

**Untersuchungen zur Biogenese
spleißosomaler UsnRNPs und ihrer
Bedeutung für die Pathogenese der SMA**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christian Eggert
aus Köln

Würzburg 2005

Eingereicht am 8. September 2005
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Professor Dr. U. Fischer
2. Gutachter: Professor Dr. F. Grummt
der Dissertation

1. Prüfer: Professor Dr. U. Fischer
2. Prüfer: Professor Dr. F. Grummt
3. Prüfer: Professor Dr. H. Höhn
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 21.10.2005

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Diese Arbeit wurde angefertigt



am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried



und der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Wisset, dass das Geheimnis
des Glücks die Freiheit ist,
das Geheimnis der Freiheit aber
ist der Mut.

Perikles

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Zusammenfassung	10
3. Summary	13
4. Einleitung	16
4.1 Das Krankheitsbild der Spinalen Muskelatrophie.....	16
4.2 Die Genetik der Spinalen Muskelatrophie.....	17
4.3 Das Survival Motor Neuron Protein.....	19
4.4 Architektur und Biogenese der U snRNPs.....	20
4.5 Der SMN-Komplex und seine Rolle in der UsnRNP-Biogenese.....	22
4.6 pICln und die Entdeckung des PRMT5-Komplexes.....	23
4.7 pICln dient vermutlich als Speicher für Sm-Proteine.....	25
4.8 Ein Modell für den assistierten Zusammenbau von U snRNPs.....	25
4.9 Der SMN-Komplex vermittelt den Zusammenbau verschiedener RNPs....	27
4.10 Problemstellung und Konzeption.....	28
5. Materialien	31
5.1 Chemikalien und Enzyme.....	31
5.2 Oligonukleotide.....	31
5.3 Plasmide.....	31
5.4 Antikörper.....	33

5.5	Organismen und Zelllinien.....	33
5.6	Zellkulturmedien.....	34
5.7	Puffer und Lösungen.....	34
6.	Methoden.....	40
6.1	Molekularbiologische Methoden.....	40
6.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	40
6.1.2	DNA-Restriktionsverdau.....	40
6.1.3	5'-End-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	41
6.1.4	Ligation zweier DNA-Fragmente.....	41
6.1.5	Transformation von DNA in <i>E.coli</i> Bakterien.....	42
6.1.6	Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	42
6.1.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
6.2	Immunologische und immunbiochemische Methoden.....	43
6.2.1	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	43
6.2.2	Kopplung von Antigen-Peptiden an BSA.....	44
6.2.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	44
6.2.4	Kopplung von Antikörpern an Protein G-Sepharose.....	45
6.2.5	Immunpräzipitation.....	45
6.2.6	Western Blotting.....	46
6.2.7	Färben von Proteinbanden auf Nitrocellulose- und PVDF- Membranen.....	46
6.2.8	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung und Immunofärbung von Zebrafisch-Embryonen.....	47
6.3	Biochemische Methoden.....	47

6.3.1	Gel-Systeme.....	47
6.3.2	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i> Bakterien.....	49
6.3.3	Aufreinigung von Proteinen aus <i>E.coli</i> Bakterienlysat.....	49
6.3.4	Dialyse von Proteinen und Proteinkomplexen.....	50
6.3.5	Kovalente Kopplung von Proteinen an Cyan-Bromid-aktivierte Sepharose.....	50
6.3.6	<i>In vitro</i> Transkription.....	51
6.3.7	Radioaktive 3'-End-Markierung von RNA.....	52
6.3.8	Hybridisierung von RNAs.....	52
6.3.9	Reinigung radioaktiv markierter RNA aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen.....	53
6.3.10	Phenol-Extraktion von RNA und Protein aus Immunpräzipitaten.....	53
6.3.11	Herstellung von Zellextrakten.....	54
6.3.12	<i>In vitro</i> Rekonstitution von UsnRNPs aus rekombinanten Sm-Proteinen und <i>in vitro</i> transkribierten RNAs.....	55
6.3.13	<i>In vitro</i> Zusammenlagerung von UsnRNPs in Zellextrakten.....	56
6.3.14	<i>In vitro</i> Zusammenlagerung von UsnRNPs mit immunpräzipitierten Proteinkomplexen.....	57
6.4	Zellkultur-Methoden.....	58
6.4.1	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	58
6.4.2	RNA-Interferenz in HeLa-Zellen.....	58
6.4.3	In vivo-Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin/Cystein.....	60
6.4.4	TUNEL-Apoptoseassay.....	60
6.4.5	Zebrafisch-Kultur.....	61
6.4.6	Mikroinjektion in Zebrafischen.....	61

7. Ergebnisse	62
7.1 Unterdrückung der SMN-Expression in HeLa-Zellen führt zu reduzierter UsnRNP-Produktion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	62
7.1.1 Etablierung eines SMA-Modells in HeLa-Zellkultur.....	62
7.1.2 Die UsnRNP-Zusammenlagerung in Zellextrakten RNAi-behandelter Zellen nimmt proportional mit der Menge an SMN-Protein ab.....	65
7.1.3 Die Reduktion der SMN-Menge führt zu einer verminderten Produktion von UsnRNPs <i>in vivo</i>	67
7.2 Die reduzierte Expression von SMN, Gemin2 oder pICln führt zur Degeneration von Motoraxonen in Zebrafisch.....	69
7.2.1 Mit Hilfe der Morpholino-Technik lassen sich die Expressionen von SMN, Gemin2 und pICln unterdrücken.....	69
7.2.2 Die Reduktion der Proteinmenge von SMN, Gemin2 oder pICln führt zu Störungen der Embryonalentwicklung.....	71
7.2.3 SMN-, Gemin2- und pICln-defiziente Embryonen entwickeln degenerierte Motoraxone.....	73
7.2.4 Koinjektion von reifen UsnRNPs rettet SMN- und Gemin2-defiziente Zebrafisch-Embryonen.....	76
7.3 Der SMN-Komplex stellt die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung sicher.....	82
7.3.1 Sm-Proteine binden <i>in vitro</i> spontan und unspezifisch an verschiedene RNAs.....	83
7.3.2 Der SMN-Komplex überträgt Sm-Proteine spezifisch nur auf snRNA..	85
7.4 Die minimale noch assemblierende snRNA besteht aus der Sm-site flankiert von einer 3'-terminalen Schleife.....	87

7.4.1	Die 5'-terminalen Strukturen spielen keine wesentliche Rolle bei der Zusammenlagerungsreaktion von UsnRNPs.....	90
7.4.2	Die Sm-site ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Bildung eines stabilen Sm-cores.....	97
7.4.3	Die 3'-terminale Schleife ist für die UsnRNP-Zusammenlagerung notwendig.....	98
7.4.4	Die U7opt RNA wird in HeLa Cytoplasmaextrakt effizient assembliert.....	100
7.4.5	Die Zusammenlagerung der getesteten RNAs ist strikt abhängig vom SMN-Komplex.....	101
7.5	Der SMN-Komplex zeigt während des Zusammenlagerungs-Prozesses keine RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität.....	103
7.6	pICln kann unspezifische Aggregationen von Sm-Proteinen verhindern..	108
7.6.1	pICln hemmt die spontane Bindung von Sm-Proteinen an RNA.....	109
7.6.2	pICln kann die Selbstaggregation von Sm-Proteinen unterdrücken..	110
7.7	Native Aufreinigung des SMN-Komplexes für die Kryoelektronenmikroskopie.....	113
7.7.1	Etablierung eines Reinigungsprotokolls zur nativen Elution des SMN-Komplexes.....	113
7.7.2	Kryo-Elektronenmikroskopie des eluierten SMN-Komplexes.....	116
8.	Diskussion.....	119
8.1	Untersuchungen der molekularen Ursachen der Spinalen Muskelatrophie.....	119
8.1.1	SMN-Mangel führt zu reduzierter UsnRNP-Synthese in HeLa-Zellen	119
8.1.2	SMN-Mangel führt zu SMA-ähnlichen Phänotypen in Zebrafisch-Embryonen.....	121

8.1.3	Der Mangel von Gemin2 und pICln führt ebenfalls zu Defekten der Motoneurone in Zebrafisch-Embryonen.....	121
8.1.4	Die Degeneration der Motoraxone kann durch die Koinjektion von isolierten UsnRNPs verhindert werden.....	122
8.2	Untersuchungen zu den Grundlagen der Spezifität in der SMN-vermittelten UsnRNP-Zusammenlagerung.....	125
8.2.1	Der SMN-Komplex stellt die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung sicher.....	126
8.2.2	pICln verhindert unspezifische Aggregationen der Sm-Proteine.....	127
8.2.3	Der für die Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen minimal erforderliche Sequenzbereich der U1 snRNA besteht aus der Sm-site und einer 3'-flankierenden Sequenz.....	130
8.2.4	Der SMN-Komplex übt während der Zusammenlagerung von UsnRNPs keine RNA-Doppelstrang-entwindende Funktion aus.....	132
8.3	Ausblick.....	134
9.	Literaturverzeichnis.....	135
10.	Anhang.....	142
10.1	Abkürzungsverzeichnis.....	142
10.2	Publikationen.....	146
10.3	Danksagung.....	147
10.4	Lebenslauf.....	148
10.5	Erklärung.....	149

2. Zusammenfassung

Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch das Absterben der α -Motoneuronen und eine fortschreitende Muskelschwäche der Patienten gekennzeichnet ist. 1995 wurde das Krankheitsgen der SMA, das *Survival Motor Neuron (SMN)*-Gen identifiziert. Dieses essentielle Gen ist in zwei nahezu identischen Kopien (*SMN1* und *SMN2*) auf Chromosom 5 lokalisiert ist. Der wesentliche Anteil des SMN-Proteins stammt von der *SMN1*-Kopie. Ein Nukleotidaustausch im *SMN2*-Gen führt zu einem verstärkten alternativen Spleißen der *SMN2*-mRNA, wodurch von diesem Gen lediglich 20% funktionelles SMN-Protein exprimiert wird. Die SMA wird durch homozygote Deletion oder Mutation der *SMN1*-Kopie verursacht. Die *SMN2*-Kopie kann diesen Ausfall nicht voll kompensieren und es kommt zu einem Mangel an funktionellem SMN-Protein. Interessanterweise findet man bei mildereren Verlaufsformen der SMA häufig eine oder mehrere Duplikationen des *SMN2*-Gens. Es handelt sich hier um einen Gendosis-Effekt, d.h. der Schweregrad der Krankheit korreliert direkt mit der Verfügbarkeit an aktivem SMN-Protein.

Bisher ist rätselhaft, warum der SMN-Mangel eine Zelltyp-spezifische Degeneration hervorruft, denn *SMN* wird ubiquitär und nicht nur in Motoneuronen exprimiert. Um dieses Paradoxon zu lösen, wurden große Anstrengungen unternommen, SMN eine bestimmte Funktion zuzuordnen. Verschiedene Studien haben Verbindungen von SMN zur Biogenese von spleißosomalen und Histon-mRNA prozessierenden U snRNPs (Uridin-rich small nuclear RiboNucleoProtein particles), sowie zur Transkription, Translation und zum axonalem Transport beschrieben. Der Zusammenbau der U snRNPs ist die bisher am besten verstandene Funktion von SMN. Sieben sogenannte Sm-Proteine müssen als hexamerer Ring um eine spezifische Sequenz der U snRNA (U1, U2, U4 oder U5 snRNA) gebunden werden. SMN agiert dabei als Teil des makromolekularen sogenannten SMN-Komplexes, welcher die Sm-Proteine bindet und deren Transfer auf die snRNA katalysiert. Der SMN-Komplex ist für diesen Prozess notwendig und hinreichend, doch weiß man seit

wenigen Jahren, dass ein zweiter Komplex um die Protein Arginin(R) Methyl Transferase 5 (PRMT5) die Reaktion erheblich fördert. Dieser sogenannte PRMT5-Komplex führt symmetrische Dimethylarginine in einige der Sm-Proteine ein, wodurch deren Affinität zu SMN gesteigert wird.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Mangel von SMN *in vivo* zu einer eingeschränkten U snRNP-Synthese führt, und ob diese reduzierte U snRNP-Produktion die Degeneration von Motoneuronen auslösen kann. Dazu wurden zwei experimentelle Modellsysteme etabliert, die die zellulären Bedingungen einer Spinalen Muskelatrophie reflektieren. Zunächst wurde die SMN-Menge in HeLa-Zellen mittels RNA-Interferenz auf eine Konzentration gesenkt, wie sie in Fibroblasten von SMA-Patienten vorkommt. Diese SMN-defizienten Zellen zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (in Zellextrakten) eine stark verminderte U snRNP-Produktion. Um untersuchen zu können, ob dieser Defekt als Ursache für die Degeneration von Motoneuronen in Frage kommt, wurde mit Hilfe der Morpholino-Technik die SMN-Expression in Zebrafisch-Embryonen unterdrückt. Als Folge des SMN-Mangels traten dabei Entwicklungsdefekte und Degenerationen der Axone von Motoneuronen auf, also ein Phänotyp vergleichbar dem der SMA. Nahezu der gleiche Effekt wurde mit Expressionsinhibitionen von Gemin2 und pICln erreicht, zweier weiterer an der U snRNP-Synthese beteiligter essentieller Faktoren. Dies legte nahe, dass die Degeneration der Motoraxone nicht auf dem Ausfall einer putativen Motoneuron-spezifischen Funktion von SMN, sondern tatsächlich auf einer eingeschränkten U snRNP-Biogenese beruht. In der Tat konnten die Motoneuron-Defekte in SMN-defizienten Fischen nahezu vollständig durch eine Koinjektion von isolierten nativen U snRNPs verhindert werden. Somit wurde anhand eines Tiermodells zum ersten Mal eine direkte Verbindung zwischen der Funktion von SMN in der U snRNP-Biogenese und der Degeneration von Motoraxonen bewiesen.

Um die molekularen Mechanismen der U snRNP-Biogenese besser zu verstehen, wurde in einem weiteren Projekt untersucht, wie die Spezifität der Zusammenlagerung von U snRNAs und Sm-Proteinen gewährleistet wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass isolierte Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen (ohne Zugabe von tRNA, o.ä.) nicht nur an snRNAs, sondern auch

unspezifisch an Nicht-snRNAs binden. Aus HeLa-Zellen isolierter SMN-Komplex dagegen lädt die Sm-Proteine ausschließlich auf intakte snRNAs und stellt so die Spezifität der U snRNP-Zusammenlagerung sicher. Diese Spezifität basiert auf bestimmten Sequenzabschnitten der Substrat-RNA, wie anhand verschiedener Deletionsmutanten der U1 snRNA festgestellt werden konnte. Der für die SMN-vermittelte Zusammenlagerung minimal erforderliche Sequenzbereich der RNA besteht demnach aus einer einzelsträngigen U-reichen Sequenz (Sm-site) und einem 3'-flankierenden stem-loop. Beide Sequenzmotive findet man in allen RNAs, die SMN-abhängig mit Sm-Proteinen zusammengelagert werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass auch pICln, eine wichtige Komponente des PRMT5-Komplexes, die unspezifische Aggregation von Sm-Proteinen verhindern kann und sehr wahrscheinlich als Speicher für die Sm-Proteine fungiert. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen daher vermuten, dass durch das Zusammenspiel der verschiedenen an der UsnRNP-Biogenese beteiligten Faktoren sowohl die unspezifische Aggregation der Substrate verhindert, als auch die korrekte Zusammenlagerung sichergestellt wird.

3. Summary

Spinal muscular atrophy (SMA) is a hereditary neurodegenerative disease characterised by the degeneration of α -motoneurons in the spinal cord resulting in a progressive muscular atrophy. It is caused by the homozygous deletion or mutation of a gene called survival motor neuron (SMN). This essential gene is located in two almost identical copies (*SMN1* and *SMN2*) on chromosome 5. The majority of SMN protein is produced from the *SMN1* gene. Due to a single nucleotide difference in the *SMN2* gene 80% of the *SMN2*-mRNA is alternatively spliced resulting in a non-functional SMN protein. Thus people with deletions or mutations in the *SMN1* gene suffer from a deficiency of functional SMN protein as the *SMN2* gene cannot compensate for the loss of *SMN1*. Interestingly SMA-patients with additional copies of the *SMN2* gene exhibit less severe phenotypes indicating that SMA occurs in a gene-dose dependent manner.

To date it is not clear why the SMN deficiency results in the specific degeneration of α -motor neurons, given that SMN is expressed ubiquitously rather than restricted to motor neurons. To solve this paradox, several approaches have been exploited to assign SMN to a specific function. These studies have revealed links of SMN to the assembly of spliceosomal and histone mRNA-processing uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles (UsnRNPs), to transcription, to pre-mRNA splicing and to axonal transport.

The work presented here focuses on the assembly of spliceosomal UsnRNPs, the SMN function that is so far best understood. In this process seven so-called Sm-proteins assemble in a ring-like structure around a specific sequence element of the UsnRNA, termed "Sm-site". This reaction is promoted by a macromolecular complex comprising the SMN protein. This so-called SMN-complex binds to the Sm-proteins and transfers them onto the UsnRNA. The SMN-complex is necessary and sufficient for this reaction but it has been shown, that a second complex including the protein arginine methyl transferase PRMT5 supports this process. This so-called PRMT5-complex introduces symmetrical dimethylarginines (sDMA) into some of the Sm-

proteins thereby enhancing their affinity for the SMN-complex.

In this study it was investigated whether the deficiency of SMN results in decreased UsnRNP assembly *in vivo*. For this aim an experimental model for SMA was established in HeLa cells. By RNA interference the SMN expression was reduced to levels found in fibroblasts of SMA patients. Indeed these cells showed a strongly reduced UsnRNP assembly *in vitro* (in cellular extracts) and *in vivo*. A second model system for SMA was established in the zebrafish *Danio rerio* to investigate whether the impaired UsnRNP assembly may be the cause for the degeneration of motor neurons. The SMN levels in zebrafish embryos were reduced by the injection of antisense-Morpholinos. SMN-deficient animals exhibited severe developmental defects and degenerations of the axons of α -motor neurons, reflecting a phenotype similar to that of SMA. The same effects were observed in animals that have been injected with Morpholinos against Gemin2 and pICln, two other essential factors of the UsnRNP assembly pathway. These results indicated that the degeneration of motor neurons was caused by the impaired UsnRNP assembly rather than the loss of a putative motor neuron specific function of SMN. Indeed, motor neuron defects in SMN- and Gemin2-deficient embryos could be prevented upon the coinjection of isolated native UsnRNPs. This was the first time that a direct link between the function of SMN in the UsnRNP assembly and the degeneration of motor axons has been shown.

To gain a better insight into the molecular mechanisms of the UsnRNP assembly, experiments were performed concerning the basic principles of specificity in the assembly of Sm-proteins onto the UsnRNAs. These experiments revealed that under non-competitive conditions (without competitor-tRNA) isolated Sm-proteins bind unspecifically to non-snRNAs. In contrast, isolated SMN-complexes from HeLa cells transferred the Sm-proteins exclusively only onto an intact UsnRNA. Thus the SMN-complex ensures the fidelity of the UsnRNP assembly reaction. Further investigations showed that this specificity is based on distinct motifs of the substrate RNA. By the use of U1snRNA deletion mutants the minimal features for the assembly with Sm-proteins were defined to a U-rich sequence (Sm-site) followed by a 3'-terminal stem-loop. Both motifs are present in all UsnRNAs that are assembled with Sm-proteins.

Additionally it was shown, that pICln, a component of the PRMT5-complex, can prevent unspecific aggregations of Sm-proteins and possibly functions as storage pool for Sm-proteins. These results suggest that the interplay of the various assembly factors prevents the unspecific aggregation of substrates and ensures the fidelity of UsnRNP biogenesis.

4. Einleitung

4.1 Das Krankheitsbild der Spinalen Muskelatrophie

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine neurodegenerative, autosomal rezessiv vererbte Krankheit. Sie ist durch den Untergang von α -Motoneuronen in den anterioren Hörnern (Vorderhornzellen) der grauen Substanz des Rückenmarks gekennzeichnet. Dies führt zu einer unzureichenden Innervierung der Skelettmuskulatur und einer progressiven Paralyse von Rumpf und Gliedmaßen. Die SMA umfasst klinisch und genetisch heterogene Krankheitsbilder, wobei die proximale SMA im Kindes- und Jugendalter mit 80% bis 90% die häufigste Form darstellt. Mit einer Inzidenz von etwa einem Fall unter 6000 Neugeborenen ist sie eine der häufigsten genetisch bedingten Todesursachen bei Kindern. Daneben kommen verschiedene weitere Formen wie die adulte SMA, die distale SMA oder SMA mit respiratorischer Insuffizienz (SMARD) vor, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Die proximale SMA ist durch die Atrophie vor allem der rumpfnahen Muskulatur gekennzeichnet. Bei Patienten mit schweren Verlaufsformen ist zusätzlich auch die distale Muskulatur zunehmend betroffen. Die proximale SMA wird je nach Manifestation und Verlauf in drei Typen unterteilt. Patienten mit Typ I-SMA (Werdnig-Hoffmann-Krankheit) leiden bereits in den ersten Lebensmonaten unter zunehmender Muskelschwäche und sind unfähig zu sitzen oder zu stehen. Patienten mit akutem Typ Ia versterben meist innerhalb der ersten zwei Lebensjahre, Patienten mit subakutem Typ Ib können ein Alter von bis zu 20 Jahren erreichen. Bei Typ II-SMA tritt die Muskelschwäche später, aber noch vor dem 18 Lebensmonat auf. Diese Patienten können frei sitzen, aber nicht ohne Hilfe gehen und werden 2,5 Jahre bis 30 Jahre alt. Patienten mit Typ III-SMA (Kugelberg-Wielander-Krankheit) zeigen frühestens nach dem zweiten Lebensjahr Anzeichen von Muskelschwäche. Die Betroffenen sind eingeschränkt zum Sitzen, Stehen und Laufen befähigt. Nur Typ III-Patienten können das Erwachsenenalter erreichen, haben jedoch teilweise eine

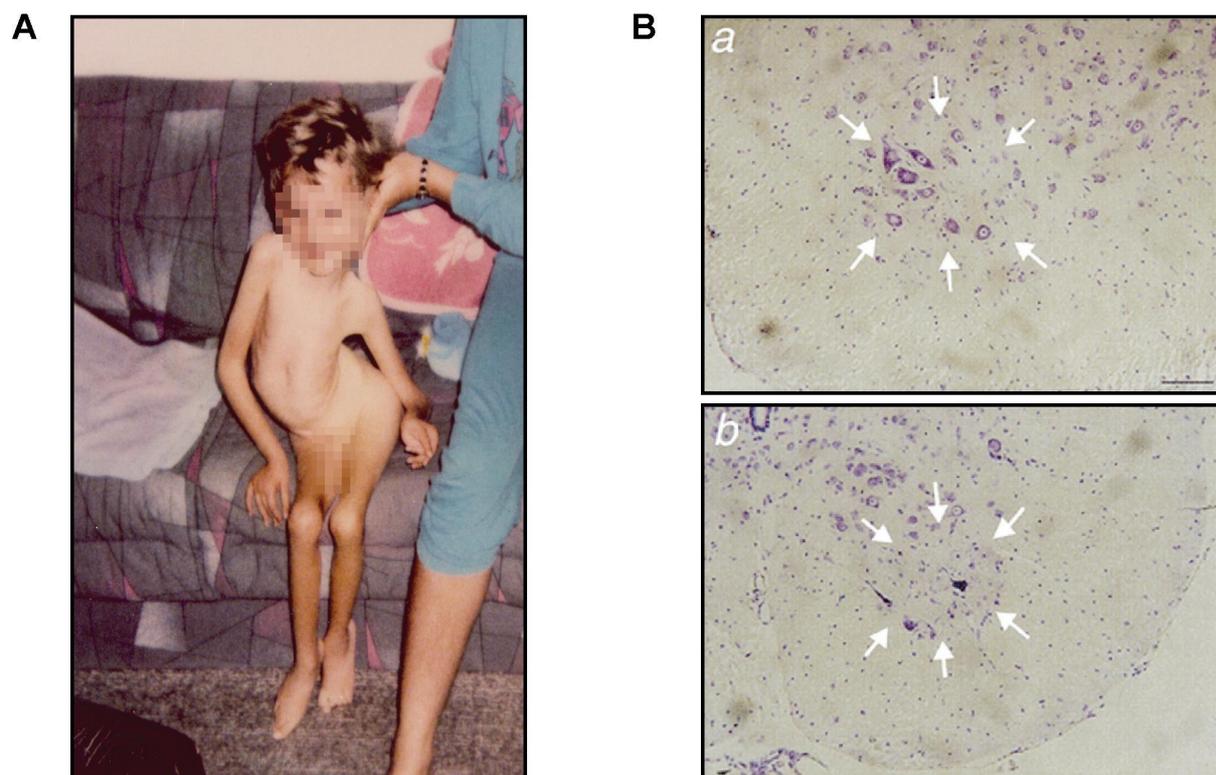


Abbildung 1: (A) Patient mit der subakuten Verlaufsform der SMA vom Typ Ib im Alter von 7 Jahren. Deutlich ist die Atrophie der proximalen, aber auch der distalen Muskulatur zu erkennen. (B) Nissl-Färbung der Motoneuronen in Paraffinschnitten durch das Rückenmark von SMN+/+ (a) und SMN+/- Mäusen (b); +/+ = Wildtyp, +/- = heterozygote Deletion des SMN-Gens. SMN+/- Mäuse besitzen deutlich weniger und kleinere Motoneuronen als Wildtyp-Mäuse; aus (Jablonka et al., 2000).

verkürzte Lebenserwartung (4. bis 6. Dekade). Die häufigste Todesursache bei Spinaler Muskelatrophie sind durch Ateminsuffizienz begünstigte opportunistische Atemwegsinfektionen wie z.B. Lungenentzündungen.

4.2 Die Genetik der Spinalen Muskelatrophie

1995 wurde das "Krankheitsgen" der Spinalen Muskelatrophie identifiziert und aufgrund des verursachten Phänotyps "Survival Motor Neuron" (SMN) genannt (Lefebvre et al., 1995). Es ist in zwei invertierten Kopien (der telomeren *SMN1*-Kopie und der centromeren *SMN2*-Kopie) in einem 500 Kilobasen-Bereich auf Chromosomenabschnitt 5q13 lokalisiert (Lefebvre et al., 1995). Trotz der verschiedenen Typen der Erkrankung liegt bei über 98% aller SMA-Patienten eine

Mutation oder Deletion der *SMN1*-Kopie vor. Obwohl beide *SMN*-Gene nahezu identisch sind, wird von *SMN2* nur etwa 20% funktionelles SMN-Protein der vollen Länge produziert. Der Austausch eines Nukleotids in Position 280 von C nach T führt zu einem ineffizienten Spleißen des Exons 7 in der *SMN2*-messengerRNA (Cartegni and Krainer, 2002; Kashima and Manley, 2003; Lorson and Androphy, 2000; Lorson et al., 1999). Das durch diese mRNA kodierte SMN-Protein ($SMN\Delta 7$) ist nicht funktionell und wird zügig abgebaut (Lorson and Androphy, 2000). Bei gesunden Menschen stammt daher der Hauptanteil aktiven SMN-Proteins von der *SMN1*-Kopie. Bei Patienten mit einer homozygoten Mutation des *SMN1*-Gens kommt es daher zu einem Mangel an funktionellem SMN-Protein, da *SMN2* diesen Ausfall nicht voll kompensieren kann (siehe Abbildung 2).

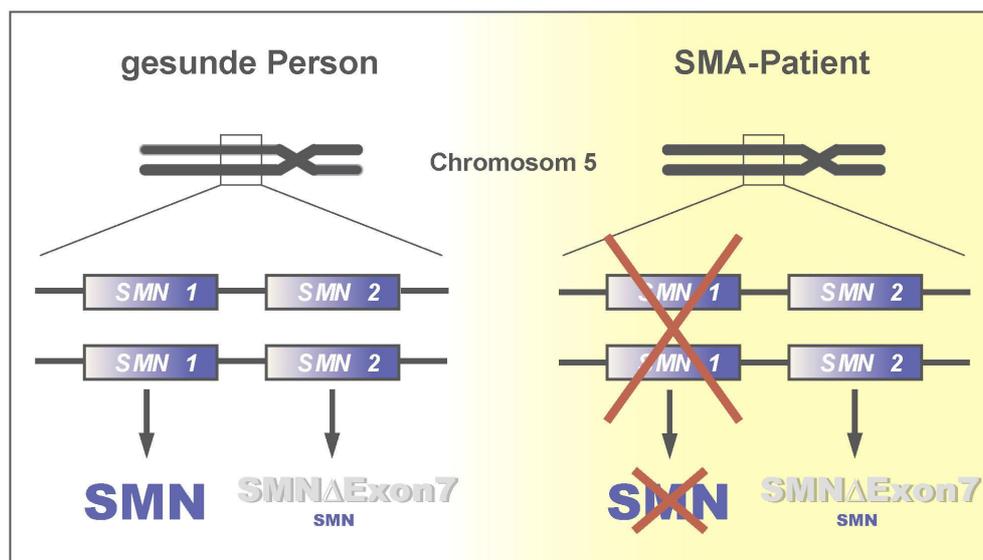


Abbildung 2: Der Ausfall des *SMN1*-Gens führt zu einer stark reduzierten Menge an funktionellem SMN-Protein.

Interessanterweise findet man bei SMA-Patienten mit milderem Krankheitsverlauf häufig eine oder mehrere Duplikationen des *SMN2*-Gens. Dies lässt auf einen Gendosis-Effekt schließen, d.h. der Schweregrad der Krankheit korreliert direkt mit der Verfügbarkeit an aktivem SMN-Protein (Lefebvre et al., 1997). Fälle, in denen beide Kopien des *SMN*-Gens defekt sind, wurden bisher nie berichtet und die homozygote Deletion von *SMN* in Mäusen (Mäuse besitzen nur eine *SMN*-Kopie, die

dem *SMN1*-Gen des Menschen entspricht) führt zum frühen embryonalen Tod (Schrank et al., 1997). Diese Befunde zeigten, dass es sich bei *SMN* um ein essentielles Gen handelt.

4.3 Das Survival Motor Neuron Protein

Das *SMN1*-Gen kodiert für ein 38 Kilodalton großes Protein und wird in nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert (Lefebvre et al., 1995). Innerhalb der Zelle ist das SMN-Protein hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, aber auch stark konzentriert in distinkten Strukturen im Zellkern zu finden. Da diese Strukturen meist in unmittelbarer Nähe von Cajal-Körpern liegen oder sogar komplett mit ihnen überlappen, werden sie auch „Gemini of Cajal bodies“, kurz Gems genannt (Liu and Dreyfuss, 1996). SMN besitzt eine phylogenetisch stark konservierte Domäne, die sogenannte Tudor-Domäne. Diese kommt typischerweise in RNA-prozessierenden Proteinen vor (Ponting, 1997) und Mutationen in dieser Domäne sind bei einigen SMA-Patienten zu finden (Buhler et al., 1999; Pellizzoni et al., 1999). SMN liegt in der Zelle nicht alleine, sondern als Teil eines makromolekularen Komplexes vor, dem sogenannten SMN-Komplex (eine nähere Beschreibung dieses Komplexes folgt in Kapitel 4.5).

In den letzten Jahren wurden viele Anstrengungen zur Untersuchung der zellulären Funktion des SMN-Proteins unternommen. Anhand diverser Studien wurde SMN mit der Biogenese von spleißosomalen und Histon-mRNA-prozessierenden UsnRNPs (Uridine-rich small nuclear RiboNucleoProtein-particles), aber auch mit Transkription, prä-mRNA-Spleißen und axonalem Transport in Verbindung gebracht. Während für die letztgenannten Funktionen bisher keine weitergehenden Beweise erbracht wurden, ist der Zusammenhang zwischen SMN und der UsnRNP-Synthese gut untersucht. Da sich die vorliegende Arbeit mit der zellulären Funktion von SMN in der UsnRNP-Biogenese beschäftigt, wird in dieser Einführung vor allem auf diesen Aspekt fokussiert. Dazu ist es sinnvoll, sich zunächst etwas näher mit dem Aufbau und der Entstehung der spleißosomalen UsnRNPs auseinanderzusetzen.

