludzkich (*H. sapiens*).

Nazwy MutSa i MutSb dla określenia kompleksów drożdżowych oraz hMutSa i hMutSb systemu ludzkiego wprowadzono mając na celu ujednolicenie nieco chaotycznej nomenklatury białek eukariotycznych.

MutL (MLH1, MLH3 i PMS1). Komórki ludzkie mają cztery znane homologi MutS (hMSH2, hMSH3, hMSH4 i hMSH6) oraz trzy homologi MutL (hMLH1, hPMS1 i hPMS2). Ewolucja systemu eukariotycznego jest prawdopodobnie związana z większą złożonością genomów eukariotycznych, bardziej skomplikowanym cyklem komórkowym oraz z istnieniem genomów organeli pozajądrowych. Na przykład, MSH1 drożdży jest białkiem mitochondrialnym, homologiem bakteryjnego MutS. Co jest ciekawe, sekwencje aminokwasów homologicznych białek, od bakterii do człowieka, są zaskakująco podobne: na przykład MSH2 drożdżowe jest w 42% identyczne do hMSH2 ludzkiego (Ryc. 3).

W naprawie typu MMR u drożdży uczestniczy MSH2 w parze z MSH3 lub MSH6. Kompleks MSH2/MSH3 (MutS α) uczestniczy w naprawie 2-4 nukleotydowych insercji lub delecji, nato-

Pojedyncze mutacje w genach *msh2* lub *msh6* mają mniejszy efekt mutatorowy niż mutacja w *msh2*, natomiast podwójny mutant *msh2/msh6* charakteryzuje się defektem w naprawie DNA identycznym do *msh2*. Tłumaczy to się tym, że niektóre funkcje MSH3 i MSH6 mogą być wymienne. Białka homologiczne do bakteryjnego MutL (MLH1 i PMS1 lub MLH1 i MLH3) tworzą heterodimery i podobnie jak w systemie bakteryjnym współdziałają z homologami MutS (MSH2/MSH3 lub MSH2/MSH6). W badaniach ekstraktów jądrowych komórek ludzkich obserwuje się bardzo podobne interakcje homologicznych białek zarówno jeśli chodzi o specyficzność jak i dwukierunkowość reakcji naprawczych. Niektóre komponenty systemu są jednak różne na przykład ludzkim odpowiednikiem drożdżowego PMS1 jest hPMS2, a odpowiednikiem MLH3 jest hPMS1.