4.4 Architektur und Biogenese der U snRNPs

Die spleißosomalen UsnRNPs (U1, U2, U4/U6 und U5snRNP) sind abundante RNA-Protein Komplexe, die in den Kernen aller eukaryotischer Zellen zu finden sind. Sie binden gemeinsam mit vielen anderen Faktoren an Vorläufer-mRNAs (prä-mRNAs) und bilden dort das Spleißosom, welches die Spleißreaktion katalysiert. Jedes U snRNP besteht aus einer (U1, U2 und U5) oder zwei (U4 und U6) snRNAs, einem Set von sieben Sm-Proteinen (B/B', D1, D2, D3, E, F und G) und weiteren, für jedes Partikel spezifische, Faktoren (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4) (Will and Luhrmann, 2001).

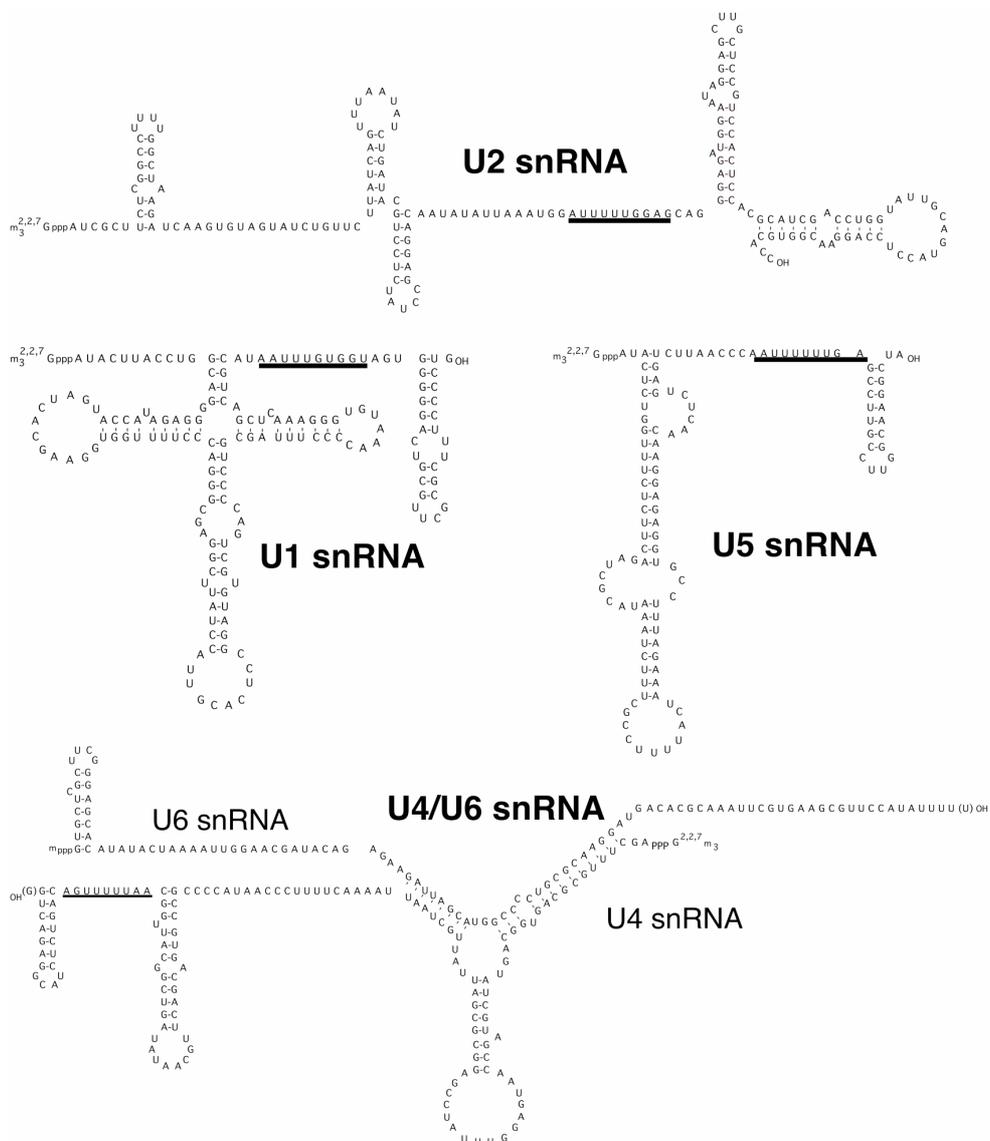


Abbildung 3: Sekundärstruktur der spleißosomalen U snRNAs (nach Will and Luhrmann, 2001).

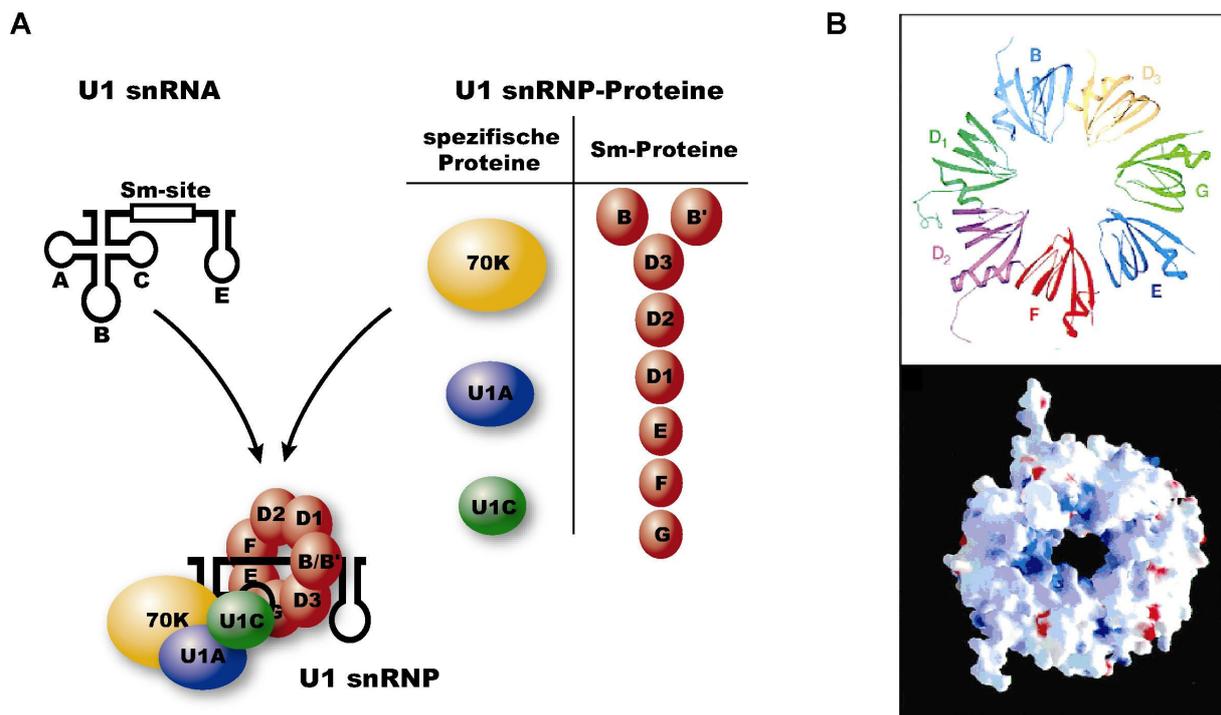


Abbildung 4: (A) Aufbau eines U snRNPs am Beispiel des U1 snRNPs: 7 Sm-Proteine bilden einen hexameren Ring um die Sm-site der U snRNA; zusätzlich binden Partikel-spezifische Proteine (hier 70K, U1A, U1C). (B) Vorgeschlagene Struktur des Sm-cores, erstellt anhand der Kristallstrukturen der Heterooligomere SmB/D3 und SmD1/D2 (aus Kambach et al., 1999))

Die Biogenese der UsnRNPs erfolgt hauptsächlich im Cytoplasma (siehe Abbildung 5). Zunächst werden die neu transkribierten snRNAs U1, U2, U4 und U5 im Kern mit einer 7-Methylguanosen(m^7G)-Kappe versehen, bevor sie über den energieabhängigen CRM1/PHAX-vermittelten Exportweg aus dem Zellkern in das Cytoplasma geschleust werden (Ohno et al., 2000). Die dort synthetisierten Sm-Proteine binden dann an ein konserviertes Sequenzelement (PuAU₄₋₆GPu) der UsnRNAs, die sogenannte „Sm-site“ (Branlant et al., 1982). Sie bilden um die Sm-site eine äußerst stabile Ringstruktur, die auch „Sm-core“ genannt wird und allen UsnRNPs, mit Ausnahme von U6, gemein ist (Abbildung 5 B). Zusätzlich binden spezifische Proteine an die UsnRNAs, wobei nicht geklärt ist, zu welchem Zeitpunkt in der Biogenese dies geschieht. Die Sm-core Domäne des reifen U snRNPs bietet eine Bindungsplattform für die RNA-Methyltransferase PIMT (TGS1 in Hefe), welche die m^7G -Kappe der snRNA zu einer 2,2,7-Trimethylguanosen(m_3G)-Kappe

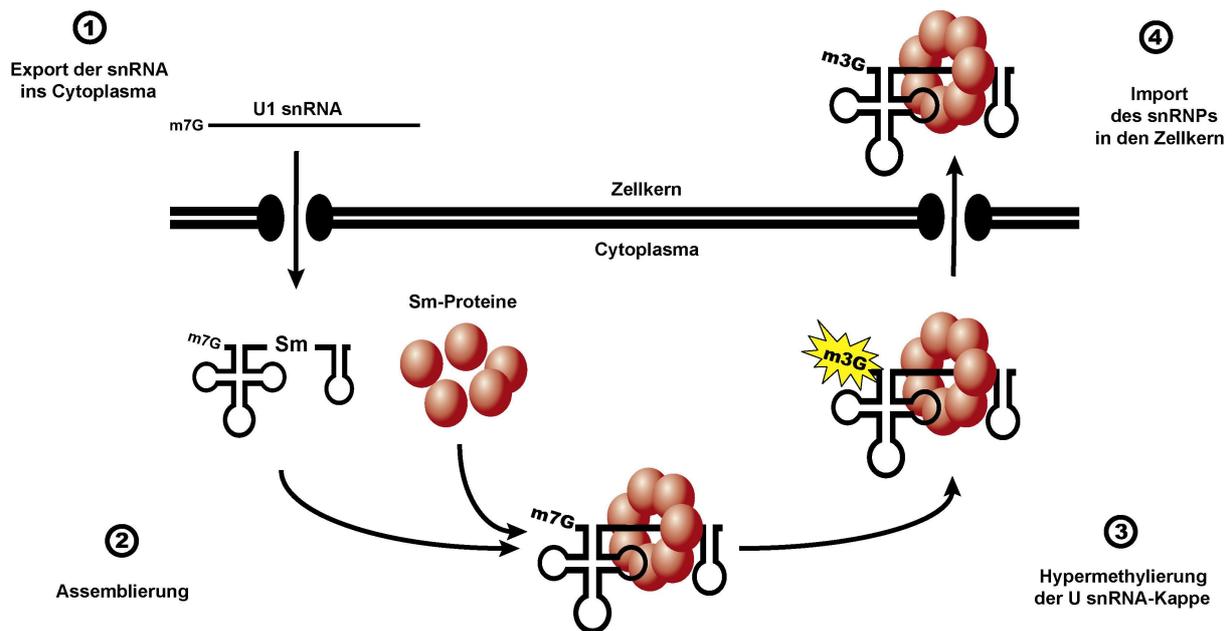


Abbildung 5: Die Biogenese der spleißosomalen U snRNPs

hypermethyliert (Mouaikel et al., 2002). Die reifen UsnRNPs werden daraufhin über den energieunabhängigen Snurportin/Importin- β -Weg in den Zellkern importiert, wo sie ihre Funktion im Spleißen erfüllen (Huber et al., 2002; Narayanan et al., 2002).

4.5 Der SMN-Komplex und seine Rolle in der UsnRNP-Biogenese

Zunächst ging man davon aus, dass sich UsnRNPs ohne fremde Hilfe zusammenlagern können, da gereinigte UsnRNAs *in vitro* spontan mit isolierten UsnRNP-Proteinen assoziieren (Raker et al., 1999; Sumpter et al., 1992). Experimente in *X. laevis* Oocyten lieferten jedoch erste Hinweise dafür, dass für die Zusammenlagerung der UsnRNPs *in vivo* weitere Faktoren notwendig sind. So blockierte die Injektion eines Antikörpers gegen Gemin2 (damals noch als SMN interacting protein 1/SIP1 bezeichnet), dem bis dahin einzigen identifizierten Interaktor von SMN, die Zusammenlagerung von Sm-Proteinen mit UsnRNAs (Fischer et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass SMN in *X. laevis* sowohl

mit UsnRNAs als auch mit Sm-Proteinen interagiert (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997). Dies waren die ersten experimentellen Hinweise, dass zwischen der Biogenese von U snRNPs und SMN eine funktionelle Verbindung besteht.

Die Entwicklung eines zellfreien experimentellen Systems in *X. laevis* Eiextrakt trug schließlich entscheidend zur Aufklärung des Zusammenlagerungs-Prozesses der U snRNPs bei (Meister et al., 2001a). Bei diesem Zusammenlagerungs-Assay wird eine radioaktiv markierte RNA in Zellextrakt inkubiert und die entstandenen Ribonukleoprotein-Komplexe in nativen Polyacrylamid-Gelen untersucht. Mit diesem System ließ sich zeigen, dass die Bildung eines Sm-cores in *X. laevis* Eiextrakt in Abhängigkeit von ATP stattfindet und komplett blockiert wird, wenn man SMN und Gemin2 aus den Extrakten entfernt.

Biochemische Studien in HeLa-Zellen brachten zutage, dass SMN Teil eines makromolekularen Komplexes von etwa 1 Megadalton und 18 Komponenten ist (Meister et al., 2000; Pellizzoni et al., 1999). Dieser sogenannte SMN-Komplex ist notwendig und ausreichend, um den Transfer der Sm-Proteine auf eine UsnRNA zu gewährleisten (Meister und Fischer, 2002). Die Hauptkomponenten dieses SMN-Komplexes werden häufig als Gemin bezeichnet (Gemin2 bis 7), da sie mit SMN in den Gemin kolokalisieren. Mit Ausnahme der putativen RNA-Helikase Gemin3 zeigt keines der Proteine signifikante Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen. Darüberhinaus bindet der Komplex transient an eine ganze Reihe weiterer Faktoren, darunter sämtliche Sm-Proteine (B/B', D1, D2, D3, E, F, G) und spleißosomale UsnRNAs (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997). Eine detaillierte Liste aller bislang identifizierten Interaktoren ist in (Meister et al., 2002) zu finden.

4.6 pICln und die Entdeckung des PRMT5-Komplexes

Interessanterweise unterliegt der SMN-Komplex einer strengen Kontrolle durch einen weiteren makromolekularen Protein-Komplex. Dieser sogenannte PRMT5-Komplex (Protein Arginin(R) Methyl Transferase 5-Komplex, oder auch „Methylosome“ genannt) bindet ebenfalls Sm-Proteine, methyliert sie und transferiert sie dann auf den SMN-Komplex (Friesen et al., 2001b; Meister et al., 2001b). Entdeckt wurde der

PRMT5-Komplex bei der näheren Analyse eines Proteins namens pICln. pICln wurde ursprünglich als nukleotid-sensitiver Faktor eines Chlorid-Kanals klassifiziert (Krapivinsky et al., 1994). Überraschenderweise zeigte die Immunpräzipitation von pICln aus HeLa Zellextrakt, dass das Protein integraler Bestandteil eines Komplexes mit Sm-Proteinen sowie zwei weiteren Faktoren, WD45 und PRMT5, ist (Friesen et al., 2001b; Meister et al., 2001b; Pu et al., 1999). WD45, ein Protein unbekannter Funktion mit einer Größe von etwa 45 Kilodalton, zeichnet sich durch eine Vielzahl sogenannter WD-Wiederholungen aus. Diese Motive spielen häufig eine Rolle als Protein-Interaktionsflächen. PRMT5 ist ein 72 Kilodalton großes Protein und zeigt starke Homologien zur Klasse der Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMTs). Die meisten PRMTs gehören zum Typ I, welche die Bildung von asymmetrischen Dimethylargininen (asDMAs) in Proteinen mit Arg-Gly-Gly-Motiven katalysieren (McBride and Silver, 2001). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass auch PRMT5 als Methyltransferase fungiert. Allerdings katalysiert es im Gegensatz zu den Typ I-Methyltransferasen die Umwandlung von Argininen in symmetrische Dimethylarginine (sDMAs), und gehört somit zu den Typ II-Methyltransferasen (Branscombe et al., 2001; Friesen et al., 2001b; Meister et al., 2001b). Diese Entdeckung war vor allem deshalb interessant, weil die Arg-Gly-reichen Sequenzen im Carboxy-Terminus der Sm-Proteine B/B', D1 und D3 symmetrische Dimethylarginine enthalten (Brahms et al., 2000).

Tatsächlich konnte in unabhängigen Studien nachgewiesen werden, dass PRMT5 die Sm-Proteine B/B', D1 und D3 methyliert (Friesen et al., 2001b; Meister et al., 2001b). *In vitro* Bindungsstudien haben gezeigt, dass die sDMA-Modifizierung die Affinität der Sm-Proteine zu SMN um ein Vielfaches erhöht (Brahms et al., 2001; Friesen et al., 2001a). Vermutlich aktiviert der PRMT5-Komplex die Sm-Proteine durch Methylierung für den darauffolgenden Transfer auf den SMN-Komplex. Die Übergabe erfolgt wahrscheinlich durch direkte Interaktion zwischen dem PRMT5- und dem SMN-Komplex, da beide aus cytosolischen HeLa-Extrakten kopräzipitiert werden können (Meister und Fischer, 2002). Ein solcher isolierter SMN-PRMT5-Komplex führt die Zusammenlagerung von U snRNPs interessanterweise ATP-abhängig und deutlich effizienter als der SMN-Komplex alleine aus. Der PRMT5-

Komplex methyliert also nicht nur die Sm-Proteine, sondern stimuliert auch die Aktivität des SMN-Komplexes in der Assemblierungsreaktion.

4.7 pICln dient vermutlich als Speicher für Sm-Proteine

Untersuchungen von Pu et al. (1999) haben gezeigt, dass in Säuger-Zellen der größte Teil der Sm-Proteine mit pICln assoziiert vorliegt. Darüberhinaus stellten die Autoren fest, dass die Injektion von pICln in *Xenopus* Oocyten stark mit der Biogenese von U snRNPs interferiert (Pu et al., 1999). pICln bindet an das stark konservierte „Sm-Motiv“, welches den Sm-Proteinen als Interaktionsfläche untereinander dient (siehe Abbildung 4 B), und verhindert so die Bildung eines Sm-cores. Für pICln wurde daher eine Funktion als Speicher für Sm-Proteine vorgeschlagen, da Oocyten einen Vorrat an Sm-Proteinen für spätere Entwicklungsstadien zurückhalten müssen. pICln oder der PRMT5-Komplex würden demnach die Sm-Proteine binden und solange speichern, bis sie für die UsnRNP-Synthese benötigt werden. Diese Hypothese erscheint aus einem weiteren Grund interessant. Isolierte Sm-Proteine tendieren *in vitro* zur Selbstaggregation und binden zudem spontan an snRNAs (Raker et al., 1999). Eine Sequestrierung durch pICln könnte sowohl die unerwünschte Aggregation der Sm-Proteine untereinander als auch die mit RNAs verhindern.

4.8 Ein Modell für den assistierten Zusammenbau von U snRNPs

Auf der Basis der oben beschriebenen Daten lässt sich ein Modell für den Assemblierungsweg der UsnRNPs postulieren (siehe Abbildung 6 und (Meister und Fischer, 2002). In diesem Modell werden die Sm-Proteine nach ihrer Translation vom PRMT5-Komplex gebunden. PRMT5, die Methyltransferase des PRMT5-Komplexes, führt sDMA-Modifikationen in die Sm-Proteine B/B', D1 und D3 ein. Daraufhin lagert sich der PRMT5-Komplex an den SMN-Komplex. Die Sm-Proteine werden zuerst auf den SMN-Komplex transferiert und von diesem weiter auf die UsnRNA übertragen.

Schließlich wird das reife snRNP entlassen und in den Zellkern transportiert, während SMN- und PRMT5-Komplex wieder dissoziieren, um in den nächsten Assemblierungszyklus eintreten zu können.

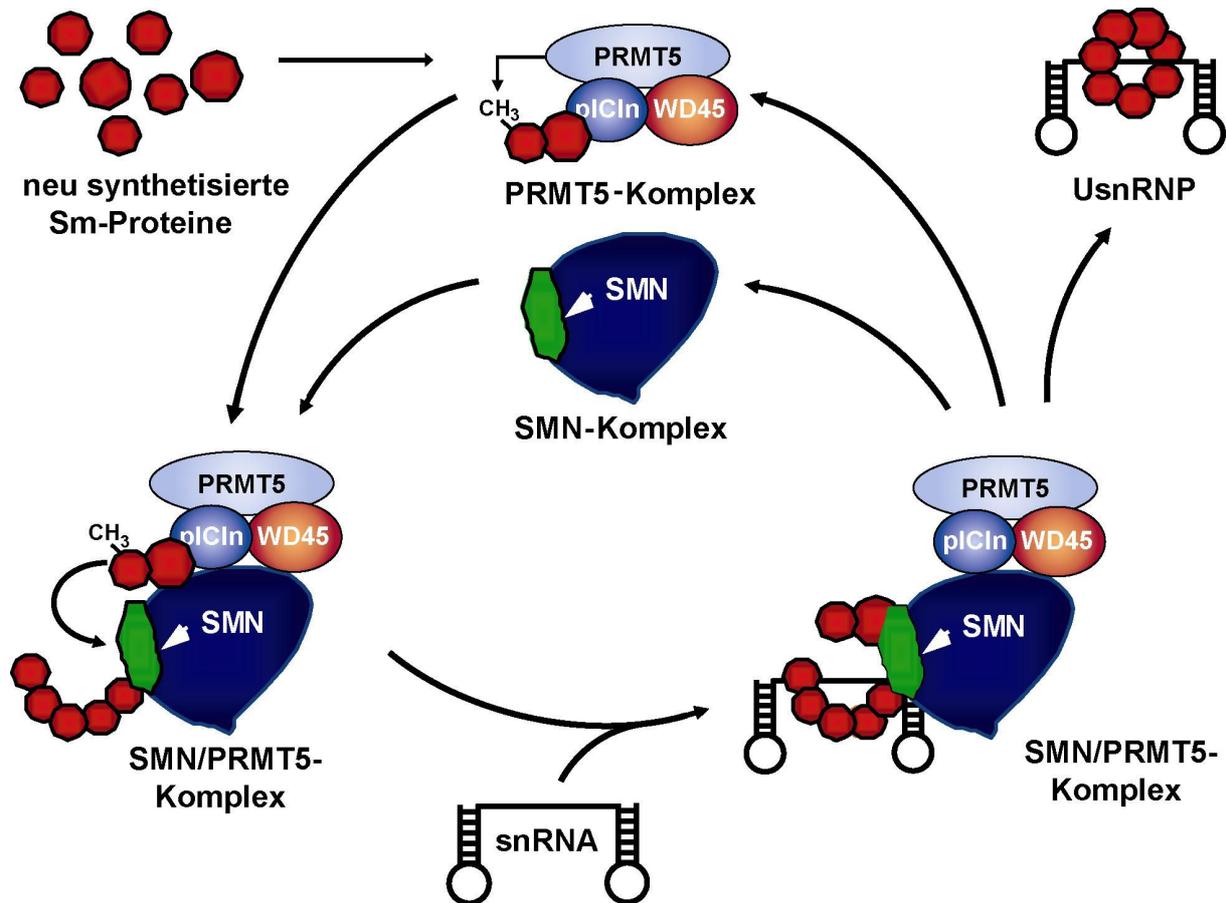


Abbildung 6: Modell für die assistierte Zusammenlagerung von U snRNPs (leicht modifiziert übernommen aus (Meister und Fischer, 2002))

Da sich auch einige UsnRNP spezifische Proteine im SMN-Komplex finden, ist nicht auszuschließen, dass der SMN-Komplex auch die Übertragung dieser Proteine auf die snRNA katalysiert, jedoch gibt es hierzu bisher keine gesicherten Daten.

Die Regulation dieses komplexen Systems ist bisher nur in Ansätzen geklärt. Grimmer et al. (2005) konnten zeigen, dass sowohl SMN als auch pICln *in vivo* phosphoryliert werden. SMN kommt in zwei unterschiedlichen

Phosphorylierungszuständen vor, im Cytoplasma ist es stark, im Zellkern dagegen kaum phosphoryliert. Da nur der cytoplasmatische Komplex effizient die Zusammenlagerung von UsnRNPs katalysiert, könnte die Phosphorylierung ein wichtiger Aktivator des SMN-Komplexes sein.

Ungeklärt ist ebenfalls, wie der Transfer der Sm-Proteine auf die RNA genau vonstatten geht. Vorstellbar sind dabei zwei unterschiedliche Mechanismen. Im ersten Fall würde der Ring der Sm-Proteine bereits ohne die snRNA am SMN-Komplex geschlossen und die RNA durch den Kanal des Sm-Ringes gefädelt. Aufgrund der Größe und der Eigenschaften von RNA-Helices würde dies eine teilweise Auflösung der Sekundärstruktur der RNA voraussetzen. In einem zweiten Szenario würden alle Sm-Proteine, vermutlich in Form von Hetero-Oligomeren (B/B'-D3, D1-D2, E-F-G), in einer definierten offenen Konfiguration am SMN-Komplex gehalten. Auf das Binden der snRNA hin würde der Komplex strukturelle Veränderungen durchlaufen und den Sm-Ring um die Sm-site der RNA schließen. Interessanterweise ist die putative DEAD-box RNA-Helikase Gemin3 integraler Bestandteil und das einzige putative Enzym des SMN-Komplexes. Bei beiden Szenarien könnte diese Gemin3 eine zentrale Rolle spielen, im ersten Fall als RNA-Doppelstrang-entwindende Helikase, im zweiten Fall als RNPase zur Katalyse der RNA-vermittelten Konformationsänderungen von SMN-Komplex und Sm-Proteinen.

4.9 Der SMN-Komplex vermittelt den Zusammenbau verschiedener RNPs

Der SMN-Komplex bewerkstelligt nicht nur den Zusammenbau der spleißosomalen UsnRNPs mit klassischen Sm-Proteinen (U1, U2, U4 und U5snRNPs). Neuere Studien haben ergeben, dass ein spezialisierter SMN-Komplex auch das U7snRNP assembliert. Dieses Partikel katalysiert die 3'-Endprozessierung von Histon-mRNAs und enthält neben den fünf Sm-Proteinen B/B', D3, E, F, G die zwei Like-Sm-Proteine LSm10 und LSm11, die hier SmD1 und SmD2 ersetzen (Pillai et al., 2001). Die sieben Proteine bilden ebenfalls einen heptameren Ring um die spezielle Sm-site der U7snRNA und die Reaktion wird vom SMN/PRMT5-Komplex ausgeführt (Pillai et

al., 2003). Auch Viren wie das Herpesvirus saimiri bedienen sich offensichtlich des SMN-Komplexes der Wirtszelle für die Assemblierung eines Sm-cores an ihren kleinen RNAs (Golembe et al., 2005). Noch offen ist die Frage, ob der SMN-Komplex die Zusammenlagerung des U6snRNPs vermittelt, denn das U6snRNP besitzt einem Ring aus sieben LSm2- bis LSm8-Proteinen, von denen LSm4 symmetrisch dimethyliert wird und an SMN binden kann (Achsel et al., 1999; Friesen and Dreyfuss, 2000; Salgado-Garrido et al., 1999; Toro et al., 2001). SMN könnte ebenso an der Biogenese von snoRNPs (small nucleolar RNPs) beteiligt sein, denn es interagiert mit den nukleären Proteinen GAR1 und Fibrillarin (Jones et al., 2001; Pellizzoni et al., 2001). GAR1 ist eine Komponente der small nucleolar RNPs (snoRNPs) der H/ACA-Klasse, die für die Pseudouridinylierung von ribosomaler RNA (rRNA) und die prä-rRNA-Prozessierung zuständig sind. Fibrillarin ist Teil der C/D-Klasse snoRNPs, die an der Prozessierung und 2'-O-Methylierung von ribosomaler RNA (rRNA) beteiligt sind. Ob der SMN-Komplex tatsächlich die Assemblierung dieser oder auch weiterer nukleolärer RNPs katalysieren kann werden zukünftige Studien zeigen müssen.

4.10 Problemstellung und Konzeption

Einer der wichtigsten Aspekte in der Erforschung der Spinalen Muskelatrophie ist die Frage nach der kausalen Verbindung zwischen den zellulären Funktionen von SMN und der Entstehung von SMA. Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist die Biogenese der spleißosomalen UsnRNPs eine der Hauptfunktionen von SMN und muss daher besondere Beachtung bei der Suche nach den molekularen Ursachen der SMA finden. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob der Mangel von SMN zu einer reduzierten UsnRNP-Produktion *in vivo* führt und ob die Beeinträchtigung der UsnRNP-Biogenese für die Degeneration von Motoneuronen verantwortlich sein könnte.

Diese Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und anhand zweier experimenteller Strategien untersucht. Zunächst wurde mit Hilfe der RNA-Interferenz ein SMA-Modell in HeLa-Zellen etabliert. Anhand dessen konnte erforscht werden,

ob der Mangel von SMN zu einer reduzierten UsnRNP-Produktion *in vitro* und *in vivo* führt. Zur Klärung der zweiten Frage wurde mit Hilfe von Antisense-Morpholinos ein zweites Modell für SMA im Zebrafisch *Danio rerio* geschaffen. Dabei wurde auf die von McWhorter et al. (2003) beschriebene Beobachtung aufgebaut, dass die Reduktion der SMN-Menge in Zebrafisch-Embryonen SMA-ähnliche Defekte der α -Motoneurone hervorruft. Sollte die Ursache für diesen Phänotyp in einer unzureichenden Produktion von UsnRNPs liegen, müssten sich zwei Postulate erfüllen lassen:

- 1) Die Motoneuron-Defekte treten nicht nur bei einem Mangel von SMN, sondern ebenso von jedem anderen essentiellen UsnRNP-Zusammenlagerungs-Faktor auf.
- 2) Die eingeschränkte UsnRNP-Produktion muss durch eine Supplementierung mit isolierten nativen UsnRNPs kompensiert werden können und die Degeneration von Motoneuronen in den betroffenen Fischen dadurch verhindert werden.

Um diese Postulate überprüfen zu können, wurden die Auswirkungen eines Morpholino-induzierten Mangels sowohl von SMN, als auch von Gemin2 und pICln in Zebrafisch-Embryonen analysiert. Darüberhinaus wurde in Koinjektionsstudien untersucht, ob isolierte native UsnRNPs die Zebrafisch-Embryonen mit SMN- und Gemin2-Mangel vor Motoneuron-Defekten bewahren kann.

Für die Grundlagenforschung sind zudem die molekularen Abläufe der UsnRNP-Biogenese von besonderem Interesse. Dabei stellt sich vor allem die Frage, wie Zellen die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung sicherstellen, da es eine ganze Fülle von zellulären RNAs mit Sm-site ähnlichen Sequenzen gibt. *In vivo* wird die Zusammenlagerung von snRNAs und Sm-Proteinen durch den SMN-Komplex vermittelt. Möglicherweise kann er als die ausführende Einheit auch die Spezifität der Reaktion sicherstellen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der SMN-Komplex Sm-Proteine spezifisch nur auf die relevanten Substrat-RNAs ausliefert. Ein eng damit verknüpfter Aspekt ist die Frage, auf welchen Merkmalen der Substrat-RNA eine solche Selektion beruhen könnte. In Zusammenlagerungs-

Assays wurden deshalb die minimal für eine Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen erforderlichen Sequenzabschnitte der U1snRNA bestimmt.

Ein weiterer interessanter Ausgangspunkt für die Erforschung der UsnRNP-Zusammenlagerung ist die putative RNA-Helikase Gemin3. Sie ist, nach bisherigen Erkenntnissen, das einzige Enzym des SMN-Komplexes. Da die UsnRNP-Zusammenlagerung ATP-abhängig abläuft ist es sehr wahrscheinlich, dass Gemin3 dabei eine aktive Rolle spielt. In Kapitel 4.8 wurden zwei mögliche Modelle angesprochen, wie der Transfer der Sm-Proteine auf die RNA durch Gemin3 katalysiert werden könnte. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Gemin3 im Rahmen des Zusammenlagerungsprozesses eine RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität zeigt. Einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis des Mechanismus des Sm-Protein-Transfers könnte darüberhinaus auch die dreidimensionale Struktur des SMN-Komplexes inklusive der gebundenen Sm-Proteine leisten. Darum wurde eine Aufreinigungsstrategie etabliert mit der sich der SMN-Komplex nativ aus HeLa-Zellen isolieren lässt und in der Kryoelektronenmikroskopie abbilden lässt.

Schließlich sollte auch die Rolle von pICln in der Speicherung von Sm-Proteinen untersucht werden. Da pICln die spontane Zusammenlagerung von Sm-cores verhindern kann und der größte Teil der Sm-Proteine an pICln gebunden vorliegt, entstand die Idee, dass pICln eine Art Chaperoning-Funktion speziell für Sm-Proteine ausübt, indem es deren unspezifische Aggregation unterbindet. Verschiedene Experimente dazu sollten zeigen, ob pICln tatsächlich die unspezifische Aggregation von Sm-Proteinen mit RNA oder untereinander verhindern und so zur Spezifität der UsnRNP-Biogenese beitragen kann.

5. Materialien

5.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Analyse-Qualität von den Firmen Biorad, Roche, Fluka, Gibco BRL, Merck, Roth und Sigma bezogen. Radiochemikalien stammten von der Firma Amersham-Pharmacia, Enzyme von den Firmen MBI, Promega und New England Biolabs.

5.2 Oligonukleotide

Für RNA-Interferenz-Experimente In HeLa-Zellen wurden folgende siRNAs verwendet:

SMN sense: 5'-CUU CGG GUA AAC CAA AAA C dTdT-3'

SMN antisense: 3'-dTdT GAA GCC CAU UUG GUU UUU G-5'

Für die Injektion in Zebrafisch-Embryonen wurden folgende Antisense-Morpholinos eingesetzt:

SMN: 5'-CGA CAT CTT CTG CAC CAT TGG C-3'

Gemin2: 5'-TCA ACT CCT CGG CGT CTG ACT TCA T-3'

pICln: 5'-GGT AAA CTC TTC AAC AGC ACC ATC C-3'

Standard Kontrolle: 5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'

5.3 Plasmide

Die folgende Tabelle zeigt die für rekombinante Proteinexpressionen in *E. coli* verwendeten Plasmide:

Protein	AS	Konstrukt	Plasmid	5´-/3´-RS	Mutation
SMN	1-160	GST-SMN-1/160	pGEX6P-1	EcoRI/XhoI	AS 1-160
		SMN-1/160-His	pET28a	EcoRI/XhoI	AS 1-160
Gemin3	1-824	GST-Gemin3	pGEX6P-1	Sall/NotI	WT
		His-gemin3	pET28a	Sall/NotI	WT
SmB/B´	1-231	pBlue-SmB	pBluescript II KS	EcoRI/HindIII	WT
SmD1	1-119	pBlue-SmD1	pBluescript II KS	EcoRI/Sall	WT
SmD2	1-118	pBlue-SmD2	pBluescript II KS	EcoRI/Sall	WT
SmD3	1-126	pBlue-SmD3	pBluescript II KS	EcoRI/Sall	WT
SmE	1-92	pBlue-SmE	pBluescript II KS	EcoRI/HindIII	WT
SmF	1-86	pBlue-SmF	pBluescript II KS	EcoRI/XhoI	WT
SmG	1-76	pBlue-SmG	pBluescript II KS	EcoRI/XhoI	WT
pICln	1-236	pICln-His	pET28a	EcoRI/XhoI	WT
		GST-pICln	pGex6P-1	EcoRI/XhoI	WT

AS: Aminosäure, RS: Restriktionsschnittstelle, WT: wild-typ

Für die in vitro Transkription von RNAs wurden folgende Plasmide eingesetzt:

RNA	Vektor	Promotor	Referenz
U1	pUC9	T7	(Zeller et al., 1984)
U1Δ5´	pUC9	T7	(Jarmolowski and Mattaj, 1993)
U1ΔA	pUC9	T7	(Hamm et al., 1987)
U1ΔB	pUC9	T7	(Hamm et al., 1987)
U1ΔC	pUC9	T7	(Hamm et al., 1987)
U1ΔABC	pUC9	T7	diese Arbeit
U1ΔE	pUC19	T7	(Jarmolowski and Mattaj, 1993)
U1mutSm	pUC9	T7	(Hamm et al., 1987)
U1mutE	pUC9	T7	diese Arbeit
U1-3	pUC9	T7	diese Arbeit

RNA	Vektor	Promotor	Referenz
U1-4	pUC9	T7	diese Arbeit
U1SmlI	SP64	SP6	(Sumpter et al., 1992)
U17	pUC19	T7	(Dragon et al., 2000)

5.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet :

Antikörper	Antigen	Herkunft	Referenz
999	Gst-pICln	Hase, polyklonal	(Meister et al., 2001b)
7B10	SMN1-20	Maus, monoklonal	(Meister et al., 2000)
Y12	SmB, D1 und D3	Maus, monoklonal	
492	SMN 1-20	Hase, polyklonal	diese Arbeit
α -Gemin2	His-Gemin2	Hase, polyklonal	diese Arbeit
H20	m ₃ /m'G	Maus, monoklonal	(Bringmann and Luhrmann, 1986)
MAN SMA7	SMN-Peptid	Maus, monoklonal	(Young et al., 2000)
α -znp1	znp1	Maus, monoklonal	(Melancon et al., 1997)
anti-His	poly-Histidin	Maus, monoklonal	Sigma

5.5 Organismen und Zelllinien

E. coli Stämme: BL-21(DE3), DH5 α

Zelllinie HeLa S3

SMA-Typ-I-Fibroblasten

Xenopus laevis Oocyten/Eier

XTC-Zellen (*Xenopus laevis* tissue culture)

5.6 Zellkulturmedien

Normalmedium für HeLa-Zellkultur:	500 ml DMEM (GIBCO-BRL)
	10% Fetal Calf Serum (GIBCO-BRL)
	1% 200 mM L-Glutamin (Sigma)
	1% Penicillin/Streptomycin (Sigma)
Hunger-Medium:	40 ml Medium (Nr. 11970, GIBCO-BRL)
	10% Foetales Kälberserum (GIBCO-BRL)
	1% 200 mM L-Glutamin (Sigma)
	1% Penicillin/Streptomycin
	560µl 2M HEPES-KOH, pH 7.4
„chase“-Medium:	40ml Medium (high glucose, GIBCO-BRL)
	10% Foetales Kälberserum (GIBCO-BRL)
	1% 200 mM L-Glutamin(Sigma)
	1% Penicillin/Streptomycin (Sigma)
	180µl Methionin (25 mg/ml)
	216µl Cystein (25 mg/ml)
Normalmedium für XTC-Zellkultur:	350 ml DMEM (GIBCO-BRL)
	150 ml ddH ₂ O
	10% Fetal Calf Serum (GIBCO-BRL)
	1% 200 mM L-Glutamin (Sigma)
	1% Penicillin/Streptomycin (Sigma)

5.7 Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung	1,25g Coomassie Brillant Blau
	225ml MeOH
	225ml H ₂ O
	50ml Essigsäure (100%)

Coomassie-Entfärber	Methanol Essigsäure
DYT-Medium	1,6% Trypton (w/v) 1% Hefeextrakt (w/v) 0,5% NaCl (w/v)
ECL-Lösungen (Entwicklung von Western-Blots)	Lösung 1: 6,8mM Coumarsäure in DMSO Lösung 2: 1,25mM Luminol 100mM Tris pH 8,5 Lösung 3: 30% H ₂ O ₂
GST-Aufschlusspuffer	300mM NaCl 50mM Tris-HCl pH7,5 5mM EDTA 5mM EGTA 0,01% NP-40 1mM DTT 1mM PMSF 20mg/l Aprotinin AP 20mg/l Leupeptin/Pepstatin 0,1mM AEBSF PF
His-Aufschlusspuffer	300mM NaCl 50mM Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄), pH 8,0 0,01% Igepal 10µl/50ml β-Mercaptoethanol 1mM PMSF 20mg/l Aprotinin 20mg/l Leupeptin/Pepstatin 0,1mM AEBSF PF

PBS (phosphate buffered saline)	130mM NaCl 77.4ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22.6ml 1M NaH ₂ PO ₄ ad 1l ddH ₂ O
PBS-T:	1xPBS 0,05% Tween 20
Proteinprobenpuffer	100mM Tris/HCl pH 6.8 2.5mM EDTA 0.1% Bromphenolblau 50% Glycerin 100mM DTE (Dithioerythrol)
Proteinprobenpuffer mit Harnstoff (für präzipitierte Proteine)	8M Urea 5%SDS 200 mM Tris pH 6,8 1 mM EDTA 1 Pipettenspitze Bromphenolblau 1,5 % DTT frisch zugeben
RIPA-Puffer	150 mM KCl 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 2 mM EDTA 0.5mM DTT 0.1% Nonidet P40 1ml/100ml Aprotinin (1mg/ml)
RIPA-Puffer high salt	wie RIPA-Puffer, jedoch 300 mM KCl

RNA-Elutionspuffer	300mM Natriumacetat 2mM EDTA 0,1%SDS
RNA-Polyacrylamid-Gele (denaturierend)	5% Polyacrylamid (Rotiphorese 40) 8M Harnstoff 0,5x TBE 500µl/100ml APS 50µl/100ml TEMED
RNA-Polyacrylamid-Gele (nativ)	6%Polyacrylamid (80:1) 4%Glycerol 0,5x TBE 500µl/100ml APS 50µl/100ml TEMED
RNA-Probenpuffer (denaturierend)	90% (v/v) Formamid 0,025% (w/v) Xylencyanol 0,025% Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer (nativ)	16% (v/v) Glyzerin 10 mg/ml Heparin 0,025% (w/v) Xylencyanol 0,025% (w/v) Bromphenolblau
Roeder A-Puffer	10 mM KCl 10 mM Hepes/KOH (pH 7.9) 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT 0,5 mM PMSF

Roeder C-Puffer	420 mM KCl 10 mM Hepes/KOH (pH 7.9) 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT 0,2 mM EDTA 5 % (v/v) Glyzerin 0,5 mM PMSF
Roeder D-Puffer	100 mM KCl 20 mM Hepes/KOH (pH 7.9) 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT 20 % (v/v) Glyzerin 0,5 mM PMSF
SDS-Polyacrylamid-Gele 5%ige Sammelgellösung	1.5ml Acrylamid-Lsg. (Vernetzungsgrad: 37.5:1) 1.5ml 0,5M Tris/HCl pH 6.8 (Sammelgelpuffer) 6.8ml ddH ₂ O 50µl 20% SDS 5µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-Diamin) 100µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)
12%ige Trenngellösung:	4ml Acrylamid-Lsg. (Vernetzungsgrad: 37.5:1) 2ml 2M Tris/HCl pH 8 (Trenngelpuffer) 3.8ml ddH ₂ O 50µl 20% SDS 4µl TEMED 100µl 10% APS

T4-RNA-Ligase Puffer, 5x	250mM Hepes KOH pH 7,9 90mM MgCl ₂ 15mM DTE 50µg/ml BSA
1x TBE-Puffer:	89mM Tris/HCl pH 8.3 89mM Borsäure
TBT, 10x	87,6g/l NaCl 7,25g/l Tris-base 30g/l Tris-HCl 50ml/l Tween 20
TCA-Waschpuffer	70% Aceton 20% Ethanol 7,5% H ₂ O 2,5% 2M Tris HCl 8,0 wenig Bromphenolblau
Transferpuffer für Western Blot (Towbin-buffer)	25mM Tris 192mM Glycin 0,1%SDS
Zebrafisch-Auflösungspuffer	1x RIPA high salt 0,5% NP-40 1,5mM DTT 1:1000 Proteaseinhibitoren

6. Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Sämtliche Reaktionen wurden mit Taq-Polymerase von MBI Fermentas nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Reaktionsansatz

2,5µl	Polymerase-Puffer
2,5mM	2µl dNTPs
10pmol	Primer 1
10pmol	Primer 2
1unit	DNA-Polymerase
ad 25µl	H ₂ O

Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur beider DNA-Oligonukleotide (Primer), alle anderen Parameter nach den allgemeinen Standards gewählt (95°C Denaturierung, 72°C Elongation, etc.). In der Regel wurden 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Zur Aufreinigung der PCR-Fragmente wurde der PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet.

6.1.2 DNA-Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe bakterieller Restriktionsendonukleasen nach den Angaben der Hersteller. Dazu wurden jeweils

Reaktionsansatz

bis 20µg	DNA
2µl	Restriktionspuffer, 10x
5units/µg	DNA Restriktionsenzym
ad 20µl	ddH ₂ O

für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen aus den Reaktionsansätzen isoliert.

6.1.3 5'-End-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation von geschnittenen Vektoren zu verhindern entfernt man mit Hilfe einer Phosphatase die für eine Ligation notwendige Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA. Dazu wurde 30 Minuten vor Ende eines DNA-Restriktionsverdaus 1µl (1u/µl) Calf Intestinal Phosphatase (CIAP) pro 20µl Ansatz zugefügt und weiter bei 37°C inkubiert.

Im Gegenzug muss das zu inserierende Fragment für eine erfolgreiche Ligation mit einem dephosphorylierten Vektorfragment phosphoryliert werden. Zu 20µl Restriktionsverdau eines Fragments wurden 30 Minuten vor Reaktionsende 1µl (10u/µl) Polynukleotidkinase sowie 1µl 100mM ATP zugefügt.

6.1.4 Ligation zweier DNA-Fragmente

Die kovalente Verknüpfung der 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden zweier kompatibler DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase katalysiert. Dabei wurden in der Regel etwa 300ng des Vektors und ein dreifacher molarer Überschuss des einzuklonierenden Fragments eingesetzt.

Reaktionsansatz:

1µl	T4 DNA-Ligase Puffer
300ng	Vektor
... ng	Insert (3facher molarer Überschuss)
5 units	T4 DNA-Ligase
ad 10µl	ddH ₂ O

Die Ligation erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde anschließend in *E.coli* XL-1 Blue Bakterien transformiert und diese auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und einzelne gewachsene Kolonien für DNA-Mini-Präparationen gepickt.

6.1.5 Transformation von DNA in *E.coli* Bakterien

E.coli Bakterien wurden nach der Methode von Hanahan (1983) behandelt, um sie „kompetent“ für die Aufnahme der DNA zu machen, und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden tiefgefrorene kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und 50µl Zellen mit mindestens 10ng DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C behandelt und sofort wieder auf Eis transferiert. Nach weiteren 2 Minuten wurden die Proben mit DYT-Medium ohne Antibiotika auf 500µl aufgefüllt und zur Regeneration für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen konnten dann entweder auf Agarplatten ausplattiert oder in Flüssigkultur aufgenommen und über Nacht bei 37°C kultiviert werden.

6.1.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmiden aus *E.coli* Bakterien im kleinen Maßstab („Mini-Präp“) wurden 2 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (110 rpm). Die Übernachtskultur wurde in Eppendorf-

Gefäße überführt, 10 min bei 5000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung P2 wurde durch 4-6maliges Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eisgekühlter Puffer P3 zugegeben, der Ansatz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (13000 rpm, 10 min) wurde der Überstand mit 1000µl Ethanol gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 13000 g pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft oder unter Vakuum getrocknet und in 25 µl ddH₂O gelöst.

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab („Maxi-Präp“) wurde das Qiagen Plasmid Purification Kit verwendet.

6.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Proben erfolgte in Ethidium-Bromid-haltigen (0,5µg/ml) Agarosegelen auf der Basis von 0,5xTBE-Puffer. Je nach Größe der Fragmente variierte die Agarose-Konzentration zwischen ein und zwei Prozent. Für die Elektrophorese wurde üblicherweise eine Spannung von 100V bis 200V angelegt. Die Banden wurden bei langwelligem UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht.

6.2 Immunologische und immunbiochemische Methoden

6.2.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper wurden in Kaninchen hergestellt. Für die Initialimmunisierung wurden etwa 500µg des antigenen Proteins oder Peptids eingesetzt. Eine 1:1-Mischung mit komplettem Freundschens Adjuvans (Sigma) wurde mit einer 1ml Spritze mit G20 Kanüle in vier bis sechs Depots seitlich der Wirbelsäule subcutan injiziert. Nach zwei und vier Wochen erfolgte der sogenannte „boost“, weitere Injektionen des Antigens im 1:1-Gemisch mit inkomplettem Freundschens Adjuvans. Nach weiteren 7 Tagen wurde den Kaninchen 1ml Testblut aus der Ohrvene entnommen, abesert (siehe unten) und im Western Blot auf seine Reaktivität

getestet. War das Serum immunogen, wurden die Tiere ausgeblutet, das Blut zwei Stunden bei Raumtemperatur geronnen und abschließend bei 10.000g abgesetzt. Die Seren wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.2 Kopplung von Antigen-Peptiden an BSA

Wird zur Immunisierung in Hasen ein Peptid verwendet, koppelt man die Peptide an Trägersubstanzen wie zum Beispiel BSA (Bovines Serumalbumin). Das BSA selber ist nicht immunogen und beeinflusst die Reaktivität der produzierten Antikörper nicht. Die Kopplung erfolgte über den bifunktionellen Quervernetzer Sulfo SMCC (Sulfo Succinimidyl 4-(N-maleinimidomethyl) Cyclohexane-1-Carboxylat). 4mg Sulfo-SMCC wurden in 0,25ml PBS pH 7,4 gelöst und mit 2,5mg in 0,25ml PBS pH 7,4 suspendiertem BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht-reagiertes Sulfo-SMCC wurde anschließend mittels Gelfiltration abgetrennt. Dazu wurde die Probe auf eine mit PBS pH6,5 prääquilibrierte Sephadex-P10-Säule geladen und mit 1ml PBS pH6,5 wieder eluiert. Das gereinigte BSA-Sulfo-SMCC Konjugat wurde schließlich mit 2,5mg in 500µl PBS pH6,5 gelöstem Peptid versetzt und über Nacht bei 4°C in einem Überkoprotator inkubiert. Der Erfolg der verschiedenen Kopplungsschritte wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

6.2.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Für die Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum oder Mäuseserum (Aszites) macht man sich die spezifische Affinität zu ihrem Antigen zunutze. Das Serum wurde über Nacht bei 4°C und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über eine entsprechende Antigen-gekoppelte Sepharose-Matrix (siehe Kapitel 6.3.5) gepumpt. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit PBS gewaschen und die Antikörper durch pH-Schock mit zweimal 5ml Glycin (100mM, pH 2,3) von der Antigen-Matrix eluiert. Das Eluat wurde mit 180µl 2M Tris pH 8,8/ml Eluat gepuffert und bei -80°C gelagert.

6.2.4 Kopplung von Antikörpern an Protein G-Sepharose

Für Immunpräzipitationen immobilisiert man Antikörper auf einer Protein G-beschichteten Sepharose-Matrix. Protein G bindet spezifisch an die konstanten Regionen der meisten Antikörper. Dazu wurde 1ml Protein G-Sepharose ausgiebig mit PBS gewaschen und mit der gewünschten Menge affinitätsgereinigtem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend zweimal mit 10 Volumen 0,2M Natrium-Tetraborat pH 9,0 gewaschen. Die kovalente Verknüpfung zwischen der konstanten Region der Antikörper und dem Protein G erfolgte durch eine halbstündige Inkubation mit 20mM Dimethylpimelimidat in 0,2M Natrium-Tetraborat bei Raumtemperatur auf dem Überkopf-Rotator. Nach einmaligem Waschen mit 10 Volumen 0,2M Ethanolamin pH 8,0 (oder 150mM NaCl; 50mM Tris pH7,5; 0,01% Igepal) wurden die restlichen aktiven Gruppen durch zweistündige Inkubation in 0,2M Ethanolamin pH 8,0 wiederum bei Raumtemperatur auf dem Rotator geblockt und die Säule abschließend in PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

6.2.5 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen erfolgten mit der entsprechenden Antikörpersäule für zwei Stunden bei 4°C. Die Proben wurden dazu auf einem Überkopf-Rotator in sehr flachem Winkel rotiert (vermindert Präzipitatbildungen des Extraktes). In der Regel wurden dafür etwa 10ml HeLa-Cytoplasmaextrakt (~20µg/µl Gesamtprotein-Konzentration) verwendet. Für die Immunpräzipitationen aus [³⁵S]-markierten HeLa Zellextrakten standen lediglich etwa 100µl Extrakt (2-3µg/µl Gesamtprotein-Konzentration) zur Verfügung. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proben ausgiebig mit einem entsprechenden Puffer, in der Regel PBS mit 0,01% NP-40, und mindestens einmaligem Wechseln des Reaktionsgefäßes gewaschen.

6.2.6 Western Blotting

Beim Western Blotting werden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, um die so immobilisierten Proteine mit Antikörpern spezifisch nachweisen zu können. Die Membran wird zunächst mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert, die wiederum in einem zweiten Schritt durch Meerrettich-Peroxidase(POD)-gekoppelte Sekundärantikörper erkannt werden. Die Proteinbanden können dann durch eine Chemielumineszenz-Reaktion und Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Western Blots nach der „Semi-Dry-Methode“ gemacht. Dabei werden in einer Blotkammer von unten nach oben folgende Schichten blasenfrei aufeinandergestapelt: 3x 3MM Whatman-Papier, Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel, 3x 3MM Whatman-Papier. Alle Schichten werden in 1x Towbin-Puffer voräquibriert (Ausnahme: PVDF-Membran wird in Methanol äquibriert). Der Proteintransfer erfolgte für 90 Minuten bei 150mA. Der Transfer kann durch nachfolgende Ponceau-Färbung (Nitrocellulose), bzw. Amidoschwarz-Färbung (PVDF) der Membran kontrolliert werden (siehe Abschnitt 6.2.7).

Die Membran wurde anschließend eine halbe Stunde in PBS-T mit 5% Milchpulver geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu vermeiden. Darauf folgte die Bindung des spezifischen primären Antikörpers für eine Stunde, sechsmaliges Waschen mit ausreichend PBS-T und die Bindung des sekundären Antikörpers wiederum für eine Stunde. Nach erneutem Waschen der Membran wurden die markierten Banden durch Zugabe von frisch angesetzter Entwicklerlösung (ECL) und Autoradiographie sichtbar gemacht.

6.2.7 Färben von Proteinbanden auf Nitrocellulose- und PVDF-Membranen

Nitrocellulose-Membranen wurden für zwei Minuten mit Ponceau-Lösung inkubiert und durch Waschen mit ddH₂O überschüssige Färbelösung entfernt. PVDF-Membranen wurden einige Sekunden in Amidoschwarz-Entfärber gebadet, zweimal

mit ddH₂O gewaschen und für zwei Minuten mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt. Durch Schwenken der gefärbten Membran in Amidoschwarz-Entfärber wurden die Banden sichtbar gemacht.

6.2.8 RNA *in situ* Hybridisierung und Immunofärbung von Zebrafisch-Embryonen

RNA *In situ*-Hybridisierungen für die *islet2* Expression in Motoneuronen (Appel et al., 1995) und *myoD* in Somiten {Weinberg, 1996 #52} wurden wie in Winkler et al. (2003) beschreiben durchgeführt. Für die Färbungen wurden die Embryonen über Nacht in 4% Paraformaldehyd/PBS/0.1% Tween fixiert und anschließend in aufbewahrt. Nach der Rehydrierung wurden die Embryonen für eine Stunde in Wasser gebadet danach für eine weitere Stunde in PBDT Block-Lösung (1% DMSO, 1% BSA, 0.5% Triton X-100, 2.5% Ziegenserum in PBS) inkubiert. Die Proben wurden dann wie in Melancon et al. (1997) beschrieben mit znp1-Antikörper (1:100 in PBDT) gefärbt. Die Detektierung erfolgte mit dem Vectastain Elite Kit (Vector Laboratories, USA) mit Diaminobenzidine as chromogenes Substrate. Der znp1 Antikörper wurde freundlicherweise vom Zebrafish International Resource Center ZIRC zur Verfügung gestellt (NIH #RR12546). Für die Aufnahmen wurden die Rumpfreionen der gefärbten Embryonen wurden mit Rasierklingen ausgeschnitten und in 100% Glycerin eingebettet.

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 Gel-Systeme

6.3.1.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von immunpräzipitierten und *in vitro*-transkribierten RNAs erfolgte durch denaturierende RNA-Gelelektrophorese. Die Acrylamidkonzentration (Vernetzungsgrad 19:1 Acrylamid:Bisacrylamid) der Gele betrug 5% für *in vitro*-transkribierte RNAs und 10% für immunpräzipitierte snRNAs in 0,5xTBE und 8M

Harnstoff. Die Gellösung wurde zwischen zwei mit Klebeband abgedichtete Glasplatten gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesteckt. Vor dem Beladen der Gele wurden die Taschen mit 0,5xTBE gespült. Die RNA-Proben wurden mit 1/5 Vol. denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Auftrennung erfolgte bei zunächst 250V bis die Proben komplett in das Gel eingewandert waren, anschließend bei 500V.

6.3.1.2 Native RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native RNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung nativer Protein-RNA-Komplexe. Die Komplexe wandern dabei im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe und ihrer Ladung.

Für die native RNA-Gelelektrophorese wurden 6% Polyacrylamid-Gele mit 4% Glycerin verwendet. Die Gellösung wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Taschen eingesteckt. Vor dem Beladen mussten die Taschen gut mit 0,5xTBE-Laufpuffer gespült werden. Die Proben wurden möglichst 1:1, maximal 1:2, mit nativem RNA-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Polyanion Heparin im Probenpuffer sollte dabei unspezifische RNA-Protein-Interaktionen verringern. Die Elektrophorese erfolgt bei 25mA für etwa 90 Minuten in 0,5x TBE.

6.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Polyanion SDS in Probenpuffer und Gel bindet in stöchiometrischen Mengen an die Proteine und bewirkt einerseits ihre Denaturierung und andererseits eine gleichmäßige negative Ladung. Im elektrischen Feld wandern die Proteine daher abhängig von ihrer Ladung und somit indirekt abhängig von ihrer Größe. Zunächst wurden zwei abgedichtete Glasplatten zu etwa 4/5 mit Trenngellösung gefüllt und mit 1ml Isopropanol überschichtet. Nach einer halben Stunde konnte das Isopropanol entfernt werden und das Sammelgel eingefüllt werden, in das ein Kamm zur Aussparung der Taschen platziert wurde. Der Gellauf fand in 1xLaemmli-Puffer bei 75mA statt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Taschen

mit Laemmli-Puffer gespült. Zur Färbung wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele etwa 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert und dann bis zur gewünschten Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung gebadet.

6.3.2 Expression von rekombinanten Proteinen in *E.coli* Bakterien

Zur Expression von Proteinen in *E.coli* Bakterien wurde das entsprechende Plasmid in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und in DYT-Medium mit Antibiotikum bei 37°C und 120rpm über Nacht amplifiziert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Expression durch Zugabe von 0,5mM IPTG induziert. Die Inkubation erfolgte dann in der Regel für 4 Stunden bei 26°C und 120rpm, musste jedoch in Einzelfällen je nach Protein angepasst werden.

Anschließend wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000rpm (Sorvall, Rotor GS-3) pelletiert, in entsprechendem Aufschlusspuffer (His- oder GST-AP) resuspendiert und mittels Sonifikation (Branson Sonifier) aufgeschlossen (4x30sec, Stufe 8). Die lösliche Fraktion konnte dann durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 11000rpm von den Zelltrümmern getrennt werden. Die Isolierung der Proteine aus dem Lysat wurde wie unter Abschnitt 6.3.3 beschrieben durchgeführt.

6.3.3 Aufreinigung von Proteinen aus *E.coli* Bakterienlysate

Für die Aufreinigung von GST-fusionierten Proteinen wurden die Bakterienlysate für 2h bei 4°C mit Glutathion-Sepharose (Amersham) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Aufschlusspuffer erfolgte die Elution der Proteine mit 10mM Glutathion-Peptid in Aufschlusspuffer. Die Eluate wurden anschließend dialysiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Affinitätsreinigung von His-fusionierten Proteinen wurden die Bakterienextrakte für 4h bei 4°C mit Nickel-NTA-Sepharose inkubiert. Darauf folgten mehrere Waschschritte mit Aufschlusspuffer und die Elution der Proteine mit 150mM Imidazol in Aufschlusspuffer. Die Proteine wurden gegen den gewünschten Puffer dialysiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

6.3.4 Dialyse von Proteinen und Proteinkomplexen

Durch Verdrängungsreaktion eluierte Proteine (rekombinant hergestellte Proteine) und Proteinkomplexe (z.B. U snRNPs) sind durch einen sehr hohen Anteil an Peptid, bzw. Imidazol oder Salzen verunreinigt. Dieser Überschuss kann für Folgeexperimente, wie z.B. die Bindung an Cyan-Bromid(CNBr)-aktivierte Sepharose, störend sein. In diesem Fall werden die Eluate in dem gewünschten Puffer dialysiert. Dabei halten Dialyseschlauch oder -membran Proteine ab einer definierten Molekulargröße zurück, während kleine Moleküle wie Peptide und Ionen frei heraus diffundieren können.

Die Eluate wurden in einem Dialyseschlauch/-kammer über Nacht in 2,5l entsprechendem Dialysepuffer langsam bewegt (Rührer). Durch Zugabe von 20% Glycerin (v/v) in den Dialysepuffer wurde einer Verdünnung der Proteinprobe vorgebeugt. Ein zweiter Dialyseschritt für drei bis vier Stunden erhöhte die Effizienz der Dialyse.

6.3.5 Kovalente Kopplung von Proteinen an Cyan-Bromid-aktivierte Sepharose

300mg CNBr-aktivierte Sepharose wurde in 1mM HCl gequollen, dann mit 10 Volumen 1mM HCl und anschließend mit 10 Volumen des Puffers, in dem sich das zu koppelnde Protein befand, gewaschen. Die Proteine wurden anschließend für drei Stunden bei 4°C auf dem Rotor an die Sepharose gebunden. Nach einmaligem Waschen mit Puffer wurden die restlichen aktiven Gruppen der CNBr-aktivierten Sepharose durch zweistündige Inkubation mit 0,1M Tris-HCl pH 8 bei 4°C auf dem Rotor geblockt. Schließlich wurde die Sepharose dreimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen.