MMR A CHOROBY NOWOTWOROWE

Odkrycie korelacji pomiędzy defektem w hMSH2 (ludzki homolog MutS) a dziedziczną

predyspozycją do raka jelita (ang. hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC) stanowiło

```

1 MSTRPELKFSDVSEERNFYKKYTGLPKKPLKTIKRLVDKGDYTYTVIGSDA 50
| . . . | . . . | . . . | . . . | . . . | . . . | . . . | . . . |
1 MAVQPKETLQLESAAEVGFVRFFQGMPEKPTTTVRLFRGDFYTAHGEDA 50

51 IFVADSVYHTQSVLKNQCQDFVTAKNFHEPTKYVTVSLQVLATLLKLCLL 100
::: | . : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
51 LLAAREVFKTQGVIKY . MGPAGAKNLQS . . . VVLSKMNFESEFKDLLL 94

101 DLGYKVEIY . . . . . DKGWKLKISASPGNIEQVNELMNMNIDSSII 140
. : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
95 VRQYRVVEYKRNAGNKASKENDWYLATKASPGNLSQFEDILFGNNDMSAS 144

141 IASLKVQWNSQDGNCIIGVAFIDITAYKVGMLDIVNEVYSNLESFLIQL 190
| : : | . . . | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
145 IGVVGVKMSAVDQQRQVGVGVDSIQKRLGLCEFFDNDQFSNLEALLIQL 194

191 GVKECLVQDLTSNSNSNAEMQKVINVIDRCGCVVTLKNSEFSEKDVELD 240
| . : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
195 GPKECVLPG . . . GETAGDMGKLQIIRGGILITERKKADFSTKDIYQD 240

241 LTKLL . . . GDDL . ALSLPQKYSKLSMGACNALIGYLQLLSEQDQVGKYE 285
| : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
241 LNRLLKGGKGEQMNSAVLPENENQVAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFE 290

286 LVEHKLKEFMKLDASAIKALMLFPQGPQNPFSGNNLAVSGFTSAGNSGKV 335
| . . : : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
291 LTTDFDSQWKLDAIAVRLNLFQGSVEDTTGSQSLA . . . . . 327

336 TSLFQLLNHCKTNAGVRLNNEWLQPLTNIDEINKRDLVDYLIDQIELR 385
. : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
328 . . . ALLNKCKTFQGRVQWIKQPLMDKNRIERLNLVEAFVEDAEIR 373

386 QMLTSEYLPMPDIRRLTKLKNR . GNLEDVLKIYQFSKRIPETIVQVFTS 434
| | . : . : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
374 QTLQEDLLRRFPDLNRLAKKQFQQAANLQDCYRLYQGINQLPNVIAL . 421

435 FLEDDSPTEFVNELVRSVWLAPLSHHVEPLSKFEEMVETTVDLDAYEEN 484
: : : . . : : . : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
422 . . . EKHEGKHQKLLAVFVTPLTDLRSDFSKFQEMIETTLMDQV . ENH 466

485 EFMKVEFNEELGKIRSKLDTLRDEIHSIHLDSEAEDLGFDPKKLLENH 534
| : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
467 EFLVKPSPFNLSELREIMNDLEKKMQSTLISAARDLGDPGKQIKLDS 516

535 HLHGWCMLTRNDKELRKHKKYIELSTVKAGIFFSTKQLKSIAETNIL 584
| : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
517 AQFGYFFRVTCKEEKVLRNNKNFSTVDIQKNGVKFTNSKLTSLNEEYTKM 566

585 QKEYDKQQSALVREIINITLTYPVFEKLSVLHLVLAHLDVIASFAARTSSYAP 634
. . | : . . | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
567 KTEYEEAQDAIVKEIVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLDAVVSTAHVSNAGAP 616

635 IPYIRPKLHPMDSERRTHLISSRHVLEMQDDISFISNDVTLESCKGDFL 684
: : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
617 VPYVPAILE . KGQGRILKASHACVEVQDEIAFIPMDVYFEKDKQMFH 665

685 IITGPNMGKSTYIRQVGVISLMAQIGCFVPCESAEIAIVDAILCRVAG 734
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
666 IITGPNMGKSTYIRQTVIVLMAQIGCFVPCESAEIVDCILARVAG 715

735 DSQKGVSTFMVEILETASILKNASKNSLIIVDELGRGTSTYDGFGLAWA 784
| | | | | | | | | : | | | | | : | : | : | : | : | : | : |
716 DSQKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIVDELGRGTSTYDGFGLAWA 765

785 IAEHIASKIGCFALFATHFHELTSEKLPNVKNMHVVAHIEKNLKEQKH 834
| . | . | . | . | : | | | | | . | : : | . | : | . | .
766 ISEYIATKIGAFCMFATHFHELTALANQIPTVNNLHVLTALT . . . . . 806

835 DDEDITLLYKVEPGISDQSFGEHVAEVVQFPEKIVKMAKRANELDDLKT 884
. : . : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
807 TEETLTMLYQVKKGVCDQSFGEHVAELANFPKHVIECAKQKALEEFPQY 856

885 NNEDL . . . . . KKAKLSLQEVNEGNIRLKALLKEWIRKVKKEGLHDPSKI 928
. . . . | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : | : : |
857 IGESQGYDIMEPAKKCYLEREQGE . . . KIIQEFLSKVQKMPF . . . . . 896

929 TEASQHKIQELLRAIANEPEKENDNYLKIKALL . . . . . 964
. | : : | : : | : : | . | : : | : : | . :
897 . TEMSEENITIKLKQLKAEVIAKNNSFVNEIISRIKVT* 935

```

Ryc. 3. Porównanie sekwencji aminokwasów białek MSH2 drożdży (górna sekwencja) i ludzkiego hMSH2.