6.3.6 *In vitro* Transkription

Für die Herstellung von RNA-Transkripten *in vitro* wurde der Transkriptions-Kit von Promega verwendet. Als Matrizen dienten linearisierte Plasmide mit einem geeigneten Promotor (T7- oder SP6-Promotor) vor der zu transkribierenden Sequenz. Nähere Beschreibungen der verwendeten Plasmide sind in Kapitel 5.3 zu finden. Die Transkripte wurden durch Zugabe von [α - 32 P]-UTP radioaktiv markiert. Der typische Versuchsansatz sah folgendermaßen aus:

Reaktionsansatz

1-2 μ g	Vorlagen-DNA
5 μ l	RNA-Polymerase Puffer 5x
2,5 μ l	DTT 1M
2,5 μ l	cap-analog 10mM (Amersham)
1 μ l	RNAsin
1 μ l	ATP 2,5mM
1 μ l	GTP 2,5mM
1 μ l	CTP 2,5mM
1 μ l	UTP 2,5mM
1 μ l	[α - 32 P]-UTP, 10 μ Ci/ μ l
2 μ l	RNA-Polymerase
ad 25 μ l	ddH ₂ O

Die Transkription erfolgte für 90 Minuten bei 37°C. Zur Reinigung der *in vitro* transkribierten RNAs wurden die Proben mit 1/5 Vol. RNA-Probenpuffer (denaturierend) versetzt und in einem 4%igen Polyacrylamid-Gel (4 % Polyacrylamid [Acrylamid/N,N'-Methylen Bisacrylamid, 19:1 (w/w)], 8M Harnstoff in 0,5x TBE) aufgetrennt. Die Transkripte konnten durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden, die Bande entsprechender Größe ausgeschnitten und mit 400 μ l AES-Puffer versetzt über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Rotor inkubiert werden. Die eluierte RNA wurde in 1/20 Vol. Ammoniumacetat und 1ml Ethanol abs. gefällt, einmal mit

70% Ethanol gewaschen, dann getrocknet und das Pellet in sterilem ddH₂O aufgenommen.

6.3.7 Radioaktive 3'-End-Markierung von RNA

Das in den Helikase-Assays verwendete RNA-Oligonukleotid wurde durch die kovalente Verknüpfung mit [³²P]-pCp am 3'-Terminus radioaktiv markiert. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-RNA-Ligase (England and Uhlenbeck, 1978) über Nacht bei 4°C.

Reaktionsansatz

10pmol	RNA
3µl	5x T4-RNA-Ligase Puffer
1µl	ATP 2mM
5µl	DMSO absolut
0,2µl	T4-RNA-Ligase
0,5µCi	[³² P]-pCp
ad 15µl	ddH ₂ O

Nach der Reaktion wurde die RNA durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 6.3.1.1 und 6.3.9).

6.3.8 Hybridisierung von RNAs

Die Duplices für Helikaseassays wurden jeweils aus einem radioaktiv markiertem und einem unmarkierten Strang hergestellt. Dazu wurden beide Stränge in mehreren verschiedenen Verhältnissen gemischt, in einem Heizblock auf 95°C erhitzt und langsam im abgeschalteten Heizblock abgekühlt. Die Effizienz der Hybridisierung wurde in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen überprüft.

6.3.9 Reinigung radioaktiv markierter RNA aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

Nach der Gelelektrophorese wurde die obere Glasplatte entfernt, das Gel in Frischhaltefolie eingewickelt und für 3 Minuten ein Biomax MR Film aufgelegt. Anschließend konnte durch Unterlegen des belichteten Filmes die Bande korrekter Größe mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß mit 400µl RNA-Elutionspuffer überführt werden. Das Eppendorf-Gefäß wurde über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Rotator inkubiert und die RNA anschließend mit 1ml 100% Ethanol und 100µl 3M Ammoniumacetat aus dem Überstand gefällt. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde die RNA pelletiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20µl ddH₂O eluiert.

6.3.10 Phenol-Extraktion von RNA und Protein aus Immunpräzipitaten

Um RNA und Proteine aus Immunpräzipitaten von RNPs zu trennen, wurde das Probenvolumen auf etwa 200µl eingestellt und das gleiche Volumen Phenol (Reinheitsgrad für die RNA-Extraktion) zu dem Ansatz gegeben. Nach fünfminütigem kräftigen Mischen auf dem Schüttler wurden die Phasen durch kurze Zentrifugation bei 13.000rpm in der Tischzentrifuge getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200µl Isoamylalkohol versetzt und erneut zentrifugiert. Wiederum die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die RNA daraus mittels Ethanol gefällt und das Pellet in 20µl ddH₂O aufgenommen. Aus der Phenolphase der ersten Zentrifugation wurden die Proteine mittels TCA gefällt. Zur Präzipitation der Proteinen wurden die Proben mit 0,1 V Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) versetzt, gut gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge wurden die Proteine pelletiert, ein- bis zweimal mit 1ml TCA-Waschpuffer gewaschen und jeweils erneut 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Bromphenolblau im Waschpuffer diente als pH-Indikator zur Überprüfung der Effizienz der Waschschrte. Das Proteinpellet

wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in SDS-Probenpuffer mit Harnstoff aufgenommen.

6.3.11 Herstellung von Zellextrakten

6.3.11.1 Herstellung von HeLa Cytoplasmaextrakt

5×10^9 Zellen (als tiefgefrorenes Pellet gekauft) wurden in 2/3 des Pelletvolumens autoklaviertem PBS mit 0,01% Igepal (v/v) suspendiert, in einem Douncer durch 30 bis 40 Pistillstöße aufgeschlossen und die Suspension in einem 50 ml Falcon für 30 Minuten bei 2500g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit PBS mit 0,01% Igepal auf 40ml Gesamtvolumen verdünnt und mit Hilfe einer Spritze mit 0,8µm-Filteraufsatz noch weiter geklärt. Die Extrakte wurden entweder sofort eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.3.11.2 Herstellung von HeLa-Kernextrakt

Die pelletierten Kerne aus der Herstellung von cytoplasmatischem Extrakt wurden einmal in PBS gewaschen und 10 Minuten bei 4500rpm (Beckmann-Zentrifuge) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15ml (3ml/ 10^9 Zellen) Puffer Roeder C-low aufgenommen und die Kerne durch 20 Pistillstöße im Douncer aufgebrochen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 16.000rpm (Sorvall, Rotor SS-34) konnte der Überstand abgenommen werden und wie der cytoplasmatische Extrakt filtriert und mit 0,01% Igepal versetzt werden.

6.3.11.3 Herstellung von Ganzzellextrakten aus HeLa-Zellen

Zellen aus pulse-chase-Experimenten wurden auf Eis aufgetaut, 50 Mal mit einer 23G-Kanüle geschert und für 30 Minuten bei 4°C und 16.200g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, ein weiteres Mal für 10 Minuten zentrifugiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Sambrook et al., 1989).

6.3.11.4 Herstellung von Ganzzellextrakten aus Zebrafisch-Embryonen

Zebrafisch-Embryonen mussten dazu in Eppendorfgefäße überführt, das Medium komplett abgesaugt und die Embryonen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Anschließend wurden die Proben auf Eis wieder aufgetaut, mit je 10 Pellet-Volumen RIPA high salt-Puffer versetzt und 50 Mal mit einer 23G-Kanüle geschert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 16.200g konnte der Überstand von den Zelltrümmern getrennt und die Gesamtproteinkonzentrationen der Extrakte mittels Bradford-Methode bestimmt werden (Sambrook et al., 1989).

6.3.12 *In vitro* Rekonstitution von UsnRNPs aus rekombinanten Sm-Proteinen und *in vitro* transkribierten RNAs

Um *in vitro* die Bindung rekombinant hergestellter Sm-Proteine an RNA zu untersuchen, wurde jeweils folgender Reaktionsansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

Reaktionsansatz

1µl	His-SmB
1µl	RNA á 10.000cps
1µl	RNAsin
ad 10µl	PBS (pH 7,4)

Wo im Ergebnissteil beschrieben wurden dem Ansatz je nach Versuch die entsprechenden Mengen GST-pICln oder HeLa Cytoplasmaextrakt zugefügt. Die Komplexbildung wurde mittels nativer RNA-Gelelektrophorese überprüft.

6.3.13 *In vitro* Zusammenlagerung von UsnRNPs in Zellextrakten

Die Zusammenlagerung von UsnRNPs kann in einem *in vitro* Assemblierungsassay simuliert werden (Meister et al., 2001a). Dabei wird eine radioaktiv markierte snRNA mit cytosolischem HeLa Cytoplasmaextrakt oder *Xenopus laevis* Oocytenextrakt inkubiert und die sich bildenden RNA-Proteinkomplexe in einem „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) durch native Gelelektrophorese aufgetrennt. Mittels Autoradiographie können die Komplexe dann sichtbar gemacht werden. Um die Bildung unspezifischer Aggregate zu vermeiden wurden den Versuchsansätzen tRNA und dem Gel-Ladepuffer das Polyanion Heparin zugefügt. Durch einem sogenannten „Y12-supershift“ konnten Komplexe identifiziert werden, die Sm-Proteine enthalten. Dabei wurde ein Teil der Probe mit dem α -Sm-Protein-Antikörper Y12 versetzt und dadurch die Wanderung von Sm-Protein-enthaltenden Komplexen im Gel stark beeinträchtigt.

Ein Standard-Versuchsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz

2 μ l	HeLa PBS-Extrakt
1 μ l	UsnRNA á 10cps, entspricht etwa 25fmol
1 μ l	RNAsin (40u/ μ l)
1 μ l	E.coli tRNA (1 μ g/ μ l)
5 μ l	PBS (pH 7,4)

bzw.:

1 μ l	<i>Xenopus laevis</i> Ei-Extrakt
1 μ l	UsnRNA á 10cps
1 μ l	RNAsin
1 μ l	E. coli tRNA (1 μ g/ μ l)
6 μ l	PBS

Die Reaktionsansätze wurden 30 Minuten bei 37°C, bzw. RT (bei *Xenopus* Extrakten) inkubiert. Die Hälfte der Ansätze wurde im Verhältnis 1:1 mit nativem RNA-Ladepuffer versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die andere Hälfte wurde für einen „Y12-supershift“ verwendet. Dazu wurden zuvor 2µl Y12 mit 3µl RNAsin für 10 Minuten auf Eis vorinkubiert und dann mit der Hälfte des Versuchsansatzes versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe ebenfalls 1:1 mit nativem RNA-Ladepuffer versetzt und weitere 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben in einem nativen RNA-Polyacrylamid-Gel bei 25mA für etwa 90 Minuten aufgetrennt.

6.3.14 *In vitro* Zusammenlagerung von UsnRNPs mit immunpräzipitierten Proteinkomplexen

Die Zusammenlagerung von snRNPs kann auch mit Hilfe von isolierten SMN- oder PRMT5-Komplexen geschehen. Dazu wurden je Ansatz 50µl einer Immunpräzipitation mit α-SMN(7B10)-, bzw. α-pICln-Antikörpern aus HeLa PBS-Extrakt verwendet.

Reaktionsansatz

50µl	Immunpräzipitation (etwa 25µl Sepharose + 25µl Überstand)
5µl	UsnRNA á 50cps
2,5µl	RNAsin
2,5µl	E. coli tRNA (1µg/µl)

Die Proben wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die Sepharose regelmäßig aufgeschüttelt werden musste. Für die Gelelektrophorese wurden schließlich 10µl des Überstandes abgenommen und mit nativem RNA-Ladepuffer versetzt. „Y12-supershifts“ wurden wie unter Abschnitt 6.3.13 durchgeführt und mit 10µl RNA-Ladepuffer versetzt. Die Ansätze wurden jeweils gesamt auf ein natives RNA-Polyacrylamid-Gel geladen und bei 25mA für etwa 90 Minuten aufgetrennt.

6.4 Zellkultur-Methoden

6.4.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in Dubbelco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Das Medium wird dazu mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin-Gemisch und 1% Glutamax komplettiert. Zum Teilen der Zellen, etwa alle 3 Tage, wurden sie mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit 1x Trypsin für etwa 5 Minuten vom Flaschen-/Schalenboden abgelöst und geteilt. Durch Zugabe frischen FCS-haltigen Mediums wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellen durch kräftiges Schütteln der Flasche vereinzelt und dann neu ausplattiert.

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden die Zellen trypsinisiert (siehe oben), anschließend mit 10 ml Medium (DMEM) versetzt und bei 800g 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, in Fraktionen á 1ml in Kryo-Röhrchen abgefüllt und in der -80°C-Truhe eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert und nach einer Woche ein Auftau-Test durchgeführt.

6.4.2 RNA-Interferenz in HeLa-Zellen

In HeLa-Zellen lässt sich die Expression einzelner Gene mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik gezielt unterdrücken. Bei dieser Technik macht man sich ein bei vielen Eukaryonten vorhandenes zelluläres Abwehrsystem gegen Pathogene zunutze. Dabei wird fremde doppelsträngige RNA (dsRNA) in der Zelle von der Endonuklease Dicer in ~23 Nukleotid große Fragmente zerlegt, die sogenannten „short interfering RNAs“ (kurze interferierende RNAs, siRNAs). Diese Fragmente werden dann in den sogenannten „RISC“ (RNA induced silencing complex) eingebaut, dort entwunden und der nicht-kodierende Strang als „Leit-RNA“ (engl. guide-RNA) zum Binden an komplementäre Pathogen-mRNAs benutzt. Eine noch nicht identifizierte Nuklease im RISC zerschneidet dann diese mRNA. Dieser Abwehrmechanismus ist hochspezifisch und kann deshalb hervorragend experimentell zur gezielten Unterdrückung der Expression einzelner Gene eingesetzt

werden. Dazu werden siRNAs gegen die gewünschte Ziel-mRNA synthetisch hergestellt und mittels Kationen-Lipidtransfektion in die Zellen geschleust. Für Säugersysteme werden ausschließlich die kurzen siRNAs (oder kurze siRNA-Vorläufer) verwendet, da Säuger auf lange Doppelstrang-RNA mit einer zusätzlichen Interferon-Abwehr antworten.

HeLa-Zellen wurden je nach Bedarf in 6-Kammerplatten oder Petrischalen ausgesät. Die Transfektionen erfolgten bei einer Konfluenz von etwa 30%. Dazu wurden Lösung A und Lösung B steril angesetzt und für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Lösung A:

10µl	siRNA-Duplex, 20µM
175µl	OPTI-MEM

Lösung B:

4µl	Oligofectamin
11µl	OPTI-MEM

Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den HeLa-Zellen abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 800µl OPTI-MEM ohne FCS und Antibiotika bedeckt. Schließlich wurde die Transfektionslösung vorsichtig zu den Zellen gegeben und die Zellen wie üblich kultiviert. Nach 4 Stunden wurde 1ml OPTI-MEM mit 30 % FCS und 3% Penicillin/Streptomycin zugegeben, so dass sich wieder die normale Konzentration von 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin ergab. Nach 2 oder 3 Tagen konnten die Zellen durch Abkratzen oder Trypsinierung geerntet werden. Der Erfolg der RNA-Interferenz wurde mittels Western Blot überprüft.

6.4.3 In vivo-Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin/Cystein

Um die *de novo*-Synthese von Proteinen in SMN-defizienten HeLa-Zellen darstellen zu können, wurden die Zellen drei Tage nach der Transfektion mit siRNAs gegen SMN einem sogenannten „pulse-chase“-Experiment unterzogen. Bei einem solchen „pulse-chase“ werden die Zellen zeitweilig in Hungermedium inkubiert, dem die Aminosäuren Methionin und Cystein fehlen. Dadurch zwingt man sie zur Einstellung ihrer Proteinbiosynthese. Anschließend gibt man dem Medium die fehlenden Aminosäuren als [³⁵S]-markierte Isotope zu („pulse“). Die Zellen nehmen ihre Proteinsynthese wieder auf und alle ab diesem Zeitpunkt gebildeten Proteine werden radioaktiv markiert. Anschließend wird das Medium zeitweise gegen nicht-radioaktives Normalmedium getauscht („chase“) und die Zellen schließlich geerntet.

Für diese Experimente wurden je drei Kammern einer 6-Kammer-Zellkulturplatte HeLa-Zellen mit der gleichen siRNA transfiziert (siehe Kapitel 6.4.2). Der „pulse“ mit radioaktiv markiertem Methionin/Cystein erfolgte drei Tage nach der Transfektion für eine Stunde, der „chase“ für zwei Stunden. Die Zellen wurden in 150µl RIPA-Puffer pro Kammer mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren um später Ganzzellextrakte daraus herzustellen (Kapitel 6.3.11.3).

6.4.4 TUNEL-Apoptoseassay

Der TUNEL-Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick-End Labeling) macht sich die Tatsache zunutze, dass im Rahmen des von der Zelle ausgelösten Apoptoseprogramms Endonukleasen aktiviert werden, die die DNA zerschneiden. Die freien DNA-Enden werden mit Hilfe der Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit fluoreszente Nukleotiden ligiert. Dadurch können apoptotische Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop von gesunden Zellen unterschieden werden. Der TUNEL-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die dafür verwendeten Zellen wurden 48, 72 oder 96 Stunden zuvor entweder mit SMN- oder Kontroll-siRNAs transfiziert. Die gefärbten Proben wurden mit MobiGLOW Mounting Medium (MoBiTec, Göttingen) eingedeckelt.

6.4.5 Zebrafisch-Kultur

Zebrafische wurden bei einer Temperatur von 28,5°C wie in Westerfield (The Zebrafish Book, 1995) beschrieben gehalten.

6.4.6 Mikroinjektion in Zebrafischen

Das Zebrafisch Ortholog für Gemin2 und pICln wurde über EST-Klone (accession numbers CN510554, A1793714, bzw. NM_131424, AAH66713) in der NCBI Datenbank identifiziert. NCBI BLAST zeigte 68% Übereinstimmung und 83% Ähnlichkeit für Gemin2 sowie 67% Übereinstimmung und 78% Ähnlichkeit für pICln mit den jeweiligen humanen Sequenzen. Die EST-Sequenzen enthielten vollständige Leserahmen (open reading frames) und 5' UTRs, die für das Design der Morpholino Antisense-Oligonukleotide (Gene Tools, USA) verwendet wurden. Den Zebrafisch-Embryonen wurden im Ein- oder Zweizellstadium etwa 0.5 nl der jeweiligen Morpholino-Lösung injiziert.

Für die Koinjektionsexperimente wurden die SMN-, bzw. Gemin2-Morpholinos mit 0.1 mg/ml *Xenopus* or humanen UsnRNPs versetzt. Nach der Injektion wurden die Embryonen bei 28°C bis zum sogenannten „prim-15“-Stadium (30-31 Stunden nach Fertilisation) gehalten {siehe Kimmel, 1995 #39} und dann mittels *In situ*-Hybridisierung und Immunofärbung analysiert.

7. Ergebnisse

7.1 Unterdrückung der SMN-Expression in HeLa-Zellen führt zu reduzierter UsnRNP-Produktion *in vitro* und *in vivo*

7.1.1 Etablierung eines SMA-Modells in HeLa-Zellkultur

Patienten mit Spinaler Muskelatrophie exprimieren aufgrund der homozygoten Deletion des *SMN1*-Gens nur geringe Mengen funktionellen SMN-Proteins. Obwohl verschiedene Aufgaben für SMN beschrieben wurden, ist noch unbekannt, welche der Funktionen bei der Entstehung von SMA die entscheidende Rolle spielt. Die Zusammenlagerung von UsnRNPs ist die bisher am besten verstandene Funktion des Proteins. Meister et al. (2001&2002) konnten zeigen, dass die Immundepletion von SMN aus Zellextrakten eine völlige Inhibition des UsnRNP-Zusammenbaus *in vitro* zur Folge hat. In diesen Immundepletions-Experimenten wurde jedoch nicht nur SMN, sondern der gesamte SMN-Komplex aus den Extrakten entfernt. Sie lassen daher keine Aussage darüber zu, ob der Mangel von SMN allein auch zu einer reduzierten UsnRNP-Synthese führt. Da aus technischen Gründen eine Untersuchung der UsnRNP-Zusammenlagerung in SMA-Patientenzellen direkt nicht möglich war, wurde ein Modellsystem für SMA im HeLa-Zellen etabliert, anhand dessen die zellulären Defekte eines SMN-Mangels rekapituliert werden können.

Dazu wurde zunächst mittels Immunoblot die SMN-Menge in primären Fibroblasten-Kulturen von SMA Typ-I-Patienten bestimmt. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, betrug die SMN-Menge in Patienten-Fibroblasten nur 23% relativ zu jener, die in gesunden Kontroll-Personen gemessen wurde (Abbildung 7 A, vergleiche Spur 1 mit Spur 3 und Spur 2 mit Spur 4, siehe ebenso Abbildung 7 B). Um die SMN-Menge in HeLa-Zellen auf ähnliche Niveaus wie in Patienten-Fibroblasten zu senken, wurde die RNA-Interferenz-Technik eingesetzt. Dazu wurden synthetisch hergestellte siRNAs gegen die Nukleotide 183 bis 205 der humanen SMN-mRNA in HeLa-Zellen



Abbildung 7: Mittels RNAi kann die SMN-Menge in HeLa-Zellen auf pathologische Level gesenkt werden. (A) Immunoblots gegen SMN und β -Aktin in Fibroblasten von gesunden Personen (Spuren 1 und 2) im Vergleich zu Patienten mit SMA Typ I (Spuren 3 und 4) sowie in HeLa-Zellen, die mit siRNAs gegen SMN (Spuren 6 und 8), bzw. Kontroll-siRNAs (ctrl, Spuren 5 und 7) transfiziert wurden. Von den Fibroblasten-Extrakten aus Kontroll-Person und SMA-Patient wurden jeweils 20µg in den Spuren 1, bzw. 3 und 5µg in den Spuren 2 bzw. 4 geladen. (B) Densitometrische Quantifizierung der relativen SMN-Mengen im Vergleich zu Aktin.

transfiziert und nach unterschiedlicher Inkubationsdauer Extrakte aus den Zellen gewonnen. Die SMN-Mengen konnten im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen, auf 60% nach 48 Stunden und auf 22% nach 72 Stunden gesenkt werden (Abbildung 7 A, Spur 5 versus 6 und Spur 7 versus Spur 8, siehe auch Abbildung 7 B). Damit gelang es, Zellen mit vergleichbaren SMN-Mengen wie in SMA-Patienten-Fibroblasten zu erhalten. Die Tatsache, dass nach 96 Stunden kaum noch SMN detektiert werden konnte zeigt, dass eine sehr hohe Transfektionsrate erzielt worden sein muss (Abbildung 8 A).

Um zu validieren, dass dieses System die typischen Charakteristika eines SMN-Mangels *in vivo* zeigt, wurden Apoptose-Assays durchgeführt. SMN ist ein essentielles Protein; die homozygote Deletion des einzigen SMN-Locus in Mäusen (der dem *SMN 1*-Gen im Menschen entspricht) führt zum Absterben der Blastocyste durch Apoptose (Schrank et al., 1997) und auch im Menschen sind noch nie homozygote Deletionen beider SMN-Kopien beschrieben worden. Es wurde daher untersucht, ob die RNAi-induzierte Unterdrückung der SMN-Expression ebenfalls zum Absterben der Zellen durch Apoptose führt. Mit dem sogenannten TUNEL-Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick-End Labeling) kann man apoptotische Zellen nachweisen. Dabei wird die typische Fragmentierung der DNA während der Apoptose benutzt, um die entstandenen freien

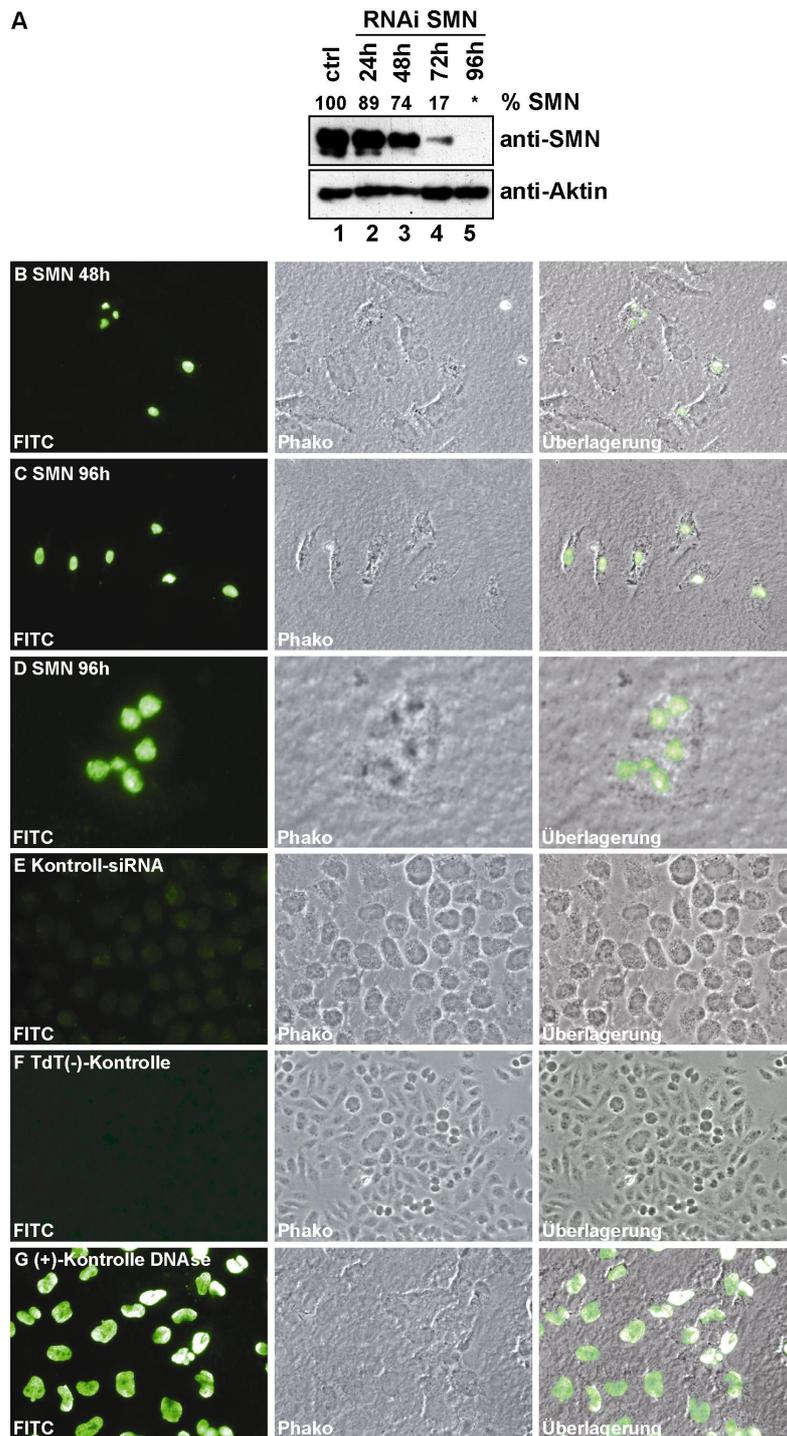


Abbildung 8: Absenkung der SMN-Expression unter die in Patienten-Fibroblasten beobachteten Level löst in HeLa-Zellen Apoptose aus. (A) Immunoblots gegen SMN und β -Aktin in HeLa-Zellen, die für 24h, 48h, 72h und 96h Stunden mit siRNAs gegen SMN (Spuren 2 bis 5), bzw. Kontroll-siRNAs (ctrl, Spur 1) behandelt wurden. **(B-E)** TUNEL-Färbungen RNAi-behandelter HeLa-Zellen im Fluoreszenzbild (FITC-Kanal), Phasenkontrast in einer Überlagerung beider Kanäle (B) 48 Stunden nach der Transfektion, (C) 96 Stunden nach der Transfektion, (E) 96 Stunden nach der Transfektion in Nahaufnahme; deutlich zu erkennen die Fragmentierung der Zellkerns. **(F)** TdT(-)-Kontrolle der Färbung ohne Terminale Transferase (TdT) **(G)** (+)-Kontrolle der Färbung mit DNase-behandelten HeLa-Zellen.

3'-Hydroxylenden mit Hilfe einer Terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase mit Fluoreszenz(FITC)-markiertem dUTP zu markieren. So können apoptotische Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden, nicht-apoptotische Zellen bleiben von dieser Färbung unberührt. In den mit SMN-siRNAs behandelten Zellen zeigten sich nach 48 Stunden einzelne betroffene Zellen (Abbildung 8 B), nach 96 Stunden befand sich bereits der größte Teil der Zellen in der Apoptose (Abbildung 8 C). Viele Zellen zeigten dabei den typischen Zerfall des Zellkerns in mehrere membran-umhüllte Vesikel (Abbildung 8 D). Die Transfektion von Kontroll-siRNAs führte in HeLa-Zellen dagegen nicht zur Apoptose (Abbildung 8 E). Der schlechte Zustand der mit SMN-siRNAs behandelten Zellen äußerte sich zuvor bereits in stark reduzierten Proliferationsraten, wie leicht anhand der Zelldichten in den Phasenkontrast-Aufnahmen zu erkennen ist (vergleiche Abbildung 8 B und C mit E). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass sich auch SMA-Patienten-Fibroblasten deutlich langsamer vermehren als Fibroblasten gesunder Personen (Daten nicht gezeigt).

Die hier angewandte Strategie zur Reduktion der SMN-Expression ermöglicht also, die SMN-Menge in HeLa-Zellen auf pathologische Level zu senken und so den SMN-Mangel in SMA-Patienten-Fibroblasten zu rekapitulieren. Die verlangsamte Proliferation und schließliche Apoptose der Zellen unterstreichen die Eignung dieses experimentellen Ansatzes. Mit diesem Modellsystem wurde die Voraussetzung für die folgenden Analysen der UsnRNP-Synthese *in vitro* und *in vivo* geschaffen.

7.1.2 Die UsnRNP-Zusammenlagerung in Zellextrakten RNAi-behandelter Zellen nimmt proportional mit der Menge an SMN-Protein ab

Das eingangs etablierte Zellkultur-Modell der SMA erlaubte nun zu untersuchen, ob ein *in vivo* herbeigeführter SMN-Mangel tatsächlich zu gestörter UsnRNP-Synthese führt. Für diese Analysen wurden die Extrakte aus Abbildung 7 A dem von Meister et al. (2001) entwickelten Zusammenlagerungs-Assay für UsnRNPs unterzogen. Dabei wurden die gewonnenen Extrakte mit [³²P]-markierter U1snRNA inkubiert und die

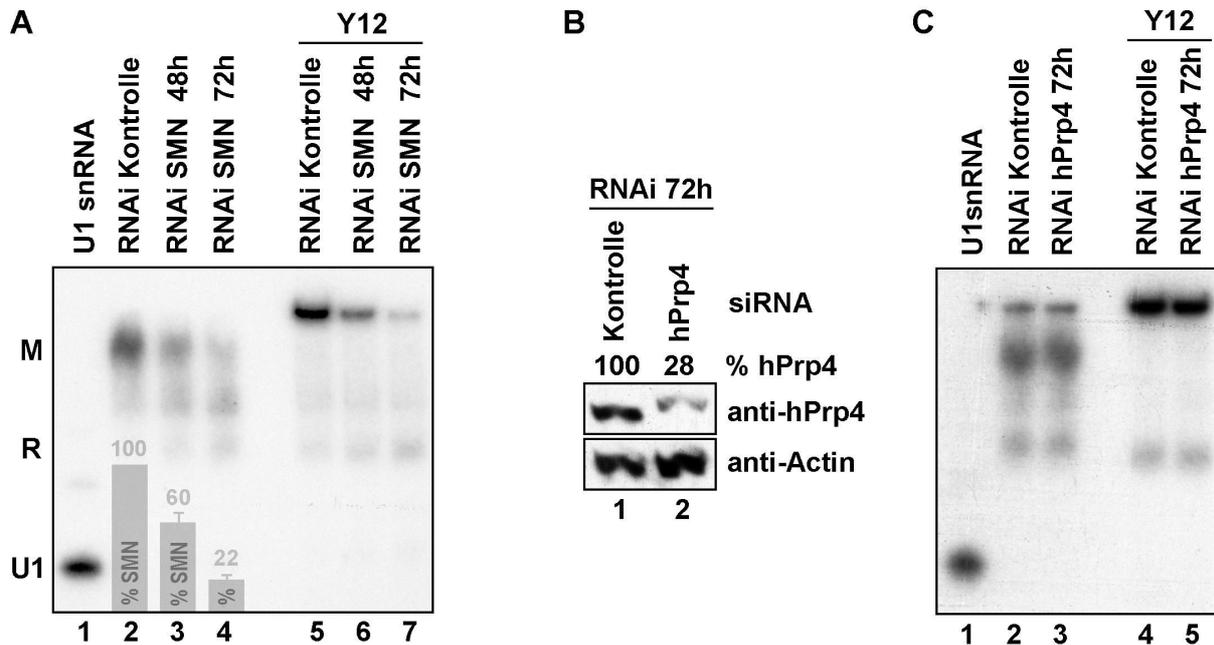


Abbildung 9: Die Zusammenlagerungsaktivität für UsnRNPs nimmt proportional zur SMN-Menge ab. (A) Zusammenlagerung des U1 snRNPs mit Ganzzellextrakten der RNAi-behandelten Zellen aus Abbildung 7. **(B)** Immunoblots gegen hPrp4 und β -Aktin in HeLa-Zellextrakten, die mit siRNAs gegen hPrp4 transfiziert wurden. Die Prozentangabe zeigt die densitometrisch bestimmte relative hPrp4-Menge an. **(C)** Zusammenlagerung des U1 snRNPs in den Ganzzellextrakten aus (B).

entstehenden Komplexe in nativen RNA-Gelen analysiert (Abbildung 9 A). Die RNA wird dabei in zwei Komplexe verlagert. Der Komplex M enthält das reife Sm-core, wie sich durch einen „Supershift“ mit dem α -Sm-Protein-Antikörper Y12 belegen lässt (Abbildung 9 A, Spuren 5 bis 7). Komplex R stellt ein Intermediat der Zusammenlagerungsreaktion dar und enthält keine Sm-Proteine. In diesem Experiment zeigten die Extrakte aus SMN-defizienten Zellen eine deutlich reduzierte Aktivität der UsnRNP-Zusammenlagerung (Abbildung 9 A, Spuren 2 bis 7). Die Effizienz der UsnRNP-Synthese war klar abhängig von der Menge verbliebenen SMN-Proteins: je weniger SMN vorhanden war, desto weniger UsnRNPs wurden gebildet (Abbildung 9 A, Spuren 2, 3 und 4, bzw. Spuren 5, 6 und 7; die SMN-Mengen sind zur Erinnerung als Transparent jeweils am Fuße der Spuren 2 bis 4 eingeblendet, siehe auch Abbildung 7 B). Dieser Effekt konnte spezifisch auf den Mangel von SMN zurückgeführt werden, denn Extrakte aus Zellen, in denen die Expression des Spleißfaktors hPrp4 unterdrückt wurde (Abbildung 9 B), zeigten eine unveränderte Zusammenlagerungsaktivität für das U1 snRNP (Abbildung 9 C). hPrp4

ist, wie auch SMN, ein essentielles Protein, aber nicht direkt an der Biogenese der UsnRNPs beteiligt.

Die hier gewonnenen Resultate zeigen, dass die Reduktion der SMN-Menge in HeLa-Zellen zu einer spezifischen dosisabhängigen Beeinträchtigung der UsnRNP-Zusammenlagerung *in vitro* führt.

7.1.3 Die Reduktion der SMN-Menge führt zu einer verminderten Produktion von UsnRNPs *in vivo*

Im vorangehenden Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von Zellextrakten in der UsnRNP-Zusammenlagerung von der Menge vorhandenen SMN-Proteins abhängt. Daher sollte nun geklärt werden, ob der SMN-Mangel auch eine eingeschränkte UsnRNP-Synthese *in vivo* verursacht. Um dies zu untersuchen, mussten Bedingungen gefunden werden, die den Nachweis von *de novo* synthetisierten UsnRNPs nach Induktion der SMN-Reduktion erlauben. Dazu wurden HeLa-Zellen zunächst mit siRNAs gegen SMN oder mit Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden sie dann einem sogenannten „pulse-chase“-Experiment unterzogen. Durch einen einstündigen „pulse“ mit [³⁵S]-markierten Aminosäuren Cystein und Methionin wurden alle in diesem Zeitraum neu synthetisierten Proteine radioaktiv markiert. Aus den Extrakten dieser Zellen wurden die UsnRNPs mit Hilfe des H20-Antikörpers, der gegen die 5'-Trimethylkappe der snRNAs gerichtet ist, aufgereinigt. Die Proteine der UsnRNPs wurden durch Phenol-Extraktion isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. So konnte anhand der Autoradiographien der Gele die relative Menge neu synthetisierter snRNPs bestimmt werden.

Tatsächlich zeigten Zellen mit reduzierter SMN-Menge (Abbildung 10 A) eine deutlich verminderte *de novo*-Synthese von UsnRNPs. Im oberen Teil der Abbildung 10 A ist zunächst die Überprüfung der RNAi-Effizienz im Immunoblot zu sehen. Die SMN-Menge ist in mit siRNAs gegen SMN behandelten Zellen auf 8% gegenüber Kontroll-siRNA behandelten Zellen reduziert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Autoradiographie der isolierten UsnRNP-Proteine. Aus SMN-defizienten Zellen

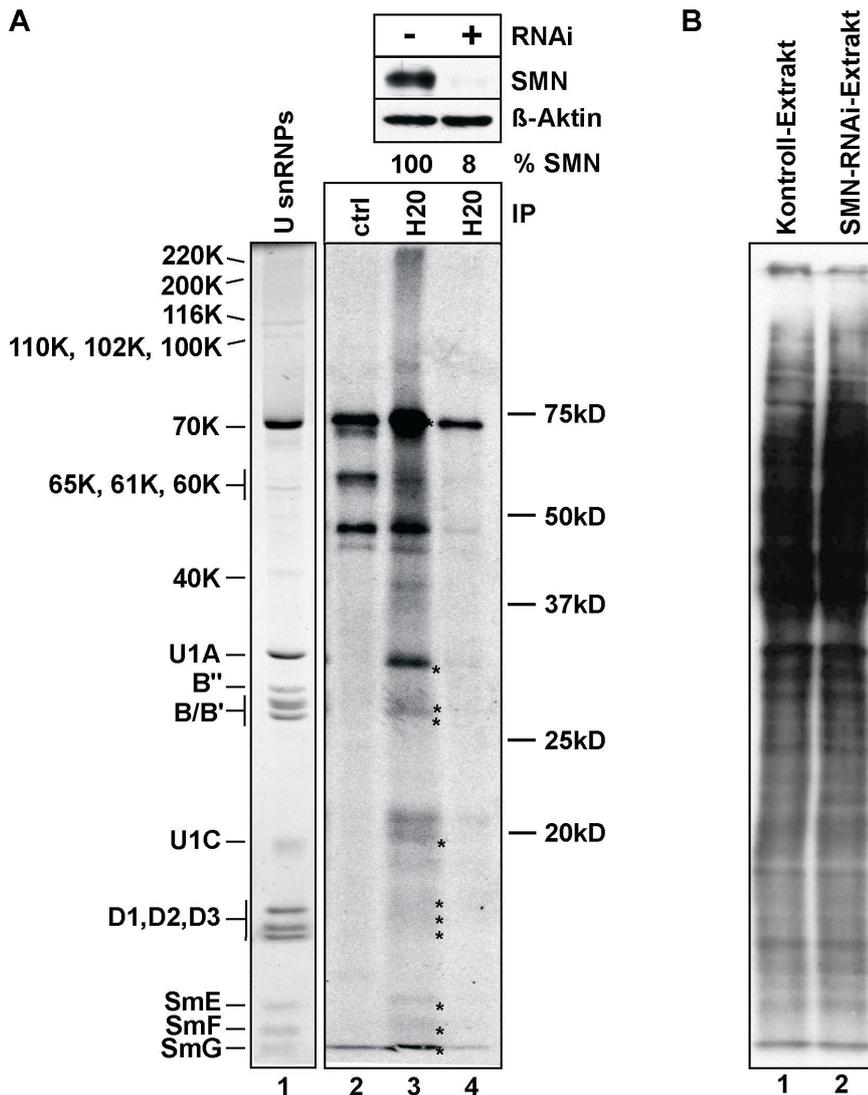


Abbildung 10: SMN-Mangel führt zu reduzierter *de novo* Synthese von UsnRNPs *in vivo*. Radioaktive Analyse der *de novo*-Synthese von UsnRNPs in RNAi-behandelten HeLa-Zellen. **(A, oberer Teil)** Immunoblot der Zellextrakte gegen SMN und β-Aktin. %SMN gibt die relative Menge SMN im Vergleich mit β-Aktin an. **(A, unterer Teil)** Spur 1: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel eines UsnRNP-Markers. Spuren 2 bis 4: Proteinfractionen der Immunpräzipitationen aus den RNAi-Zellextrakten; Autoradiographie des SDS-Gels. Spur 2: anti-FLAG-Kontroll-Immunpräzipitation aus Kontrollzellen; Spur 3: H20-Immunpräzipitation aus Kontroll-Zellen; Spur 4: H20-Immunpräzipitation aus SMN-defizienten Zellen. **(B)** Autoradiographie eines SDS-Gels der verwendeten Gesamtzellextrakten zur Kontrolle der gleichmäßigen radioaktiven Markierung.

konnten deutlich weniger neu synthetisierte UsnRNPs isoliert werden als aus Kontroll-Zellen (vergleiche Spur 4 mit Spur 3). In den Aufreinigungen aus Kontroll-Zellen sind alle U1-spezifischen Proteine (70K, U1A und U1C), sowie alle Sm-Proteine vorhanden (Spur 3), während Aufreinigungen aus SMN-defizienten Zellen

lediglich sehr geringe Mengen dieser Proteine enthalten (Spur 4). Zur leichteren Identifizierung der Proteine wurde in Spur 1 das Coomassie-gefärbte SDS-Gel eines UsnRNP-Markers abgebildet. Die einzige prominente Bande in Spur 4 erscheint auch in einer Kontroll-Immunpräzipitation mit einer Anti-FLAG-gekoppelten Matrix aus Kontroll-Zellen und ist deshalb als unspezifisches Signal einzustufen. Die Kontroll-Immunpräzipitation weist Banden bei 70kD, 60kD und knapp 50kD sowie wenige weitere schwache Banden auf, die jedoch keinem der U1 snRNP-Proteine zuzuordnen sind. Auffällig ist, dass in den H20-Immunpräzipitationen hauptsächlich U1-Proteine zu sehen sind. Der Grund dafür liegt in der hohen Abundanz des U1 snRNPs, weshalb der H20-Antikörper auch vorwiegend U1 snRNPs präzipitiert. Zur Kontrolle, dass die unterschiedlich starken Signale in den Immunpräzipitationen nicht auf einer ungleichmäßigen Markierung der Extrakte mit [³⁵S]-Methionin/Cystein beruhen, wurde für Abbildung 10 B eine Autoradiographie eines SDS-Gels der eingesetzten Gesamtzellextrakte angefertigt. Die Effizienz der radioaktiven Markierung war demnach in den verwendeten Extrakten vergleichbar.

Das hier vorgestellte Experiment bestätigte *in vivo*, dass Zellen mit reduziertem SMN-Gehalt deutlich weniger UsnRNPs bilden als Kontroll-Zellen mit normalem SMN-Gehalt.

7.2 Die reduzierte Expression von SMN, Gemin2 oder pICln führt zur Degeneration von Motoraxonen in Zebrafisch

7.2.1 Mit Hilfe der Morpholino-Technik lassen sich die Expressionen von SMN, Gemin2 und pICln unterdrücken

Die HeLa-Zellkultur eignete sich hervorragend, um zu zeigen, dass ein SMN-Mangel zu reduzierter UsnRNP-Synthese *in vitro* und *in vivo* führt. Dieses System ließ jedoch keine Aussagen darüber zu, ob eine mangelnde UsnRNP-Synthese die spezifische Degeneration von Motoneuronen auslösen kann. Genauso gut könnte dies auch auf

den Ausfall einer Motoneuron-spezifischen Funktion von SMN zurückzuführen sein. Um diese Frage im Kontext eines Organismus untersuchen zu können, musste ein animales SMA-Modell etabliert werden. Der Zebrafisch *Danio rerio* stellt ein ideales experimentelles System zur Untersuchung der Embryonalentwicklung dar. Die Embryonen sind durchsichtig, entwickeln sich sehr schnell und können durch Mikroinjektion leicht manipuliert werden. Mittels der Morpholino-Technik lässt sich im Zebrafisch gezielt die Expression bestimmter Gene unterdrücken. Dabei werden im Ein- oder Zweizellstadium kurze, etwa 25 Nukleotide lange modifizierte Oligonukleotide, sogenannte Morpholinos (ihre Struktur basiert auf Morpholin anstatt Ribose) in den Embryo injiziert. Morpholinos sind meist komplementär zum 5'-Bereich der Ziel-mRNA und blockieren deren Translation durch Hybridisierung.

Von McWorther (REF) wurde kürzlich die Expressions-Inhibition des *SMN*-Gens in Zebrafisch beschrieben. Sie konnten zeigen, dass die Injektion von Morpholinos gegen die *SMN*-mRNA die Entwicklung von Zebrafisch-Embryonen stark beeinträchtigt. Beim Einsatz subletaler Mengen des Morpholinos kam es zu Degenerationen der Axone in caudalen primären (CaP) und variablen primären (VaP) Motoneuronen. Je nach Menge des injizierten Morpholinos traten Verkürzungen oder verstärkte Verzweigungen der Axone auf.

In Kooperation mit Marieke Giegerich und Christoph Winkler vom Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg haben wir ebenfalls die Morpholino-Technik eingesetzt, um in Zebrafisch die Expression von *SMN* zu unterdrücken. Darüberhinaus wurden weitere Experimente durchgeführt, in denen die Expression von *Gemin2* und *pICln* inhibiert wurde. Beide Proteine sind, wie *SMN*, an der *UsnRNP*-Synthese beteiligt und haben nach bisherigen Erkenntnissen keine weiteren zellulären Funktionen. Sollte die von McWhorter et al. (2003) beschriebene Degeneration der Motoraxone tatsächlich auf einer reduzierten *UsnRNP*-Synthese beruhen, müsste neben *SMN* auch ein Mangel anderer essentiell an der *UsnRNP*-Zusammenlagerung beteiligter Faktoren (z.B. *Gemin2* oder *pICln*) zu vergleichbaren Entwicklungsdefekten führen.

Die mit diesen Morpholinos behandelten Embryonen wurden 31 Stunden nach der Fertilisation auf ihre Überlebensraten und generelle Missbildungen (siehe Kapitel

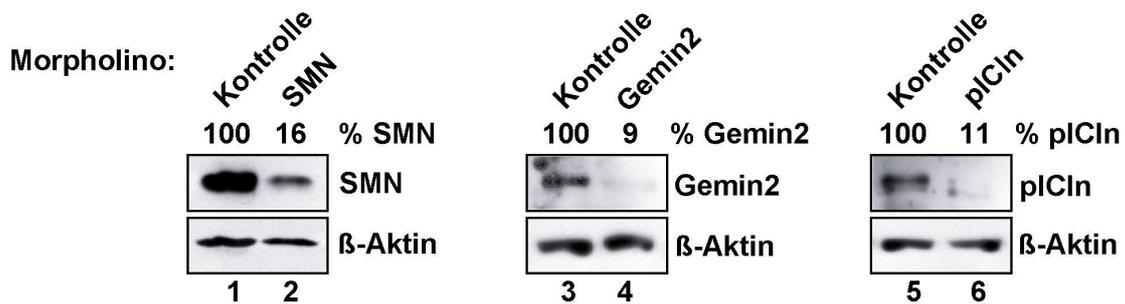


Abbildung 11: Mittels Morpholino-Injektion kann die Expression von SMN, Gemin2 und pICln unterdrückt werden. Immunoblots gegen SMN, Gemin2, pICln und β -Aktin in Extrakten aus Zebrafischen, die mit je 3,1mg/ml Kontroll-Morpholinos (Spuren 1, 3 und 5), bzw. Morpholinos gegen SMN (Spur 2), Gemin2 (Spur 4) oder pICln (Spur 6) injiziert wurden.

7.2.2), sowie die Zahl der Embryonen mit verkürzten oder verzweigten Axonen (siehe Kapitel 7.2.3) hin untersucht. Die Reduktion der Menge des jeweiligen Zielproteins wurde auf immunohistochemischem Weg überprüft (Abbildung 11).

Die Immunoblots in Abbildung 11 zeigen, dass die Mengen der Zielproteine auf 16% bei SMN (Spuren 1 und 2), auf 9% bei Gemin2 (Spuren 3 und 4) und auf 11% bei pICln (Spuren 5 und 6) reduziert waren. Die relativen Proteinmengen wurden densitometrisch im Vergleich zu β -Aktin bestimmt.

7.2.2 Die Reduktion der Proteinmenge von SMN, Gemin2 oder pICln führt zu Störungen der Embryonalentwicklung

Parallel zur biochemischen Expressionsanalyse wurden die Überlebens- und Missbildungsraten der Embryonen bestimmt. Als missgebildet wurden hierbei solche Embryonen eingestuft, die offensichtliche Fehlbildungen sowie verkürzte und geknickte Körperachsen oder eine deutlich verzögerte Entwicklung aufwiesen.

Nach Injektion hoher Dosen des SMN-Morpholinos (6,3mg/ml) überlebten nur 16% der Zebrafisch-Embryonen (Tabelle 1) und von den überlebenden Fischen entwickelten 54,5% Missbildungen. Im Gegensatz dazu überlebten 69% der Embryonen die Injektion von 6,3mg/ml Kontroll-Morpholino und nur 9,7% wiesen Missbildungen auf. Um weitere Analysen der SMN-defizienten Fische zu

Injektion	n = Zahl analysierter Embryonen	Überlebensraten	Missbildungen
Control MO (6,3 mg/ml)	210	69,0%	9,7%
SMN MO (6,3 mg/ml)	69	16,0%	54,5%
SMN MO (3,1 mg/ml)	321	74,1%	50,4%
Gemin2 MO (6,3 mg/ml)	609	73,6%	57,1%
pICln MO (6,3 mg/ml)	575	51,3%	42,4%
SMN MO (3,1 mg/ml) + <i>Xenopus</i> snRNPs	334	98,8%	6,4%
SMN MO (3,1 mg/ml) + humane snRNPs	82	97,6%	5,0%
Gemin2 MO (6,3mg/ml) + humane snRNPs	80	100%	57.5%

Tabelle 1: Statistische Auswertung der injizierten Embryonen bezüglich Überlebensraten und Missbildungen (einschließlich verzögerter Entwicklung, sowie verkürzter und geknickter Körperachsen).

ermöglichen, wurde die Konzentration der SMN-Morpholinos auf 3,1mg/ml herabgesetzt. Daraufhin überlebten die Injektion 74,1% der Embryonen und gut die Hälfte (50,4%) zeigten Missbildungen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Daten von McWorther et al. (2003). In allen weiteren Analysen wurde daher für die SMN-Morpholinos eine Konzentration von 3,1mg/ml eingesetzt. Injizierte man Morpholinos gegen Gemin2 (6,3mg/ml), lag die Überlebensrate bei 71,2%, die Rate der Missbildungen bei 55,8%. Bei der Injektion von Morpholinos gegen pICln (6,3mg/ml) war die Überlebensrate mit 52,3% schlechter, dagegen gab es mit 42,4% weniger Missbildungen.

Die Daten von McWhorter et al. (2003) bezüglich der Missbildungen SMN-defizienter Zebrafisch-Embryonen konnten in diesem Experiment also bestätigt werden.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Expression weiterer an der UsnRNP-Synthese beteiligter Faktoren ebenfalls zu schweren Entwicklungsstörungen führt.

7.2.3 SMN-, Gemin2- und pICln-defiziente Embryonen entwickeln degenerierte Motoraxone

Die Entwicklungsdefekte der Fische äußerten sich nicht nur in Deformationen und Entwicklungsverzögerungen, sondern ebenso in ihrem Verhalten. Viele der Fische zeigten schwere motorische Defekte und stark eingeschränkte Aktivität. Die entscheidende Frage war daher, ob der Mangel von SMN, sowie von Gemin2 und pICln, zu einer Degeneration von Motoneuronen führt. Deshalb wurden die Embryonen fixiert und nach einer Standardmethode zur Färbung von primären Motoneuronen behandelt (Färbung der Perikaryen durch *in situ*-Hybridisierung mit der *islet2*-mRNA und immunohistochemische Färbung der Axone mit *znp1*-Antikörper). Die primären caudalen Motoneuronen wurden mikroskopisch auf Entwicklungsdefekte ihrer Axone hin untersucht.

Abbildung 12 A zeigt einen gesunden Zebrafisch-Embryo 31 Stunden nach Fertilisation. Das eingezeichnete Rechteck markiert den Ausschnitt der jeweiligen nachfolgenden Abbildungen. Anhand der Ausschnittsvergrößerung aus einem gesunden Embryo in Abbildung 12 B ist gut zu erkennen, dass die Perikaryen der untersuchten caudalen primären (CaP) Motoneuronen im Rückenmark liegen und ihre Axone in die ventralen Myotome projizieren. Embryonen, die mit SMN-Morpholino injiziert wurden, zeigten im Vergleich dazu deutlich verkürzte und verzweigte Motoraxone (Abbildung 12 C). Das gleiche Bild ergab sich bei Embryonen, die mit Morpholinos gegen Gemin2 oder pICln injiziert wurden. Auch hier war ein großer Teil der Motoraxone verkürzt oder verzweigt (Abbildung 12 D und E), wobei man in Gemin2-defizienten Embryonen selten beide Missbildungen in ein und demselben Embryo fand (daher der Einschub in Bild D).

Für die statistische Auswertung dieser Ergebnisse (Abbildung 13, siehe auch Tabelle 2) wurden pro Embryo jeweils 16 Motoraxone der caudalen primären Motoneuronen

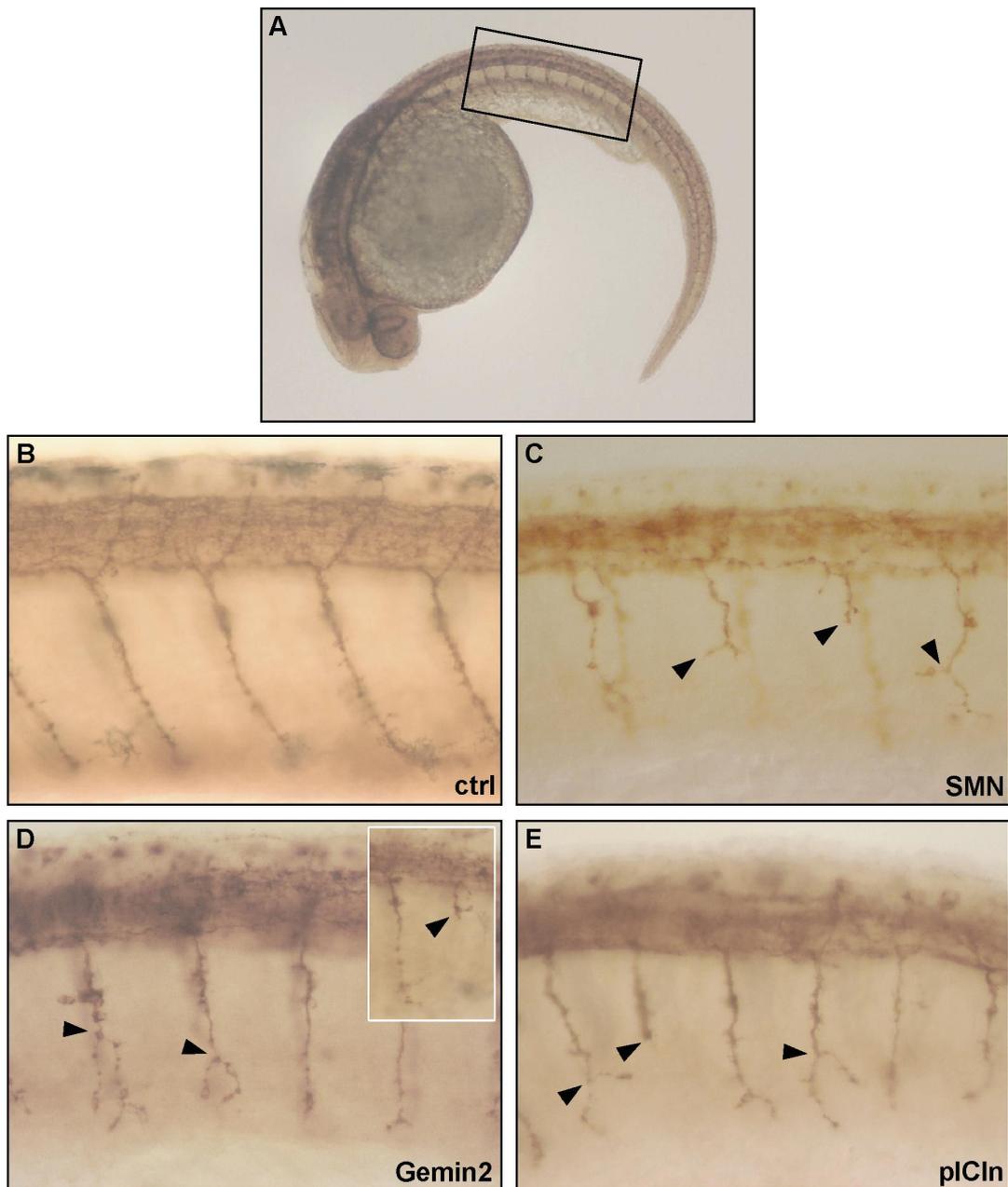


Abbildung 12: Der Mangel von SMN sowie von Gemin2 oder pICln führt zu Motoraxon-Degenerationen in Zebrafisch-Embryonen. (A) Überblick über einen gesunden Zebrafisch-Embryo 31 Stunden nach der Fertilisation. Das Rechteck markiert den in allen folgenden Experimenten untersuchten Ausschnitt. **(B - E)** Lateraler Blick auf gefärbte Embryonen, die nicht (B) bzw. mit SMN- (C), Gemin2- (D) oder pICln-Morpholinos (E) injiziert wurden. Die Pfeilspitzen markieren defekte Motoraxone.

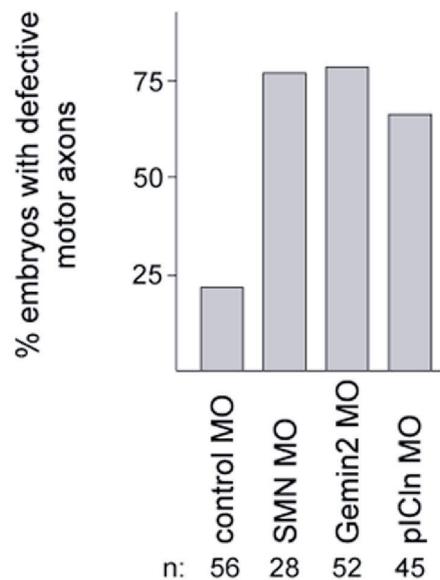


Abbildung 13: Diagramm der statistischen Auswertung der Motoraxon-Degenerationen in den mit Kontroll-Morpholino, sowie mit SMN-, Gemin2- oder pICln-Morpholino injizierten Embryonen. Siehe auch Tabelle 2.

in einem definierten anterioren Rumpfbereich (Rechteck in Abbildung 12 A) beurteilt. Embryonen, die mehr als ein verzweigtes oder verkürztes Motoraxon aufwiesen wurden als betroffen, alle anderen als normal definiert.

Wie in Abbildung 13 graphisch dargestellt, entwickelten 21,4% der Embryonen, die mit einem Kontroll-Morpholino injiziert worden waren, mehrere verkürzte oder verzweigte Motoraxone (siehe auch Tabelle 2). Im Gegensatz dazu waren bei den mit SMN-Morpholino injizierten Embryonen 76,9% von axonaler Degeneration betroffen. Bei Gemin2 waren es sogar 78,9% und bei pICln 64,4% (Abbildung 13 und Tabelle 2). Dies entspricht jeweils einer Verdreifachung bis Vervierfachung des Wertes der Kontroll-Embryonen.

Diese Experimente zeigten, dass die reduzierte Expression verschiedener Komponenten des UsnRNP-Zusammenlagerungsweges in Zebrafisch zu schweren Entwicklungsstörungen bis hin zum Tod führt. Die Entwicklungsstörungen äußern sich dabei in verkürzten oder verzweigten Axonen der caudalen primären Motoneuronen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine reduzierte Synthese von UsnRNPs die Defekte der Motoneurone verursachen kann.

Injektion	n = Zahl analysierter Embryonen	Embryonen mit verkürzten oder verzweigten Motoraxonen	Embryonen mit normalem Motoraxon Wachstum
Kontroll MO (6,3 mg/ml)	56	21,4%	78,6%
SMN MO (3,1 mg/ml)	26	76,9%	23,1%
Gemin2 MO (6,3 mg/ml)	77	79,2%	20,8%
pICln MO (6,3 mg/ml)	45	64,4%	35,6%
SMN MO (3,1 mg/ml) + <i>Xenopus</i> snRNPs	26	30,8%	69,2%
SMN MO (3,1 mg/ml) + humane snRNPs	23	13,0%	87,0%
Gemin2 MO (6,3mg/ml) + humane snRNPs	24	50,0%	50,0%

Tabelle 2: Statistische Auswertung der Morphologie der Embryonen bezüglich Verkürzung und Verzweigung der Motoraxone

7.2.4 Koinjektion von reifen UsnRNPs rettet SMN- und Gemin2-defiziente Zebrafisch-Embryonen

Die Befunde aus Kapitel 7.2 legen nahe, dass die Degeneration von Motoraxonen in SMN-defizienten Zebrafisch-Embryonen direkt auf eine gestörte Produktion von UsnRNPs zurückzuführen sein könnte. Wenn dies tatsächlich der Fall sein sollte, müsste sich die Reduktion der UsnRNP-Synthese durch die Koinjektion nativer isolierter UsnRNPs komplementieren lassen und die Zebrafisch-Embryonen so gerettet werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden den Embryonen isolierte UsnRNPs zusammen mit Morpholinos gegen SMN oder Gemin2 koinjiziert und die Auswirkungen auf Überlebensraten, Missbildungen und die Motoraxon-Entwicklung untersucht.

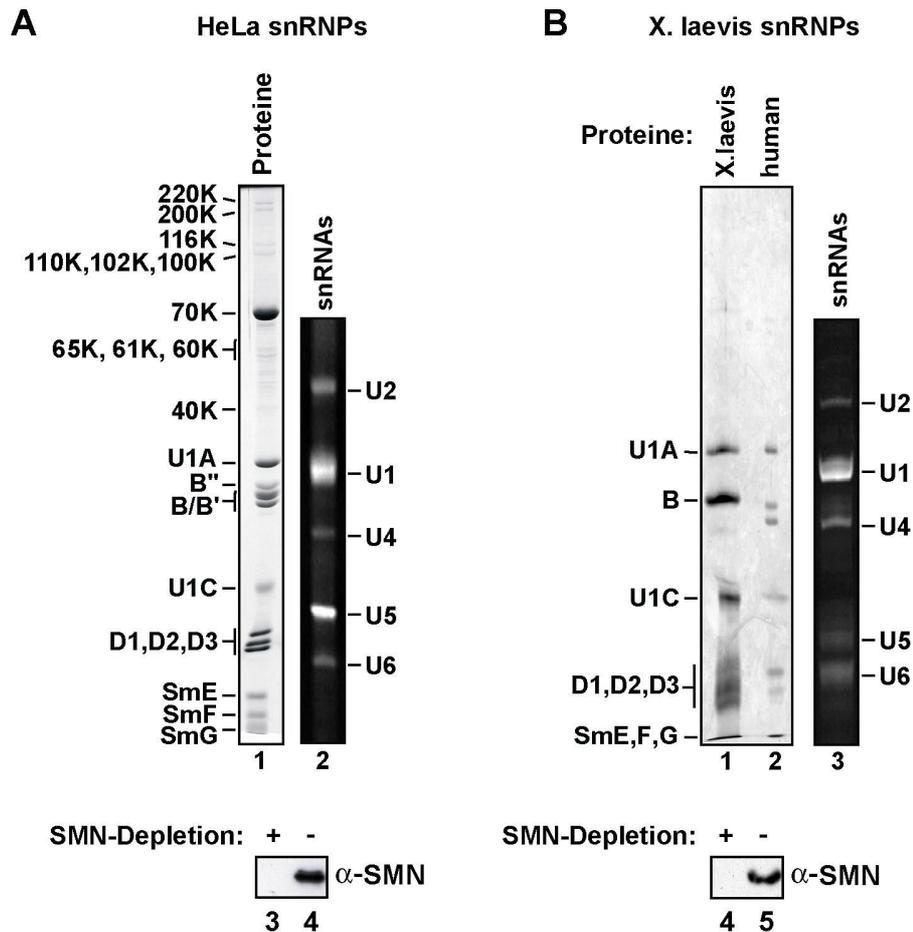


Abbildung 14: Biochemische Charakterisierung der injizierten UsnRNP-Präparationen (A) aus HeLa und (B) aus *Xenopus laevis*. Jeweils im linken Kasten in (A) und (B) sind die Proteinfractionen in Silber-gefärbten SDS-Gelen zu sehen, im rechten Kasten jeweils die RNA-Fractionen in Ethidiumbromid-gefärbten denaturierenden Polyacrylamid-Gelen. Der untere Teil der Abbildungen (A) und (B) zeigt in Immunoblots die vollständige Entfernung von SMN aus den UsnRNP-Aufreinigungen.