Pionowe kreski wskazują identyczne aminokwasy; dwukropki wskazują podobne aminokwasy; poziome kreski wskazują brak odpowiedniej sekwencji w jednym lub drugim genie.


```

535 HLHGWCMLRTRNDAKELRKHKHYIELSTVKAGIFFSTKQLKSIAETNII 584
      ||::|| : | | | : : : | : | : | : | : |
517 AQFGYIFRVTCKEEKVLRNNKNFSTVDIQNGVKFTNSKLTSLNEEYTKN 566
      |||::||| : | | | : | : | : | : | : | : | : |
585 QKEYDQQSALVREIINITLTYPVFEEKLSLVLAHLDVIAFSHTSSYAP 634
      |||::||| : | | | : | : | : | : | : | : | : |
567 KTEYEAAQDAIVKEIVNISSGYVEPMQTLDNVLAQLDAVVSAFVSNGAP 616
      |||::||| : | | | : | : | : | : | : | : | : |
635 IPYIRDLHPMDSERRTHLISSREFVLEMQDDISFINSDVTLESGBKDFL 684
      : ||::| : :: | ||| : ::| : ||| : | : | : | : |
617 VPYVRPAILE-KGGRIILKASRHACVEVQDEIAFIPNDVYFEKDKQMFI 665
      |||::||| : | | | : | : | : | : | : | : | : |
685 IITGPNMGCKSTYIRQVGVISLMAQIGCFVPCEAEIAIVDAILCRVGAG 734
      |||::||| : | | | : | : | : | : | : | : | : |
666 IITGPNMGGKSTYIRQTEVLVLMQIGCFVPCSAEVSIVDCILARVGAG 715
      |||::||| : | | | : | : | : | : | : | : | : |

```

Niewypełnione litery (R, P, H i G) reprezentują pozycje, w których wprowadzono mutacje opisane w tekście. Białka z mutacjami w tych pozycjach służyły do badań funkcjonalnych w drożdżach.

Wczesne wykrycie chorób nowotworowych lub genetycznej predyspozycji do chorób nowotworowych jest niesłychanie ważne z klinicznego punktu widzenia. W związku z tym szereg laboratoriów podjęło próby znalezienia prostych testów dla określenia aktywności genów systemu MMR. W jednym z kierunków tego typu badań wykorzystuje się homologie pomiędzy MMR drożdżowym i ludzkim. Podjęto szereg nieudanych prób komplementowania systemu drożdżowego systemem ludzkim. Przypuszcza się, że mimo ogromnego podobieństwa geny te nie są wymienne, szczególnie, że w reakcjach tych uczestniczy kompleks złożony z szeregu białek. Wychodząc z założenia, że podobne regiony w MSH2 drożdżowym i ludzkim hMSH2 mogą być funkcjonalnie równoważne i błędy w identycznych aminokwasach powodować te same defekty genetyczne, wprowadzono dwie znane mutacje hMSH2 do drożdżowego MSH2 (POLACZEK i współaut. 1998, Ryc. 4). Jedna z mutacji (Pro640-Leu) spowodowała utratę funkcji białka MSH2, w przeciwieństwie do innej mutacji (His658-Tyr), gdzie nie zaobserwowano utraty funkcji MSH2. Co jest ciekawe, mutacja Pro622-Leu w hMSH2 została wykryta u pa-

Podobne podejście do tego problemu, również wykorzystując drożdże, podjęło laboratorium Kunkela (NIEHS, Północna Karolina). Wykorzystano w tym przypadku obserwacje, że diploidalne drożdże z delecją jednej z kopii MSH2 i wprowadzeniu drugiej zmutowanej kopii mają fenotyp mutatorowy (DROTSCHMANN i współaut. 1999). Dominujący efekt mutatorowy zaobserwowano przy zamianie Gly633-Ala lub Gly633-Ser (Ryc. 4). Badania *in vitro* wiązania kompleksu MSH2(Gly633-Ala)/MSH6 do źle sparowanych zasad wskazują, że tego typu kompleks ma zdolność wiązania do DNA, ale utracił zdolność do dysocjacji w obecności ATP.