Die UsnRNPs wurden durch Immunpräzipitation der Trimethylguanosin-Kappe der snRNAs (H20-Antikörper) aus humanen HeLa-Zellen und *Xenopus* Tissue Culture (XTC)-Zellen gewonnen und anschließend nativ von der Antikörper-Matrix eluiert (Bringmann and Luhrmann, 1986).

Abbildung 14 zeigt die biochemische Charakterisierung der injizierten UsnRNPs. Dazu wurden RNA- und Proteinfractionen durch Phenol-Extraktion getrennt. Die snRNAs wurden in einem Ethidiumbromid-gefärbten denaturierenden Polyacrylamid-Gel untersucht, die Proteine mittels SDS-PAGE und Silberfärbung sichtbar gemacht. In beiden Präparationen sind alle spleißosomalen UsnRNAs (U1, U2, U4, U5 und

U6) enthalten (Abbildung 14 A, Spur 2 und B, Spur 3). Die humanen UsnRNPs zeigen die typische Proteinzusammensetzung aus den sieben Sm-Proteinen sowie den verschiedenen Partikel-spezifischen Proteinen (Abbildung 14 A, Spur 1). In der Präparation von *X. laevis* UsnRNPs sind lediglich die U1 snRNP-Proteine eindeutig zu identifizieren, was jedoch auf die geringe Menge der aufgetragenen Probe zurückzuführen ist (Abbildung 14 B, Spur 1, in Spur 2 ist 1/5 der Probe aus Abbildung 14 A aufgetragen). Der starken evolutionären Konservierung der UsnRNP-Komponenten entsprechend ähneln sich die Bandenmuster der humanen und *X. laevis* snRNPs in der Silberfärbung sehr. Lediglich SmB' scheint es in *X. laevis* nicht zu geben (vergleiche Abbildung 14 B, Spuren 1 und 2) und konnte auch in Datenbank-Analysen nicht gefunden werden.

Da SMN häufig als Verunreinigung in affinitätsgereinigten UsnRNPs enthalten ist und das Komplementationsexperiment positiv verfälschen könnte, musste es vor den Injektionen vollständig aus den injizierten UsnRNPs entfernt werden. Dazu wurde SMN mit einer α -SMN-Antikörper gekoppelten Sepharosematrix aus den snRNP-Präparationen isoliert. In den Immunoblots in den unteren Hälften der Abbildung 14 A und B ist gezeigt, dass SMN vollständig aus den isolierten snRNPs entfernt werden konnte (vergleiche Spuren 3 und 4 in A, bzw. 4 und 5 in B).

Die SMN-depletierten UsnRNPs wurden anschließend zusammen mit den Morpholinos gegen SMN, bzw. Gemin2 den Embryonen injiziert. Die Analyse der koinjizierten Embryonen erfolgte wie bei den Experimenten zuvor 31 Stunden nach der Fertilisation. Zunächst wurden wieder mittels Immunoblot die jeweiligen Expressionslevel der Zielproteine bestimmt (Abbildung 15). Die SMN-Menge lag bei Embryonen, die mit SMN-Morpholino allein behandelt wurden bei 16% (Spur 2) im Vergleich zur Kontrolle (Spuren 1). Bei den mit *X. laevis* UsnRNPs koinjizierten Tieren konnte die SMN-Menge auf 1% (Spur 3), bei den mit humanen snRNPs koinjizierten Embryonen auf 27% reduziert werden (Spur 5 im Vergleich zu Spur 4). Für Gemin2 wurde eine Reduzierung auf 29% bei Injektion des Morpholinos alleine (Spur 7), und 32% bei Koinjektion von Morpholino und UsnRNPs erreicht (Spur 8).

Die statistische Auswertung der Überlebens- und Deformationsraten der Embryonen zeigte, dass die Koinjektion von UsnRNPs die Überlebensraten von SMN-defizienten

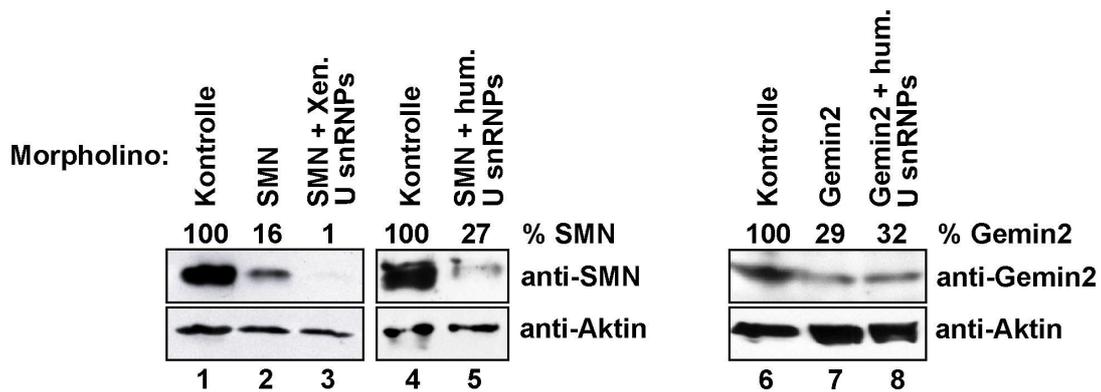


Abbildung 15: Reduktion der SMN-, bzw. Gemin2-Menge in mit UsnRNPs koinjizierten Zebrafisch-Embryonen. Immunoblots gegen SMN, bzw. Gemin2 und β -Aktin in Extrakten aus Zebrafischen, die mit Kontroll-Morpholinos (Spuren 1, 4 und 6) oder Morpholinos gegen SMN (Spur 2), bzw. mit SMN-Morpholinos zusammen mit UsnRNPs aus *Xenopus* Tissue Culture (XTC)-Zellen (Spur 3) oder HeLa-Zellen (Spur 5) injiziert wurden.

Embryonen deutlich steigerte (Tabelle 1, Seite 72). 98,8% der mit *X. laevis* UsnRNPs, bzw. 97,6% der mit humanen UsnRNPs koinjizierten SMN-defizienten Fische überlebten. Auch die Zahl der Missbildungen ging auf Werte wie bei Kontroll-Embryonen zurück. Bei der Koinjektion von humanen snRNPs mit Gemin2-Morpholino überlebten sogar nahezu 100% der Embryonen, wobei die Zahl der Missbildungen nicht zurückging. Auffällig waren die hohen Überlebensraten der koinjizierten Fische, die sogar weit über denen der mit Kontroll-Morpholinos injizierten Tiere (69%) lagen. Die Koinjektion von UsnRNPs steigerte die Überlebensraten der Embryonen also weit über die der Kontroll-Embryonen hinaus und konnte Missbildungen zumindest in SMN-defizienten Embryonen verhindern.

Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang jedoch die Auswirkung der Koinjektion auf die Entwicklung der Motoneurone. Deshalb wurden die Embryonen fixiert und mit znp1-Antikörpern und *in situ*-Hybridisierung der *islet2*-mRNA gefärbt. Die Analyse der Motoneurone erfolgte analog zu den initialen Studien im anterioren Rumpfbereich (vergleiche Abbildung 12 B).

Die Aufnahmen in Abbildung 16 zeigen, dass die Koinjektion von UsnRNPs in der Tat die Degeneration der Motoraxone sowohl in SMN-, wie auch in Gemin2-defizienten Embryonen verhindern kann. Während die nur mit Morpholinos injizierten Embryonen Verkürzungen und Verzweigungen der Axone in primären caudalen

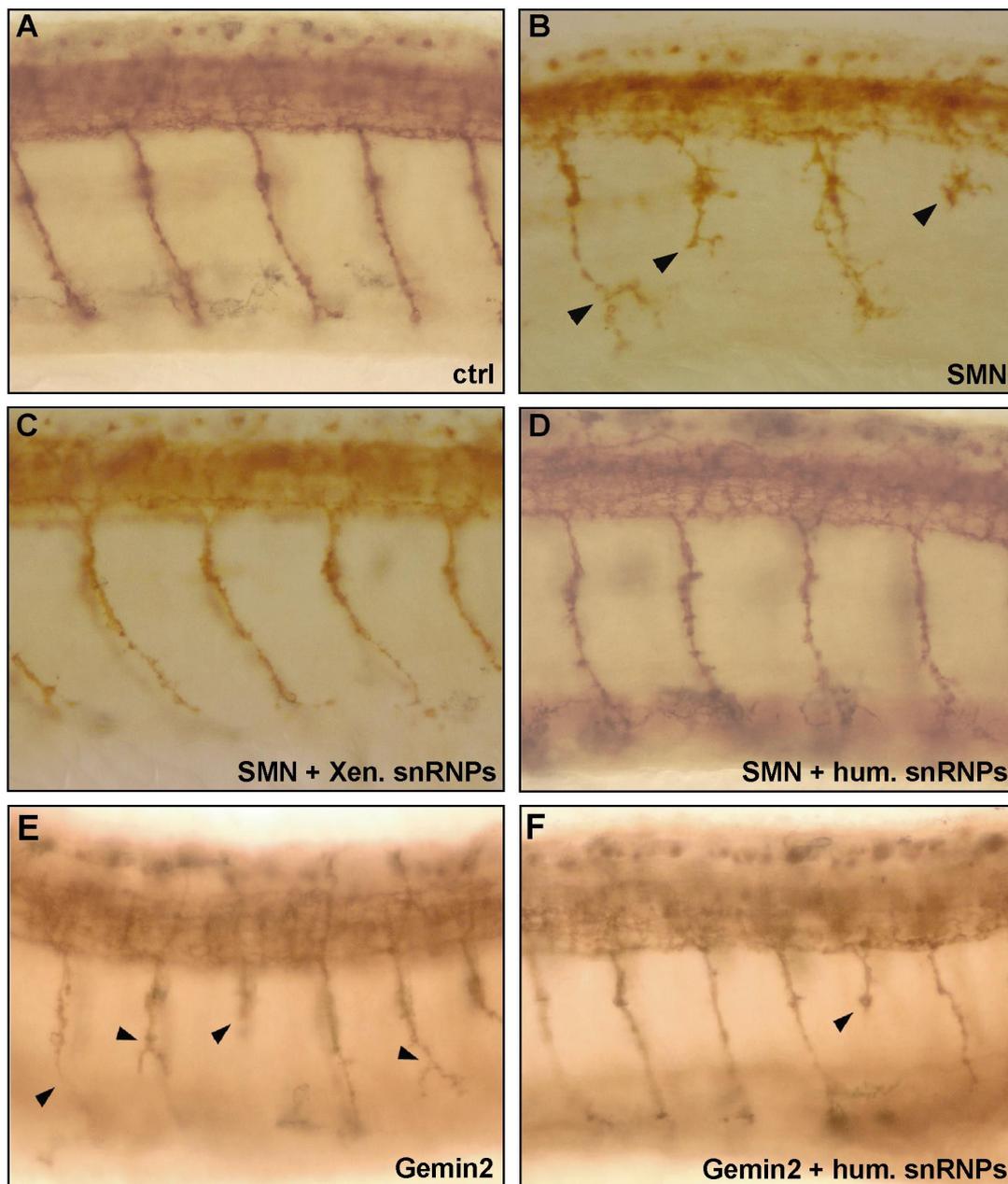


Abbildung 16: Der Mangel von SMN, Gemin2 oder pICln verursacht Degenerationen der Axone von Motoneuronen. Lateraler Blick auf Embryonen der Koinjektionsexperimente, die injiziert wurden mit: (A) Kontroll-Morpholino (B) SMN-Morpholino (C) SMN-Morpholino mit *Xenopus* UsnRNPs (D) SMN-Morpholino mit humanen UsnRNPs (E) Gemin2-Morpholino (F) Gemin2-Morpholino mit humanen UsnRNPs.

Motoneuronen aufwiesen (Abbildung 16 B und E, vergleiche auch Kapitel 7.2.3), entwickelten sich die Motoraxone bei der Koinjektion der UsnRNPs völlig normal (Abbildung 16 C, D und F). Wie bei den Kontroll-Embryonen projizierten sie unverzweigt bis in die ventralen Myotome. Der Effekt war in Gemin2-defizienten

Embryonen etwas schwächer als in SMN-defizienten Fischen, denn es traten dort immer wieder einzelne verkürzte Motoneurone auf (Pfeilspitze in F). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Komplementation auch Spezies-übergreifend möglich ist. Sowohl humane (Abbildung 16 D) als auch aus *X. laevis* UsnRNPs (Abbildung 16 C) konnten die Zebrafisch-Embryonen retten.

Die Diagramme in Abbildung 17 zeigen die zugehörige statistische Auswertung der Axon-Degenerationen (siehe auch Tabelle 2, Seite 76). Während 76,9% der mit SMN-Morpholino behandelten Fische Axon-Degenerationen entwickelten, konnte diese Zahl auf 13% reduziert werden, wenn humane UsnRNPs koinjiziert wurden. Die Koinjektion von *X. laevis* UsnRNPs bewirkte einen Rückgang der Axon-Degenerationen auf 30,8%. Der Vergleichswert der Kontroll-Embryonen lag bei 21,4% Tieren mit Axon-Degenerationen. Neben den SMN-defizienten Embryonen konnte auch die Zahl der Gemin2-defizienten Embryonen mit Axondefekten durch die Injektion von humanen UsnRNPs von 79,2% auf immerhin 50% gesenkt werden.

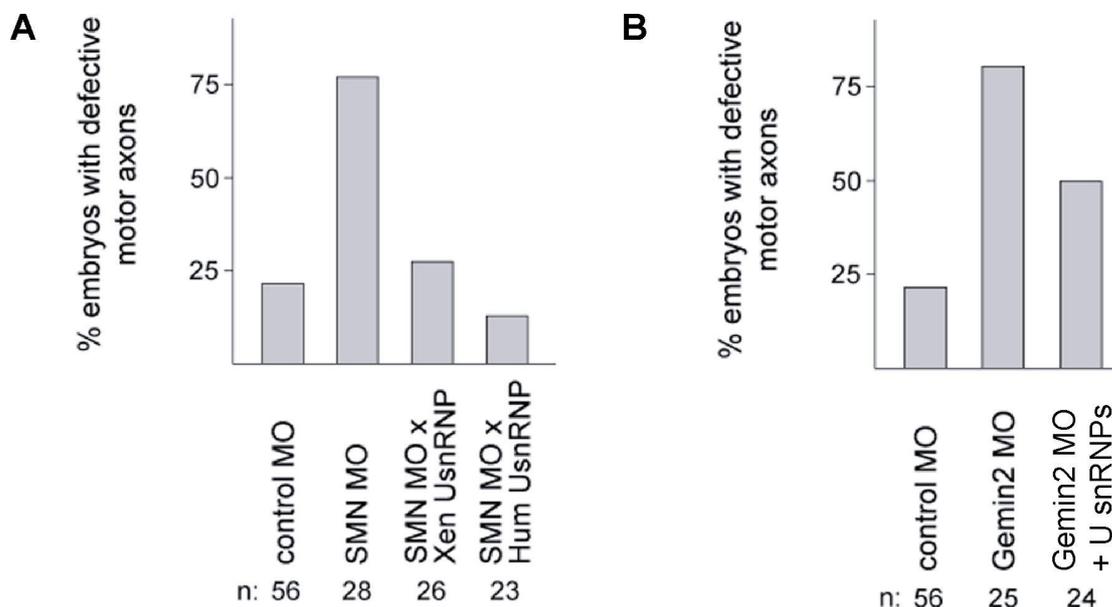


Abbildung 17: Diagramm der statistischen Auswertung der Koinjektionsexperimente in **(A)** SMN-defizienten Embryonen, **(B)** Gemin2-defizienten Embryonen. Siehe auch Tabelle 3 (Seite 76).

Diese Studien zeigten, dass die Koinjektion von nativen UsnRNPs SMN-defiziente Zebrafisch-Embryonen vor der Degenerationen ihrer Motoraxone bewahren kann. In Gemin2-defizienten Embryonen kann der Entwicklungsdefekt der Motoraxone nicht komplett aufgehoben, aber dennoch deutlich gemildert werden. Eine reduzierte Synthese von UsnRNPs war demnach die direkte Ursache für die Defekte in der Entwicklung der Axone von Motoneuronen in einem Zebrafisch-Modellsystem für die SMA.

7.3 Der SMN-Komplex stellt die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung sicher

Um Therapieansätze für Krankheiten wie die Spinale Muskelatrophie zu finden, genügt es nicht allein, die Ursache zu kennen. Man muss vor allem die molekularen Abläufe, die in die Entstehung der Krankheit involviert sind, verstehen. In den vorangehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass ein Mangel von SMN zu reduzierter UsnRNP-Synthese führt und die eingeschränkte UsnRNP-Synthese direkt verantwortlich für die Degeneration von Motoraxonen in Zebrafisch-Embryonen ist. Die durch den SMN-Mangel beeinträchtigte UsnRNP-Biogenese ist demnach wahrscheinlich auch die Hauptursache für die Entstehung der SMA beim Menschen. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten der molekulare Ablauf der UsnRNP-Zusammenlagerung näher untersucht. Ein wichtiger Aspekt dabei ist, wie die Spezifität der Zusammenlagerungs-Reaktion sichergestellt wird. Eine Zelle kann es sich nicht leisten, Sm-Proteine durch unspezifische Interaktion mit „falschen“ RNAs zu verlieren. Da *in vivo* der SMN-Komplex für die Übertragung der Sm-Proteine auf die RNA zuständig ist, lag die Idee nahe, dass der Komplex auch die Spezifität der Reaktion vermitteln könnte. Darum wurde in den folgenden Experimenten zunächst geklärt, ob Sm-Proteine überhaupt unspezifisch an „falsche“ RNAs binden (Kapitel 7.3.1). In weiteren Studien wurde dann untersucht, ob der SMN-Komplex die Sm-Proteine spezifisch nur an relevante *in vivo*-Substrate (spleißosomale UsnRNAs und U7snRNA) ausliefert und somit eine unspezifische Zusammenlagerung verhindert (Kapitel 7.3.2).

7.3.1 Sm-Proteine binden *in vitro* spontan und unspezifisch an verschiedene RNAs

Als Voraussetzung für die weiteren Experimente wurde zunächst geklärt, ob die Sm-Proteine nur an UsnRNAs oder auch an verschiedene andere RNAs binden können. Mehrere Studien haben gezeigt, dass isolierte Sm-Proteine *in vitro* spontan, also ohne fremde Hilfe, ein vollständiges und stabiles Sm-core an UsnRNAs ausbilden (Raker et al., 1996; Sumpter et al., 1992). Raker et al. (1999) zeigten zwar, dass diese Bindung spezifisch ist und von einer intakten Sm-site der UsnRNA abhängig ist, allerdings wurden diese Studien mit isolierten Komponenten und unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt (10µM tRNA, 0,01% NP-40). Da solch kompetitive Bedingungen in der Zelle nicht vorherrschen, sollte überprüft werden, ob isolierte Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen unspezifisch auch an Nicht-snRNAs binden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichende *in vitro*-Rekonstitutionsassays unter kompetitiven (unter Zugabe von 0,1µg/µl tRNA) und nicht-kompetitiven (ohne Zugabe von Kompetitor-RNA) Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden drei radioaktiv markierte RNAs in An- oder Abwesenheit von Kompetitor-tRNA mit physiologisch relevanten Mengen rekombinant hergestellter Sm-Proteine inkubiert (die Sm-Protein-Heterodimere B/D3, D1/D2 und E/F/G wurden freundlicherweise von Christian Kambach zur Verfügung gestellt (Kambach et al., 1999), siehe Abbildung 18, Spur 3): die U1snRNA bindet an Sm-Proteine, während die U1mutSm RNA (U1snRNA mit mutierter Sm-site) und die U17snoRNA (small nucleolar RNA) keine Sm-Proteine binden können. Die Assoziation von Sm-Proteinen mit der RNA wurde mittels nativer Gelelektrophorese überprüft.

Die Rekonstitutions-Experimente zeigten, dass Sm-Proteine bei Anwesenheit von tRNA spontan an U1 snRNA (Abbildung 18, Spur 3) binden. Es entstand ein spezifischer Komplex (mit * gekennzeichnet), bei dem es sich um ein vollständiges zusammengelagertes Sm-core handelte. Dagegen bildeten sich unter diesen Bedingungen keinerlei Komplexe zwischen Sm-Proteinen und U1mutSm oder U17 RNA (Abbildung 18, Spuren 6 und 9). Wie von Raker et al. (1999) beschrieben,

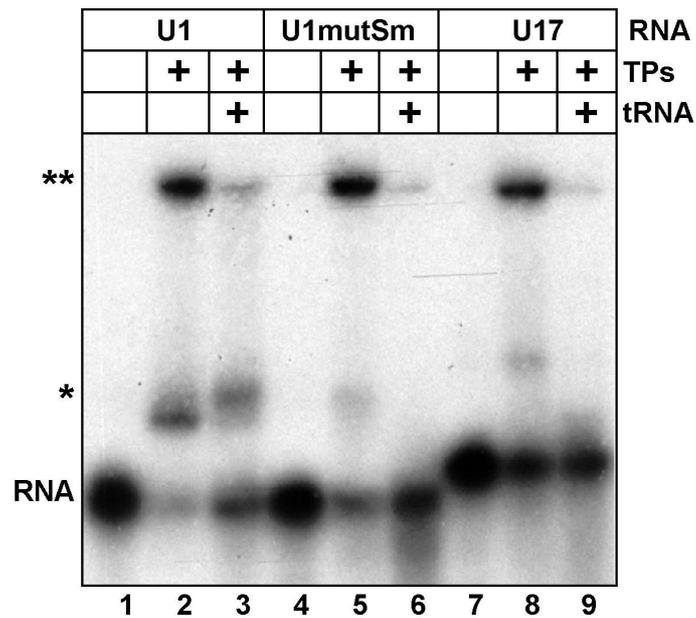


Abbildung 18: Sm-Proteine binden unter nicht-kompetitiven Bedingungen unspezifisch an RNA. *In vitro*-Rekonstitutions-Experiment mit rekombinanten Sm-Proteinen und *in vitro*-transkribierter U1 snRNA, U1mutSm und U17 snoRNA in An- und Abwesenheit eines kompetierenden Überschusses von tRNA.

banden die Sm-Proteine unter kompetitiven Bedingungen also spezifisch nur an intakte UsnRNAs. Wenn das Experiment jedoch in Abwesenheit des Kompetitors stattfand, entstand bei allen drei RNAs hochmolekulare Aggregate (Abbildung 18, Spuren 2, 5 und 8, mit ** gekennzeichnet) aus RNA und Sm-Proteinen. Zusätzlich trat bei der U1 snRNA wieder die spezifische Bande des Sm-cores auf. Auch bei U1mutSm und U17 ist ein schwacher niedermolekularer Komplex in etwa auf gleicher Höhe zu finden. Es kann sich dabei jedoch nicht um ein stabiles Sm-core handeln, da diese Bande bei Anwesenheit von Kompetitor RNA nicht auftritt.

Dieses Experiment lässt den Schluss zu, dass Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen *in vitro* spontan und unspezifisch mit verschiedenen RNAs assoziieren können. Eine stabile spezifische Verbindung findet nur zwischen Sm-Proteinen und einer Sm-site enthaltenden UsnRNA statt.

7.3.2 Der SMN-Komplex überträgt Sm-Proteine spezifisch nur auf snRNA

Mit dem Problem der unspezifischen Interaktion zwischen Sm-Proteinen und RNAs ergibt sich für die Zelle die Notwendigkeit, die Spezifität der Sm-Protein-Bindungen zu kontrollieren. Dem SMN-Komplex könnte, als die ausführende Komponente der UsnRNP-Zusammenlagerungsreaktion, diese Aufgabe zufallen. Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob der SMN-Komplex auch unter nicht kompetitiven Bedingungen (ohne Kompetitor-RNA) die Sm-Proteine spezifisch nur auf intakte snRNAs überträgt. Dazu wurde der SMN-Komplex inklusive gebundener Sm-Proteine aus HeLa Cytoplasmaextrakt isoliert (Abbildung 19, Spur 2) und mit den RNAs U1, U1mutSm und U17 inkubiert, und zwar unter Bedingungen, unter denen die RNAs im vorangehenden Experiment (Kapitel 7.3.1) unspezifisch mit Sm-Proteinen assoziierten (also ohne Kompetitor-RNA).

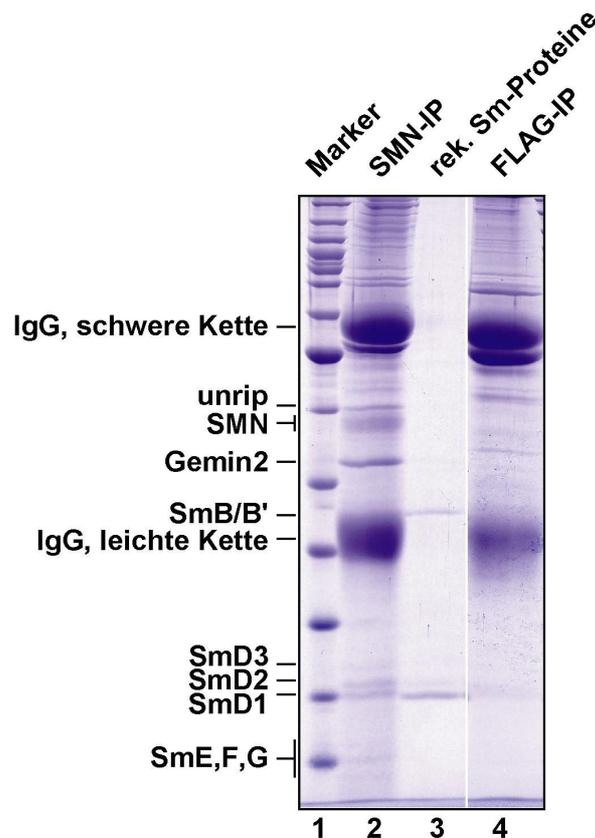


Abbildung 19: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der SMN-Immünpräzipitation (Spur 2), der Kontroll-Immünpräzipitation (Spur 4) und der in Abbildung 18 verwendeten rekombinanten Sm-Proteine (Spur 3).

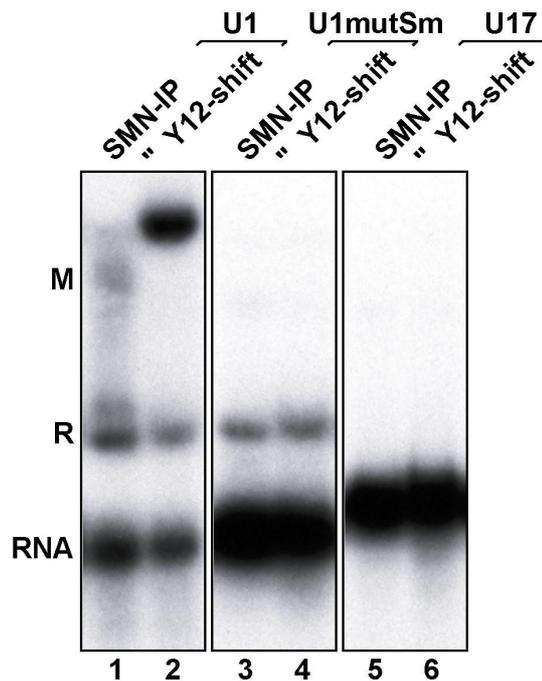


Abbildung 20: Der SMN-Komplex überträgt Sm-Proteine spezifisch nur auf intakte UsnRNAs. Inkubation von isoliertem SMN-Komplex mit U1 (Spuren 1 und 2), U1mutSm (Spuren 3 und 4) und U17 RNA (Spuren 5 und 6) in Abwesenheit einer Kompetitor-RNA.

Um dieses mit dem letzten Experiment (Kapitel 7.3.1) vergleichen zu können, wurden die Mengen der Sm-Proteine über ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel abgeglichen (Abbildung 19, vergleiche Spuren 2 und 3) und für beide Experimente gleiche Mengen eingesetzt.

Der in Abbildung 19 gezeigte SMN-Komplex wurde, wie die Sm-Proteine in Abbildung 18, mit radioaktiv markierter U1, U1mutSm oder U17 RNA ohne Zugabe von Kompetitor-tRNA inkubiert und ein Teil des Überstandes in einem nativen RNA-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde ein zweiter Teil des Überstandes mit Y12-Antikörper nachinkubiert und ebenso auf das Gel aufgetragen.

In der Tat überträgt der SMN-Komplex die Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen ausschließlich auf die U1 snRNA (Abbildung 20, Spuren 1 und 2), während er keine Sm-Proteine auf U1mutSm oder die U17 RNA lädt (Abbildung 20, Spuren 3 und 4, bzw. 5 und 6). Der SMN-Komplex kann also Nicht-snRNAs gegenüber intakten UsnRNAs diskriminieren.

Die beiden Experimente aus Abschnitt 7.3.1 und 7.3.2 zeigen, dass der SMN-Komplex die Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen ausschließlich auf eine snRNA mit intakter Sm-site, in diesem Fall die U1 snRNA, überträgt, während isolierte Sm-Proteine unspezifisch auch an andere RNAs binden. Der SMN-Komplex stellt demnach die Spezifität der Zusammenlagerungs-Reaktion von UsnRNPs sicher.

7.4 Die minimale noch assemblierende snRNA besteht aus der Sm-site flankiert von einer 3'-terminalen Schleife

In den vorangehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass der SMN-Komplex spezifisch nur intakte UsnRNAs mit Sm-Proteinen belädt. Das setzt voraus, dass die RNAs bestimmte Erkennungsmerkmale besitzen, die sie als Substrat für die SMN-vermittelte UsnRNP-Zusammenlagerung kennzeichnen. Es gibt bereits einige Untersuchungen darüber, welche Sequenzbereiche der UsnRNAs notwendig für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen sind (Hamm et al., 1990; Hamm et al., 1987; Jarmolowski and Mattaj, 1993; Yong et al., 2002). Die Ergebnisse der verschiedenen Studien sind jedoch widersprüchlich und fast ausschließlich im *X. laevis* System gewonnen. So zeigten Hamm et al. (1987) und Raker et al. (1999) in *X. laevis* Oocyten, *X. laevis* Eiextrakt und mit isolierten UsnRNP-Komponenten, dass die Sm-site allein für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen ausreicht. Dagegen kamen Jarmolowski et al. (1993) zu dem Schluss, dass auch stem-loop E der U1snRNA notwendig für die erfolgreiche Zusammenlagerung in *X. laevis* Oocyten ist und stem-loop C und der 5'-terminale Überhang die Effizienz der Reaktion leicht beeinträchtigen. Yong et al. (2002) wiederum postulierten, dass stem-loop A für die SMN-vermittelte UsnRNP-Zusammenlagerung in *X. laevis* und HeLa unabdingbar sei, weil die RNA ohne stem-loop A nicht mehr an den SMN-Komplex binden könne.

Anhand dieser verwirrenden Daten kann bisher keine eindeutige Aussage zu den für die UsnRNP-Zusammenlagerung notwendigen Sequenz- und Strukturelemente der RNA gemacht werden. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit systematisch untersucht, welche Strukturen der U1 snRNA eine Rolle für die Beladung mit Sm-

Proteinen in *X. laevis* Eiextrakt und in HeLa Cytoplasmaextrakt spielen. Die U1 snRNA bietet für diese Zwecke ein gutes Modell, da sie sich durch eine auffällige Sekundärstruktur auszeichnet (Abbildung 21). Der 5'-terminale Bereich besteht aus einem 12 Nukleotide langen Einzelstrang gefolgt von drei Kleeblatt-förmig angeordneten Schleifen, den sogenannten stem-loops A, B und C. Daran schließt sich wiederum ein einzelsträngiger Bereich an, der die Sm-site (in der ursprünglichen Nomenklatur auch als Domäne D bezeichnet) enthält. Auf diesen Einzelstrang folgt schließlich eine 3'-terminale Schleife, der stem-loop E. Um die Sm-site bildet sich der hexamere Ring aus Sm-Proteinen, an die stem-loops A, B und C binden die U1-spezifischen Proteine U1A, 70K und U1C.

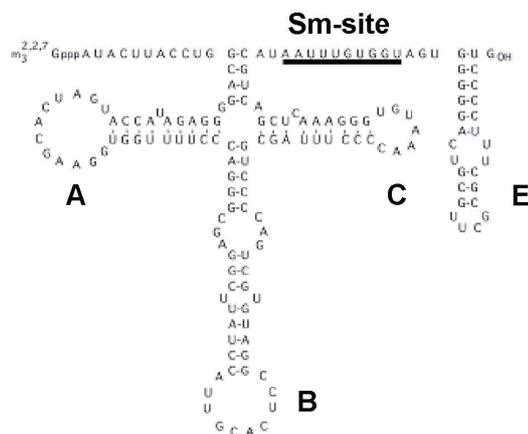


Abbildung 21: Sekundärstruktur der U1 snRNA

Um die für die Zusammenlagerung nötigen Sequenzabschnitte eingrenzen zu können, wurden verschiedene Mutationen, bzw. Deletionen in die U1 snRNA eingeführt Tabelle 3. Dabei wurde sich weitgehend an bekannten Strukturmerkmalen wie stem-loops und Sm-site orientiert. Zum einen wurden alle vorhandenen stem-loops einzeln und in unterschiedlichen Kombinationen deletiert, zum anderen wurden verschiedene Punkt- und Austausch-Mutanten verwendet. Für die Nomenklatur der verschiedenen Konstrukte wurde jeweils das Zeichen Δ im Sinne von Deletion, die Bezeichnung „mut“ im Sinne von Austausch benutzt. Dem Konstrukt U1 Δ A fehlt also stem-loop A, U1mutSm enthält eine mutierte Sm-site, etc. Zur Verdeutlichung sind alle RNAs in Tabelle 3: näher beschrieben und in den nachfolgenden Abbildungen jeweils über dem entsprechenden Experiment schematisch dargestellt.

RNA	Deletierte(Δ) oder substituierte (S) Nukleotide	Kurzbeschreibung	Referenz
U1		Wildtyp	(Zeller et al., 1984)
U1 Δ A	Δ 17 – 47	Deletion stem-loop A	(Hamm et al., 1990)
U1 Δ B	Δ 50 – 91	Deletion stem-loop B	(Hamm et al., 1990)
U1 Δ C	Δ 92 - 117	Deletion stem-loop C	(Hamm et al., 1990)
U1 Δ ABC	Δ 14 - 121	Deletion stem-loops A, B und C	diese Arbeit
U1 Δ 5'	Δ 1 – 12	Deletion des 5'-Überhangs	(Jarmolowski and Mattaj, 1993)
U1 Δ A3	U27 ,A29, U30 zu G, C, C)	Bindet nicht mehr an 70K und U1C	(Hamm et al., 1990)
U1 SmII	S 1 - 115 zu GAAUACAAGCUUAAGUA AGCUU	Substitution stem-loops A, B und C durch artifiziellen stem-loop	(Fischer et al., 1993)
U1mutSm	S 124 – 129 (UAAUUU zu CUCGAG)	Substitution in der Sm-site	(Hamm et al., 1990)
U1 Sm-site	Sm-site Oligonukleotid AUUUGUGG	RNA-Oligonukleotid bestehend aus ausschließlich der Sm-site	(Raker et al., 1999)
U1 Δ E	Δ 139 - 164	Deletion stem-loop E	(Jarmolowski and Mattaj, 1993)
U1-3	Δ 149 - 164	Deletion des 3'-Komplementärstranges von stem-loop E	diese Arbeit
U1mutE	Δ 144 – 148, S 149 – 152 (UUGG zu AGAA), Δ 153 - 157	Verkürzung stem-loop E und Substitution der einzelsträngigen Schleifensequenz	(Hamm et al., 1990)

RNA	Deletierte(Δ) oder substituierte (S) Nukleotide	Kurzbeschreibung	Referenz
U1-4	138 - 164 dupliziert	stem-loop E durch Duplikation verdoppelt	diese Arbeit
U7opt	S (U7 Sm-site zu U1 Sm-site)	U7 snRNA, deren U7 Sm-site durch eine U1 Sm-site ersetzt wurde	(Pillai et al., 2001)

Tabelle 3: Beschreibung der eingesetzten Deletionsmutanten der U1 snRNA mit Angabe der deletierten (Δ) und substituierten (S) Nukleotide.

Die beschriebenen RNAs wurden unter Zugabe von [32 P]-UTP *in vitro* transkribiert und in *X. laevis* Eiextrakt oder HeLa Cytoplasmaextrakt inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen der RNAs mit Extraktproteinen zu verhindern, wurde den Ansätzen ein zehnfacher molarer Überschuss an tRNA und Heparin zugefügt. Die entstandenen Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) wurden anschließend durch native Gelelektrophorese aufgetrennt und in Autoradiographien sichtbar gemacht.

7.4.1 Die 5'-terminalen Strukturen spielen keine wesentliche Rolle bei der Zusammenlagerungsreaktion von UsnRNPs

Zunächst wurde in *X. laevis* Eiextrakt untersucht, welchen Einfluss die 5'-terminalen Strukturen (stem-loops A, B und C sowie der 5'-terminale einzelsträngige Überhang) auf die Zusammenlagerungsreaktion haben. Die Spuren 1 bis 4 in Abbildung 22 zeigen als Kontrolle die Zusammenlagerung der Wildtyp U1 snRNA. Die RNA wird bei diesem Assay in drei Komplexe inkorporiert, im Gegensatz zum HeLa-Extrakt, wo es nur zwei Komplexe sind (siehe auch Kapitel 7.1.2). Diese bezeichnet man als R1, R2 und M (Spur 3) (Meister et al., 2001a). Der M-Komplex enthält den reife Sm-core und stellt vermutlich das fertige UsnRNP dar. Bei den Komplexen R1 und R2 handelt es sich um Intermediate der Reaktion (Meister et al., 2001a). R1 enthält wahrscheinlich ein oder mehrere U1-spezifische Proteine, während im R2-Komplex bereits Sm-Proteine, wahrscheinlich in Form eines unvollständigen „Sub-cores“

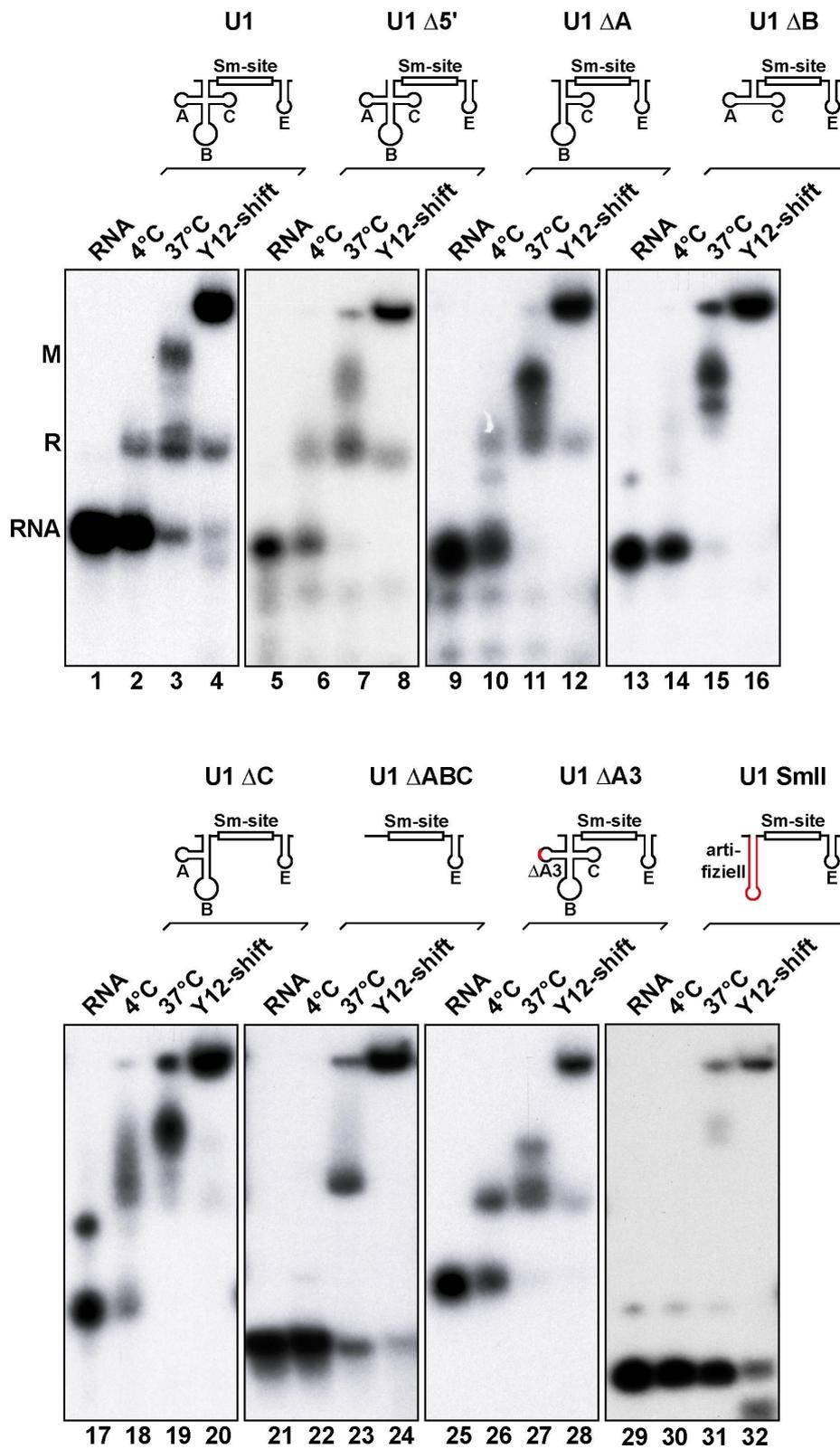


Abbildung 22: Autoradiographien der Zusammenlagerungsexperimente in Oocytenextrakt von *Xenopus laevis* mit U1 snRNA-Varianten, die Mutationen im 5-terminalen Bereich tragen.

vorhanden sind. Der Nachweis von Sm-Proteinen in den RNP-Komplexen erfolgte wie in Kapitel 7.1.2 durch einen sogenannten „Y12-Supershift“ (Spur 4). Zudem zeigt eine 4°C-Kontrolle, dass die Reaktion Energie-abhängig läuft (Spur 2).

Bei der Inkubation der verschiedenen Deletionsmutanten in *X. laevis* Eiextrakt zeigte sich, dass die Entfernung des einzelsträngigen 5'-Überhangs der U1 snRNA (U1Δ5') keinen Einfluss auf die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen hatte (Abbildung 22, Spuren 5 bis 8). Die von Jarmolowski et al. (1993) beobachtete leichte Beeinträchtigung der Reaktion konnte hier nicht bestätigt werden. Die drei RNAs U1ΔA, U1ΔB und U1ΔC konnten in diesem Assay auch erfolgreich mit Sm-Proteinen beladen werden. In allen drei Fällen wurde die gesamte RNA in den M-Komplex verlagert (Spuren 9 bis 12, 13 bis 16 und 17 bis 20). Die intermediären R-Komplexe dagegen waren bei allen drei Mutanten nicht oder nur relativ schwach vorhanden. Bei U1ΔA und U1ΔB überrascht dies nicht, da die stem-loops A und B für die Bindung der U1-spezifischen Proteine zuständig sind. Mit der Deletion dieser stem-loops geht daher die Bindung der entsprechenden Proteine verloren. Das Fehlen der R-Komplexe bei U1ΔC war dagegen unerwartet. Die von Jarmolowski et al. (1993) postulierte Verringerung der Effizienz der Zusammenlagerungsreaktion bei U1ΔC konnte hier nicht beobachtet werden. Genausogut wie die stem-loops A, B und C einzeln konnten auch alle drei stem-loops zugleich entfernt werden, ohne die Zusammenlagerung der RNA mit Sm-Proteinen zu beeinträchtigen (U1ΔABC, Spuren 21 bis 24). Dabei entstand nur ein einziger, durch Y12 retardierbare Komplex, da die gesamten Bindestellen für U1-spezifische Proteine entfernt wurden und deshalb lediglich die Sm-Proteine binden können. Ebenso wurde auch die U1ΔA3 RNA, welche 3 Nukleotidaustausche in stem-loop A besitzt und die Proteine U170K und U1C nicht mehr binden kann, mit Sm-Proteinen beladen (Spuren 25 bis 28). Selbst eine Mutante, bei der die stem-loops A, B und C durch einen artifiziellen stem-loop ersetzt wurden (U1SmII) konnte mit Sm-Proteinen beladen werden, wobei jedoch die Effizienz der Reaktion stark reduziert war (Spuren 29 bis 32).

Zusammengenommen zeigen diese Experimente, dass in *X. laevis* Eiextrakt weder der 5'-Überhang, noch die stem-loops A, B oder C für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen notwendig sind.

Bei diesen Ergebnissen muss berücksichtigt werden, dass es sich bei *X. laevis* Eiextrakt um ein sehr spezielles experimentelles System handelt. Zum einen ist *X. laevis* eine evolutionär relativ weit vom Menschen entfernten Spezies. Zum anderen stammt der Eiextrakt aus Oocyten, die aufgrund ihrer Speicherfunktion für die ersten Entwicklungsstufen des Embryos eine sehr spezialisierte Zusammensetzung aufweisen.

Um diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, wurden die Experimente auch in HeLa Cytoplasmaextrakt durchgeführt (Abbildung 23). In den Spuren 1 bis 4 ist wieder die Zusammenlagerung der Wildtyp U1 snRNA zu sehen. Sie unterscheidet sich kaum von der in *X. laevis* Eiextrakt, allerdings entsteht hier nur ein R-Komplex.

Die Zusammenlagerungs-Experimente mit den Deletionsmutanten erbrachten ähnliche Resultate wie in *X. laevis* Eiextrakt. Weder die Deletion von stem-loop A (U1 Δ A), C (U1 Δ C) oder des 5'-terminalen Überhangs (U1 Δ 5') beeinträchtigte die Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen (Spuren 5 bis 8, 9 bis 12 und 17 bis 20). Lediglich die RNAs U1 Δ B und U1 Δ ABC zeigten eine leicht reduzierte Effizienz der Reaktion (Spuren 13 bis 16 und 21 bis 24). Im Gegensatz zu *X. laevis* Eiextrakt konnten jedoch die RNAs U1 Δ A3 und U1SmII im HeLa Cytoplasmaextrakt nicht mit Sm-Proteinen beladen werden (Spuren 25 bis 28 und 29 bis 32).

In HeLa Cytoplasmaextrakt ist wie in *X. laevis* keine der 5'-terminalen Strukturen für die UsnRNP-Zusammenlagerung essentiell, lediglich stem-loop B scheint in HeLa die Effizienz zu beeinträchtigen. Unterschiede zwischen den beiden Testsystemen bestehen vor allem bezüglich der Substitutionsmutante U1 Δ A3 und U1SmII.

Von Yong et al. (2002) wurde für den stem-loop A der U1snRNA eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem SMN-Komplex beschrieben und dessen Notwendigkeit bei der Zusammenlagerung des UsnRNPs postuliert. Unsere zuvor beschriebenen Ergebnisse stehen diesen Beobachtungen entgegen. Die Deletion von stem-loop A hatte weder in *X. laevis* Eiextrakt noch in HeLa Cytoplasmaextrakt Einfluss auf die Zusammenlagerungsreaktion. Aus diesem Grund wurde für U1, U1 Δ A und U1 Δ ABC

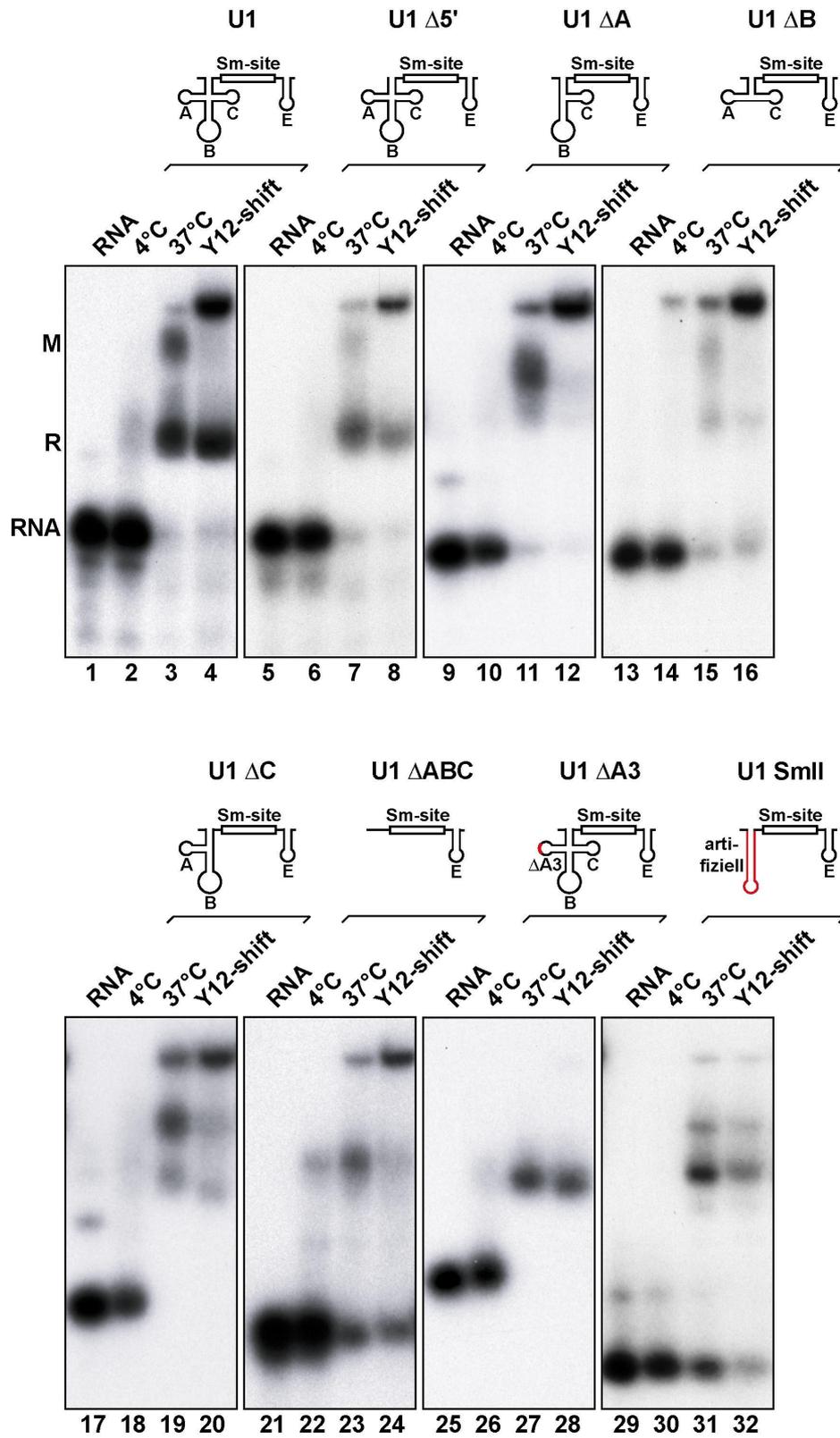


Abbildung 23: Autoradiographien der Zusammenlagerungsexperimente in HeLa Cytoplasmaextrakt mit U1 snRNA-Varianten, die Mutationen im 5'-terminalen Bereich tragen.

eine Kinetik der Zusammenlagerungs-Reaktion angefertigt, um zu testen, ob die Deletion von stem-loop A womöglich Effizienz oder Geschwindigkeit der Partikelformation beeinträchtigt. Dazu wurden die RNAs jeweils für eine, fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Minuten mit *X. laevis* Eiextrakt oder HeLa Cytoplasmaextrakt inkubiert und die Ansätze in nativen RNA-Gelen aufgetrennt.

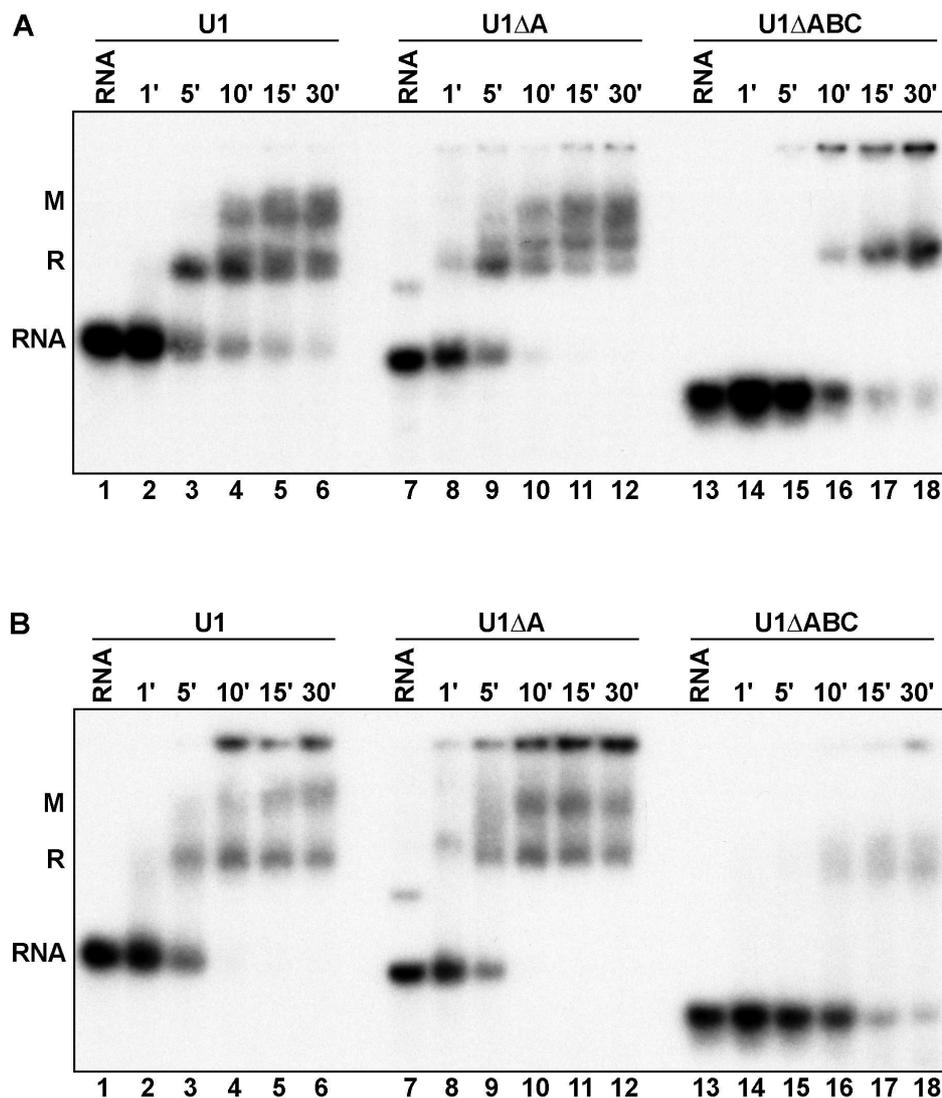


Abbildung 24: Zeitverlauf der Zusammenlagerung von Wildtyp U1, U1ΔA und U1ΔABC snRNA in **(A)** *X. laevis* Eiextrakt und **(B)** HeLa Cytoplasmaextrakt.

Sowohl in *X. laevis* als auch in HeLa Extrakt fand in den ersten fünf Minuten eine starke Verlagerung der U1 snRNA in den Komplex R statt, nach zehn Minuten

befand sich schon ein beträchtlicher Teil im Komplex M (Abbildung 24 A und B, jeweils Spuren 1 bis 4). Die Verlagerung der RNA in den Komplex M nahm mit der Zeit weiter zu (jeweils Spuren 5 und 6), wobei sich in diesem experimentellen Ansatz nie die gesamte RNA in den Komplex M bringen ließ (Zugabe größerer Mengen Extrakt führt zu verstärkter Bildung hochmolekularer Aggregate in den Taschen des Gels). Die U1 Δ A snRNA zeigte nahezu das gleiche Verhalten wie die U1 snRNA: Bildung des Komplexes R innerhalb von fünf Minuten, Auftauchen des Komplexes M nach zehn Minuten (Abbildung 24 A und B, jeweils Spuren 7 bis 12). Auch in der Menge der gebildeten Komplexe stand die U1 Δ A snRNA keineswegs der Wildtyp U1 snRNA nach. Es fand lediglich eine leichte Verschiebung vom R1- in den R2-Komplex statt. Bei der U1 Δ ABC snRNA entstand wie zuvor bereits erläutert nur ein Komplex, da aufgrund der Deletion der Bindestellen für U1-spezifische Proteine keine Intermediär-Komplexe entstehen können. Dieser Komplex entspricht in seiner Zusammensetzung weder dem Komplex R, noch dem Komplex M. Da er jedoch den Zeitpunkt der Assoziation der RNA mit Sm-Proteinen anzeigt, kann man ihn in diesem Zusammenhang als das Äquivalent zu Komplex M betrachten. Demnach fand auch die Zusammenlagerung der U1 Δ ABC RNA mit Sm-Proteinen in beiden Extrakten nach bereits zehn Minuten statt (Abbildung 24 A und B, jeweils Spuren 13 bis 16), wenn auch in der Menge etwas schwächer als bei U1 snRNA. In *X. laevis* Eiextrakt assoziierte bei steigender Inkubationsdauer der größte Teil der U1 Δ ABC RNA mit Sm-Proteinen (Abbildung 24 A, Spuren 17 und 18), während die Reaktion in HeLa Extrakt nach fünfzehn Minuten stagnierte und die Gesamtmenge an assemblierter RNA etwas hinter der der anderen RNAs zurückblieb (Abbildung 24 B, Spuren 17 bis 18). Diese leicht verringerte Effizienz ist konsistent damit, dass auch U1 Δ B in HeLa etwas schwächer mit Sm-Proteinen beladen wird.

Die durchgeführten Zeitverlaufsexperimente zeigen, dass die Deletion von stem-loop A sowohl in *X. laevis* als auch in HeLa Extrakt keinen Einfluss auf Effizienz und Geschwindigkeit der Zusammenlagerungsreaktion hat. Die Entfernung aller drei stem-loops A, B und C verursacht in *X. laevis* Eiextrakt keine Beeinträchtigung der Effizienz und hat allenfalls geringen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reaktion. In HeLa Extrakt zeigt die Zusammenlagerung von U1 Δ ABC sowohl eine etwas

geringere Geschwindigkeit als auch eine leicht schlechtere Effizienz. Die Ergebnisse von Yong et al. (2003), dass der stem-loop A für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen nötig sei, konnten somit nicht bestätigt werden.

7.4.2 Die Sm-site ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Bildung eines stabilen Sm-cores

Als nächstes wurde die Rolle der Sm-site in der UsnRNP-Synthese untersucht. Dazu wurden die U1mutSm RNA, die Substitutionen im Bereich der Sm-site enthält und keine Sm-Proteine mehr binden kann (Hamm et al., 1990), sowie ein RNA-Oligonukleotid, das lediglich aus der Sm-site besteht (Raker et al., 1999), eingesetzt.

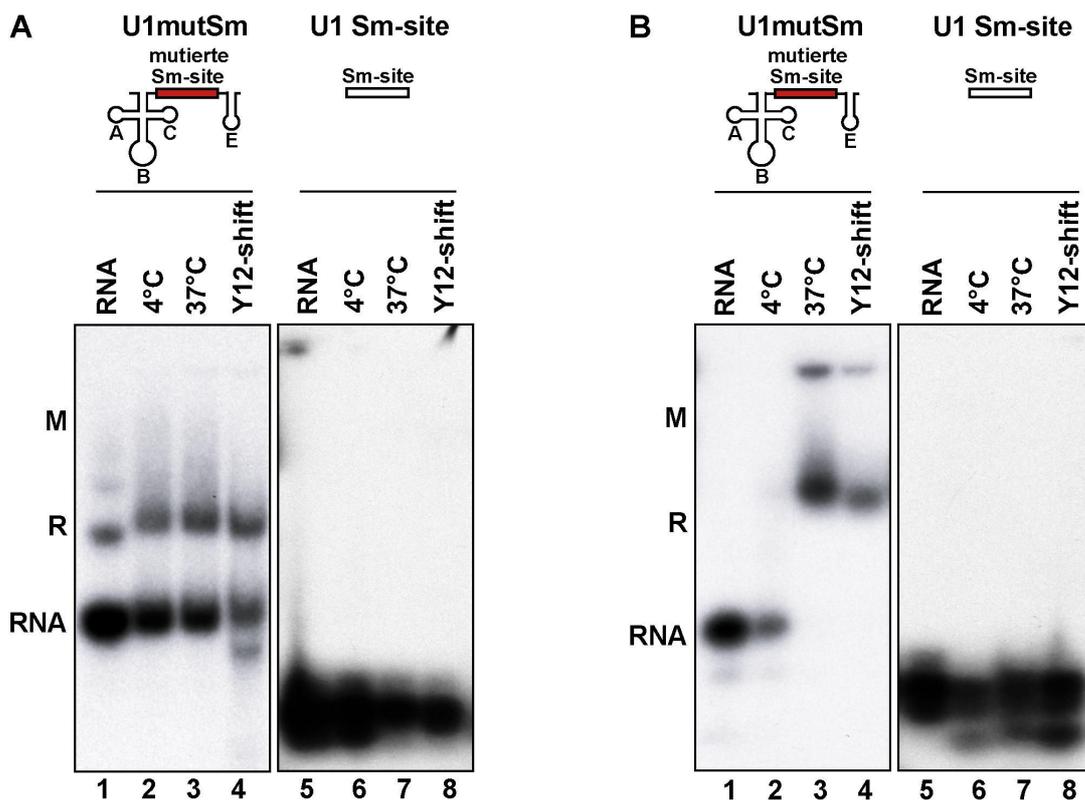


Abbildung 25: Autoradiographien der Zusammenlagerungsexperimente mit U1 snRNA-Varianten der Sm-site. **(A)** in Oocytenextrakt von *Xenopus laevis*; **(B)** in HeLa Cytoplasmaextrakt

Die U1mutSm snRNA wurde erwartungsgemäß sowohl in *X. laevis* wie auch in HeLa-Extrakt nicht mit Sm-Proteinen beladen (Abbildung 25 A und B, jeweils Spuren 1 bis 4). Ebenso konnte mit dem Sm-site-Oligonukleotid in beiden Testsystemen kein Sm-core gebildet werden (Abbildung 25 A und B, jeweils Spuren 5 bis 8), obwohl isolierte Sm-Proteine *in vitro* an das Sm-site-Oligonukleotid binden (Raker et al., 1999).

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Sm-site notwendig, aber alleine nicht ausreichend für die Bildung des Sm-cores in *X. laevis* und HeLa Extrakten ist.