Ekspresja ludzkiego hMSH2 w drożdżach ze zmutowanym genem MSH2 nie obniża wysokiego wskaźnika mutacji (ang. mutation rate) tego szczepu a w szczepie dzikim ekspresja ludzkich białek MMR nie powoduje wzrostu niskiego wskaźnika mutacji (CLARK i współaut. 1999). Inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku koekspresji hMSH2 i hMSH6 lub hMSH2 i MSH3 w szczepie dzikim drożdży. W pierwszym

przypadku wskaźnik mutacji wrasta 4000 razy, a w drugim pięciokrotnie (CLARK i współaut. 1999). Wiązanie się tych kompleksów ze źle sparowanymi zasadami w drożdżach ingeruje z systemem MMR drożdży, co prowadzi do zwiększenia efektu mutatorowego. Koekspresja hMSH6 i hMSH2 z mutacją Arg524-Pro (Ryc. 4), związaną z HNPCC, redukuje wiązanie się tego kompleksu ze źle sparowanym DNA i eliminuje efekt mutatorowy. Wynika z tego, że kompleksy hMSH2/hMSH3 oraz hMSH2/hMSH6 mają zdolność do wiązania się z błędnie sparowanymi zasadami w drożdżach i system ten może służyć do badań efektów niektórych mutacji związanych z HNPCC.

Powyższe badania przedstawiają pierwsze próby analizy funkcjonalnej systemu MMR. Mo-

żliwości pełnej analizy są jednak ograniczone, gdyż system drożdżowy nie wykryje defektów we współdziałaniu białek specyficznych dla systemu ludzkiego. Na przykład hMSH2 współdziała z hMLH1 w rozpoznawaniu źle sparowanych zasad i białko drożdżowe (MLH1) może być niepełnowartościowym partnerem w tych reakcjach. Rozwój tego typu badań poprzez wprowadzanie większej ilości elementów systemu ludzkiego do drożdży, w różnych kombinacjach, może doprowadzić do lepszego poznania natury defektów genetycznych w systemie MMR. W ostatnich latach notuje się ogromny postęp w tych badaniach i można oczekiwać, że w niedalekiej przyszłości znane będą efekty większości mutacji w genach odpowiedzialnych za naprawę DNA.

DNA MISMATCH REPAIR (MMR): EVOLUTION OF THE SYSTEM FROM BACTERIA TO HUMANS

Summary

DNA mismatch repair (MMR) represents one of the cellular repair mechanisms ensuring genetic stability of the chromosome, some components of the system being conserved in procaryotes and eucaryotes. Mismatches most commonly arise due to DNA replication and recombination errors. Genetic defects in MMR play an important role in

cancer susceptibility, and attempts are being made to develop functional *in vivo* assays of the human mismatch repair protein activities. In the paper experiments are described in which yeast serves as a model organism useful for interpreting and understanding the function of the human counterparts of the MMR system.

LITERATURA

- AALTONEN L. A., PELTOMAKI P., LEACH F. S., SISTONEN P., PYLKKANEN L., MECKLIN J. P., JARVINEN H., POWELL S. M., JEN J., HAMILTON S. R., PETERSON G. M., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., DE LA CHAPPELLE A., 1993. *Clues to pathogenesis of familial colorectal cancer*. Science 260, 812-816.
- ALLEN D. J., MAKHOV A., GRILLEY M., TAYLOR J., THRESHER R., MODRICH P., GRIFFITH J. D., 1997. *MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism*. EMBO J. 16, 4467-44476.
- CLARK A. B., COOK M. E., TRAN H. T., GORDENIN D. A., RESNICK M. A., KUNKEL T. A., 1999. *Functional analysis of human MutS and MutL complexes in yeast*. Nucleic Acids Res. 3, 736-742.
- DROTSCHMANN K., CLARK A. B., TRAN H. T., RESNICK M. A., GORDENIN D. A., KUNKEL T. A., 1999. *Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the MSH2 gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 6, 2970-2975.
- FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SIEDE W., 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington D. C.
- KOLODNER R. D., MARSISCHKY G. T., 1999. *Eukaryotic DNA mismatch repair*. Curr. Opin. Genet. Dev. 1, 89-96.
- MODRICH P., LAHUE R., 1996. *Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology*. Annu. Rev. Biochem. 65, 101-133.
- POLACZEK P., PUTZKE A. P., LEONG K., BITTER G. A., 1998. *Functional genetic tests of DNA mismatch repair protein activity in Saccharomyces cerevisiae*. Gene (Amsterdam) 213, 159-167.