7.4.3 Die 3'-terminale Schleife ist für die UsnRNP-Zusammenlagerung notwendig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Sm-site, nicht aber die 5'-terminale Domäne der U1 snRNA notwendig für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen ist, wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss des stem-loops E auf die Zusammenlagerung untersucht.

Wurde der gesamte 3'-terminalen stem-loop E (U1 Δ E) der U1 snRNA entfernt, führte dies sowohl in *X. laevis* Extrakt als auch in HeLa-Extrakt zu einer kompletten Inhibition der Zusammenlagerung (Abbildung 26 A und B, jeweils Spuren 1 bis 4). Verkürzte man stem-loop E auf die Hälfte der Länge (U1mutE), fand eine effiziente Beladung der RNA mit Sm-Proteinen in *X. laevis* Extrakt statt, in HeLa-Extrakt war die Effizienz dagegen leicht verringert (Abbildung 26 A und B, jeweils Spuren 5 bis 8). Ähnliche Resultate lieferte eine RNA, die nur einen einzelsträngigen, „halbierten“ stem-loop E (U1-3) besitzt (Abbildung 26 A und B, jeweils Spuren 9 bis 12). Auch diese Deletionsmutante wurde in *X. laevis* Extrakt sehr gut, in HeLa-Extrakt etwas schlechter mit Sm-Proteinen beladen. Bei einer Verdopplung von stem-loop E durch Duplikation (U1-4) verlief die Reaktion in beiden Extrakten hocheffizient (Abbildung 26 A und B, jeweils Spuren 13 bis 16).

Die Resultate aus Abbildung 26 zeigen, dass die Deletion von stem-loop E zu einer kompletten Inhibition der Sm-core Bildung führt. In *X. laevis* Eiextrakt reicht bereits

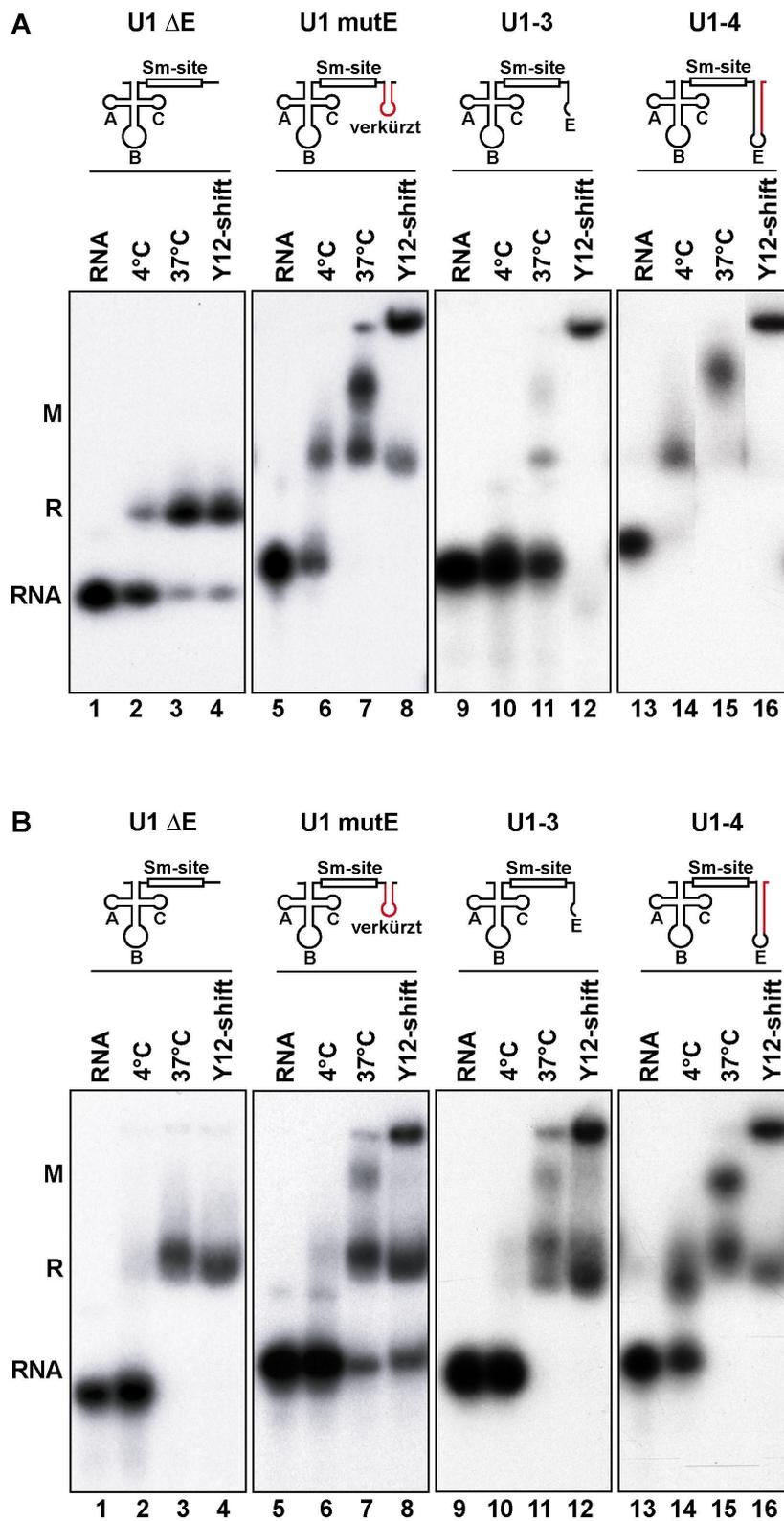


Abbildung 26: Autoradiographien der Zusammenlagerungsexperimente mit U1 snRNA-Varianten, die Mutationen im 3'-terminalen Bereich tragen. **(A)** in Oocytenextrakt von *Xenopus laevis*; **(B)** in HeLa Cytoplasmaextrakt

ein einzelsträngiger halbierter stem-loop E, um die Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen vollständig wieder herzustellen. In HeLa Cytoplasmaextrakt wird dies dagegen nur mit einem kompletten stem-loop E erreicht; sowohl bei Verkürzung, wie auch bei einzelsträngig halbiertem stem-loop E sinkt die Effizienz der Reaktion. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass stem-loop E hier nicht sequenz-spezifisch wirkt, sondern eine rein stabilisierende Funktion auf den Sm-Ring ausübt.

Zusammenfassend haben die in Abschnitt 7.4.1 bis 7.4.3 vorgestellten Experimente gezeigt, dass die minimal für die Sm-core-Zusammenlagerung erforderlichen Sequenzen der U1 snRNA aus einem 5'-terminalen Einzelstrang, der die Sm-site enthält, und einem sequenzunabhängigen 3'-terminalen stem-loop besteht. In *X. laevis* Eiextrakt reicht bereits ein einzelsträngiger halbierter stem-loop E als 3'-flankierende Sequenz.

7.4.4 Die U7opt RNA wird in HeLa Cytoplasmaextrakt effizient assembliert

In den Abschnitten 7.4.1 bis 7.4.3 wurde die Minimal-RNA für Bindung der Sm-Proteine in Zellextrakten bestimmt. Ein RNA, die diesen Anforderungen entspricht, ist die modifizierte U7opt snRNA (Abbildung 27 A). Die Wildtyp U7snRNA ist Teil des U7snRNPs und für die 3'-Endprozessierung der Histon-mRNA zuständig. Sie besteht im 5'-terminalen Bereich aus einer einzelsträngigen Sequenz, die eine U7-spezifische Sm-site enthält, gefolgt von einem 3'-terminalen stem-loop. Die U7 Sm-site wird durch den SMN-Komplex mit einem speziellen Sm-Ring beladen, der anstatt SmD1 und SmD2 die sogenannten „Like Sm“ (LSm)-Proteine 10 und 11 enthält (Pillai et al., 2003; Pillai et al., 2001). In diesem Versuch wurde die modifizierte RNA U7opt verwendet, bei der die U7 Sm-site gegen eine U1 Sm-site ausgetauscht wurde (Pillai et al., 2001). Diese RNA bindet dementsprechend den Sm-Ring der spleißosomalen UsnRNPs. Die U7opt snRNA erfüllt damit exakt die Minimal-Bedingungen für eine erfolgreiche Bildung des Sm-cores in Zellextrakten.

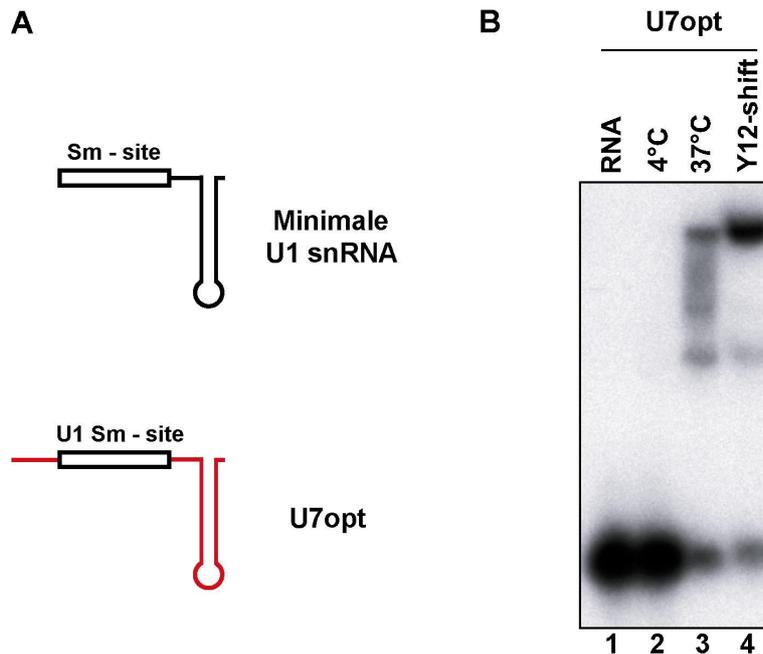


Abbildung 27: Zusammenlagerungsexperiment mit U7opt in HeLa Cytoplasmaextrakt

Radioaktiv markierte U7opt RNA wurde analog zu den vorherigen Experimenten einem Zusammenlagerungs-Assay in HeLa-Cytoplasmaextrakt unterzogen. Dabei zeigte sich eine effiziente Beladung der RNA mit Sm-Proteinen (Abbildung 27 B, Spuren 1 bis 4). Demnach wird eine RNA mit der zuvor bestimmten Minimal-Struktur (Sm-site mit 3'-terminalem stem-loop), aber völlig anderer Sequenz (abgesehen von der Sm-site) als Substrat für die Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen erkannt. Die Spezifität beruht hier also allein auf der Sequenz der Sm-site verbunden mit der Struktur eines terminalen stem-loops.

Damit bestätigt dieses Ergebnis die in den Abschnitten 7.4.1 bis 7.4.3 ermittelte Minimal-Anforderung an die RNA für eine Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen.

7.4.5 Die Zusammenlagerung der getesteten RNAs ist strikt abhängig vom SMN-Komplex

Es ist bekannt, dass Sm-Proteine *in vitro* spontan (Sumpter et al., 1992), in Zellen und Zellextrakten dagegen nur in Anwesenheit des SMN-Komplexes an U1 snRNA

binden (Fischer et al., 1997; Meister et al., 2001a). Um sicherzustellen, dass sich die verschiedenen in den Abschnitten 7.4.1 bis 7.4.4 verwendeten RNAs nicht spontan aufgrund einer Veränderung ihrer Struktur mit Sm-Proteinen zusammenlagern, wurden die Experimente für die meisten der RNAs in SMN-depletiertem HeLa Cytoplasmaextrakt wiederholt. Dazu wurde eine Hälfte des Extraktes mit einer anti-SMN(7B10)-gekoppelten Matrix inkubiert und so der SMN-Komplex quantitativ entfernt (Abbildung 28 A, Spur 2). Als Kontrolle wurde der andere Teil des Extraktes mit einer unspezifischen anti-GST-gekoppelten Matrix inkubiert (mock-depletiert, Abbildung 28 A, Spur 2). Die so behandelten Extrakte wurden für die Zusammenlagerungsexperimente eingesetzt.

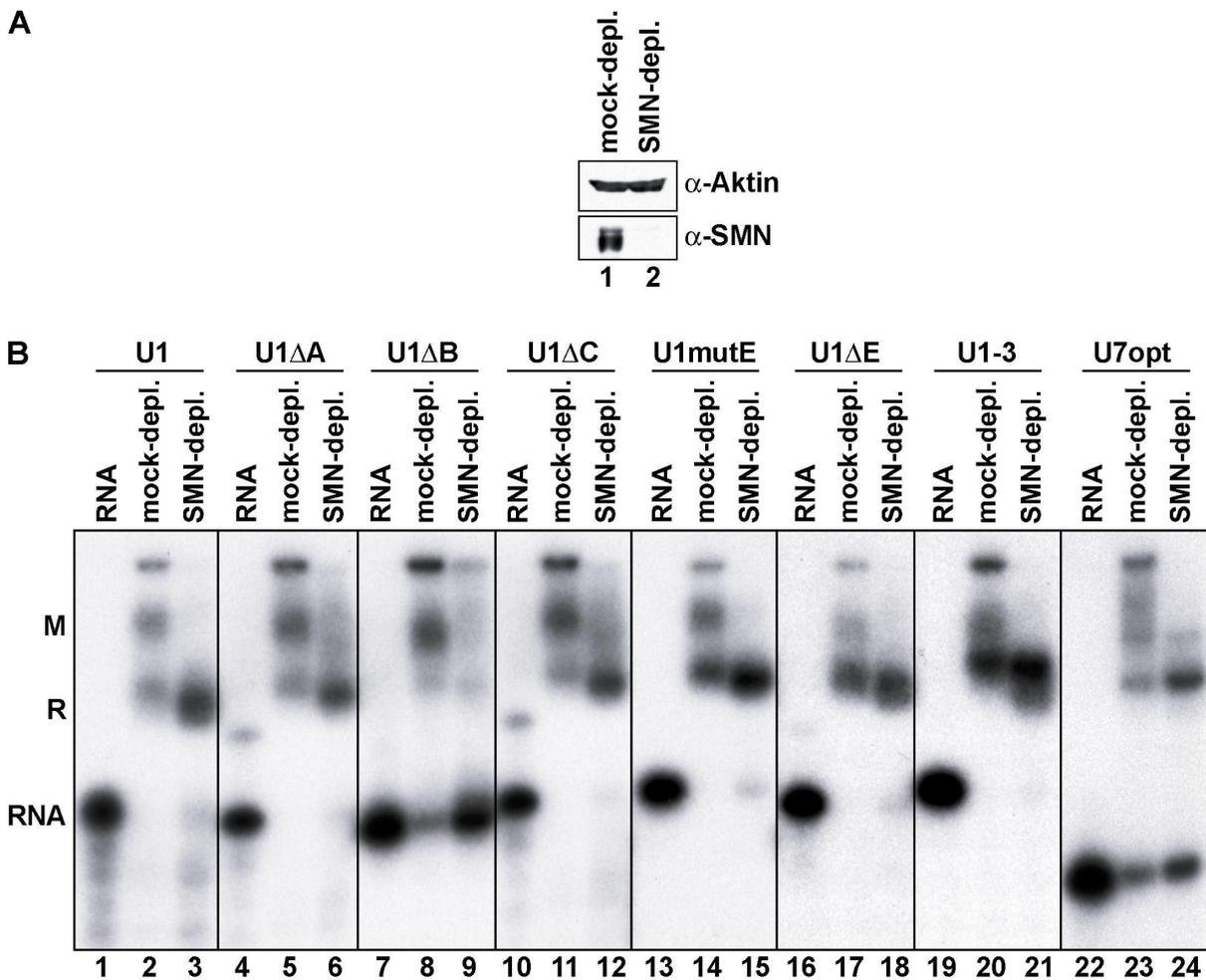


Abbildung 28: Zusammenlagerung verschiedener Deletionsmutanten der U1 snRNA in SMN- und mock-depletierten cytoplasmatischen Extrakten aus HeLa-Zellen. **(A)** Immunoblot gegen SMN und β -Aktin in mock- und SMN-depletiertem Extrakt; **(B)** Autoradiographien der Zusammenlagerungsexperimente

Die Autoradiographien zeigen, dass alle verwendeten RNAs im SMN-depletierten Extrakt kein Sm-core bilden konnten (Abbildung 28, Spuren 3, 6, 9, 12, etc.), während im mock-depletierten Extrakt eine Bindung der Sm-Proteine stattfand (Abbildung 28, Spuren 2, 5, 8, 11, etc.).

Die Beladung der getesteten RNAs mit Sm-Proteinen erfolgte also in strikter Abhängigkeit vom SMN-Komplex. Damit kann ausgeschlossen werden, dass sich bei einzelnen RNA-Mutanten spontan Sm-cores bildeten.

7.5 Der SMN-Komplex zeigt während des Zusammenlagerungs-Prozesses keine RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität

Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist noch unbekannt, wie der Transfer der Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf die snRNA genau vonstatten geht. Zwei mögliche Modelle wurden erörtert, bei denen die putative RNA-Helikase Gemin3 jeweils eine zentrale Rolle spielen könnte (siehe Kapitel 4.8). In dem ersten Modell würde der Ring der Sm-Proteine bereits am SMN-Komplex geschlossen vorliegen und die snRNA anschließend durch den Kanal des Ringes „gefädelt“ werden. Dafür wäre eine Entwindung der stem-loops aus sterischen Gründen nötig. Gemin3 könnte diese Funktion übernehmen und die Sekundärstruktur der RNA auflösen. In einem zweiten Modell würden die Sm-Proteine in einer offenen Konformation am SMN-Komplex gehalten und sich direkt um die Sm-site der RNA zu einem Ring schließen. In diesem Falle könnte Gemin3 als eine RNPase wirken, die auf das Binden der RNA hin eine Konformationsänderung des SMN-Komplexes oder der Sm-Proteine induziert und so den Ringschluss katalysiert.

Im folgenden Kapitel sollte untersucht werden, ob Gemin3 im Kontext des SMN-Komplexes eine RNA-Doppelstrang-entwindende Funktion ausübt. Für rekombinant hergestelltes Gemin3 konnte eine solche „klassische“ Helikaseaktivität *in vitro* mit artifiziellen Substraten gezeigt (Yan et al., 2003), *in vivo* jedoch noch nicht bestätigt

werden. Charakteristisch für viele RNA-Helikasen ist ihre - im Vergleich zu DNA-Helikasen - geringe Prozessivität. Würde Gemin3 tatsächlich die Auflösung von Sekundärstrukturen z.B. der U1 snRNA katalysieren, erschiene ein Angriff vom 3'-Ende her wahrscheinlicher, weil dort lediglich acht Basenpaare in stem-loop E entwunden werden müssten, um den Weg zur Sm-site freizumachen. Ein Angriff vom 5'-Terminus her wäre dagegen sehr unwahrscheinlich, da insgesamt 35 Basenpaare in den loops A, B und C getrennt werden müssten.

Daher wurde für die folgenden Experimente eine verkürzte Variante der U1snRNA, die U1-3 RNA hergestellt. Dieser fehlt der komplementäre 3'-Bereich des stem-loops E ab Nukleotid 149. Die fehlende Sequenz wurde durch Hybridisierung mit einem entsprechenden radioaktiv markierten RNA-Oligonukleotid ergänzt (Abbildung 29 A). Diese U1-3/Oligonukleotid-Duplex (der Einfachheit halber folgend mit U1-3-Duplex bezeichnet) wurde dann in einem Helikaseassay eingesetzt. Dieser Assay verlief genau wie die in den Abschnitten 7.4.1 bis 7.4.5 durchgeführten Zusammenlagerungs-Assays. Zur Überprüfung der Helikaseaktivität wurde das Laufverhalten des markierten Oligonukleotids im nativen Gelsystem verfolgt. Würde stem-loop E tatsächlich während der Zusammenlagerungsreaktion entwunden, müsste sich das Oligonukleotid von der snRNA lösen und schneller im Gel wandern. Durch Zugabe eines etwa hundertfachen Überschusses eines Kompetitor-Oligonukleotids wurde eine Rehybridisierung des radioaktiv markierten Oligonukleotids mit der U1-3 RNA verhindert.

Zunächst wurde ein solcher Helikase- bzw. Zusammenlagerungs-Assay mit der U1-3-Duplex in *X. laevis* Eiextrakt durchgeführt (Abbildung 29 B). Als Marker sind in den Spuren 1 und 2 des nativen RNA-Gels (Abbildung 29 B) das RNA-Oligonukleotid und die U1-3-Duplex aufgetragen. Zur Bestimmung des Hintergrundes an Dissoziation wurde die Duplex mit dem Kompetitor-Oligonukleotid bei 30°C in PBS (Abbildung 29 B, Spur 3) und bei 4°C in *X. laevis* Eiextrakt (Abbildung 29 B, Spur 4) inkubiert. Nur ein geringer Prozentsatz der Duplex dissoziierte in PBS; in der 4°C-Kontrolle in Extrakt trat so gut wie keine Dissoziation auf. Wurde die Duplex bei Raumtemperatur in Eiextrakt inkubiert, fand die typische Zusammenlagerungsreaktion mit Bildung der R- und M-Komplexe statt (Abbildung 29 B, Spuren 5 und 6). Dabei zeigte sich keine

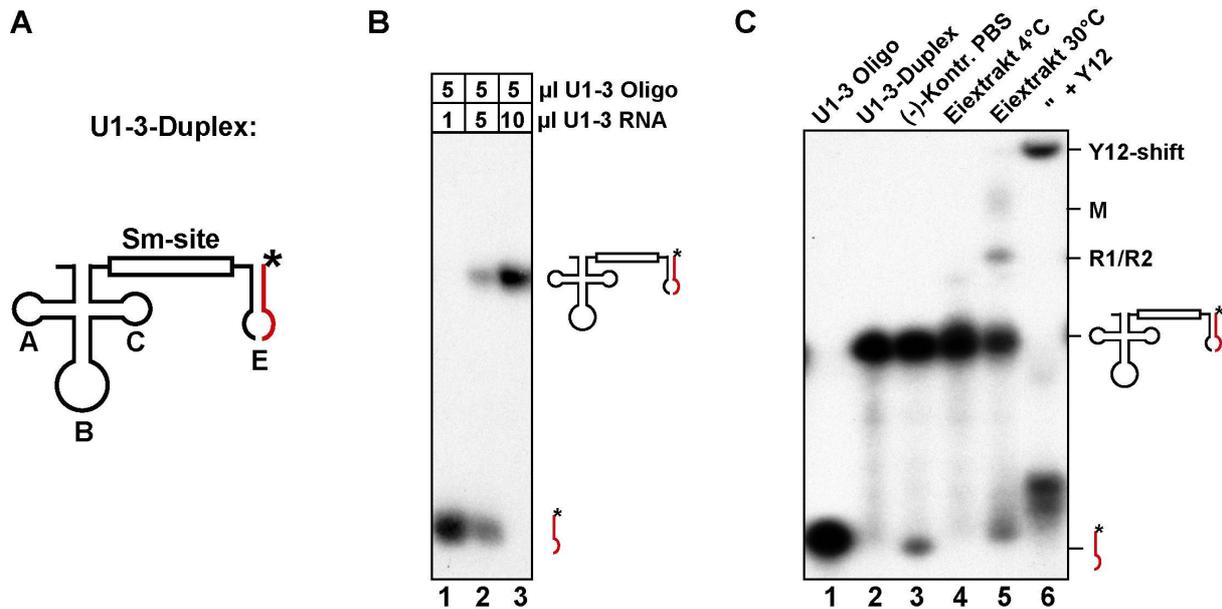


Abbildung 29: Stem-loop E der U1 snRNA wird während der UsnRNP-Zusammenlagerung in *X. laevis* Eiextrakt nicht entwunden. Helikase-Experiment mit einer U1 snRNA-Mutante mit verkürzter 3'-terminaler Schleife (U1-3), die durch Hybridisierung mit einem komplementären RNA-Oligonukleotid wieder ergänzt wurde. **(A)** Schema der U1-3-Duplex: u1-3 RNA in schwarz, radioaktiv markiertes (*) U1-3-Oligonukleotid in rot, **(B)** Natives RNA-Gel der Hybridisierung von U1-3 RNA und radioaktiv markiertem U1-3 Oligonukleotid **(C)** Helikaseassay in *X. laevis* Eiextrakt. Spur 1: U1-3 Oligonukleotid alleine, Spur 2: U1-3-Duplex alleine, Spur 3: (-)-Kontrolle, U1-3-Duplex bei 30°C in PBS (mit Kompetitor), Spur 4: (-)-Kontrolle U1-3-Duplex bei 4°C in Eiextrakt (mit Kompetitor), Spur 5: U1-3-Duplex bei 30°C in Eiextrakt (mit Kompetitor), Spur 6: Y12-Supershift zu Spur 5.

erhöhte Dissoziation der Duplex: die Menge an freigesetztem Oligonukleotid lag nicht über denen der Negativkontrollen in den Spuren 3 und 4. Die komplementierte U1-3 RNA kann also mit Sm-Proteinen beladen werden, ohne dass der stem-loop E entwunden wird. Dieses Ergebnis legte nahe, dass Gemin3 im Rahmen der UsnRNP-Zusammenlagerung keine RNA-Doppelstrang entwindende Funktion an stem-loop E ausübt.

Aus den Zusammenlagerungsexperimenten in Abschnitt 7.4.3 ging hervor, dass für stem-loop E leichte Unterschiede bezüglich der UsnRNP-Zusammenlagerung zwischen dem *X. laevis* und HeLa Extrakt bestehen. Während in *X. laevis* Eiextrakt ein einzelsträngiger halbiertes stem-loop E für eine vollständige Beladung der RNA mit Sm-Proteinen reichte, musste in HeLa Cytoplasmaextrakt ein kompletter stem-loop E vorhanden sein. Möglicherweise spielt dieser Unterschied auch in Bezug auf strukturelle Veränderungen der RNA während der Zusammenlagerungsreaktion eine

Rolle. Aus diesem Grunde sollte der Versuch aus Abbildung 29 B in HeLa Extrakt wiederholt werden. Da die unspezifische Hintergrundaktivität der im HeLa Cytoplasmaextrakt enthaltenen Helikasen jedoch zu hoch war, lieferte dieser Ansatz keine auswertbaren Ergebnisse. Deshalb wurden die Experimente mit isoliertem SMN- sowie PRMT5/SMN-Komplex durchgeführt. Dazu wurden die Komplexe mittels Immunpräzipitation von SMN (7B10-gekoppelte Sepharosematrix) bzw. pICln (α -pICln-gekoppelte Sepharosematrix) aus HeLa Cytoplasmaextrakt aufgereinigt (Abbildung 30 A, Spuren 2 und 3). Als Negativ-Kontrolle wurde eine mit FLAG-Antikörper gekoppelte Sepharosematrix parallel der gleichen Prozedur unterzogen (Abbildung 30 A, Spur 4). Anschließend wurde ein Helikaseassay mit den isolierten Komplexen unter Zugabe von Kompetitor-Oligonukleotid durchgeführt (Abbildung 30 B). In den Spuren 1 und 2 sind das U1-3 Oligonukleotid alleine sowie die U1-3-

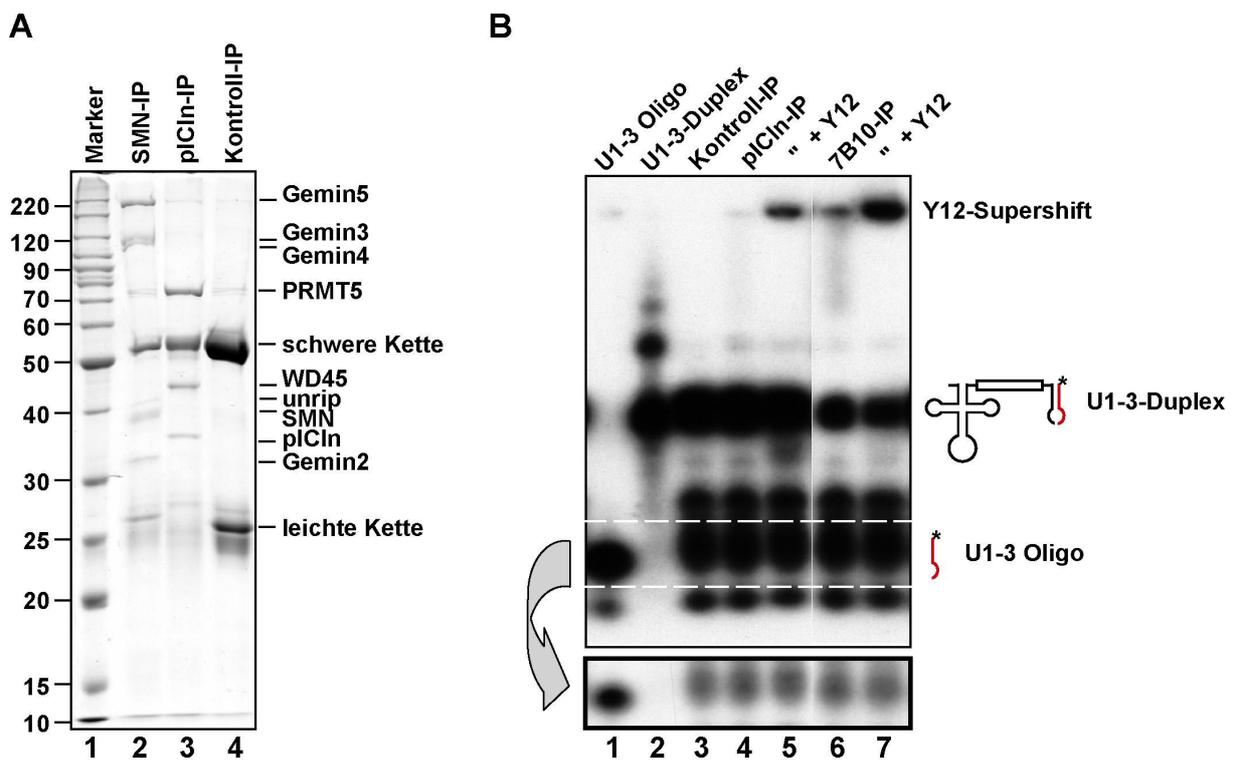


Abbildung 30: Stem-loop E der U1 snRNA wird während der UsnRNP-Zusammenlagerung durch isolierten SMN- oder PRMT5-Komplex nicht entwunden. (A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der immunpräzipitierten SMN- (Spur 2) und PRMT5-Komplexe (Spur 3), bzw. Kontroll-Immunpräzipitation aus HeLa-Zellen. **(B)** Natives RNA-Gel eines Helikaseassays mit den in (A) gezeigten isolierte SMN- und PRMT5-Komplexen. Spur 1: U1-3 Oligonukleotid, Spur 2: U1-3-Duplex, Spur 3: U1-3-Duplex mit Kontroll-IP inkubiert, Spur 4: U1-3-Duplex mit pICln-IP inkubiert, Spur 5: Y12-Supershift zu Spur 4, Spur 6: U1-3-Duplex mit SMN-IP inkubiert, Spur 7: Y12-Supershift zu Spur 4. Die untere Abbildung zeigt einen Ausschnitt der oberen Abbildung im Bereich des freien Oligonukleotids bei kürzerer Belichtung.

Duplex als Marker aufgetragen. Die U1-3-Duplex wird, wenn auch nicht vollständig, sowohl vom SMN- als auch vom PRMT5-Komplex mit Sm-Proteinen beladen (Spuren 4 und 5, sowie Spuren 6 und 7). Dabei tritt im Vergleich zur Kontroll-Immunpräzipitation keine erhöhte Dissoziation des Oligonukleotids von der U1-3 RNA auf (vergleiche im unteren Bildausschnitt von Abbildung 30 B Spuren 4 und 6 mit Spur 3).

Die U1-3-Duplex kann also von isolierten SMN- und PRMT5-Komplexen mit Sm-Proteinen beladen werden ohne den stem-loop E zu entwinden. Gemin3 übt demnach auch im HeLa-System keine RNA-Doppelstrang entwindende Funktion am stem-loop E im Zuge der UsnRNP-Zusammenlagerung aus.

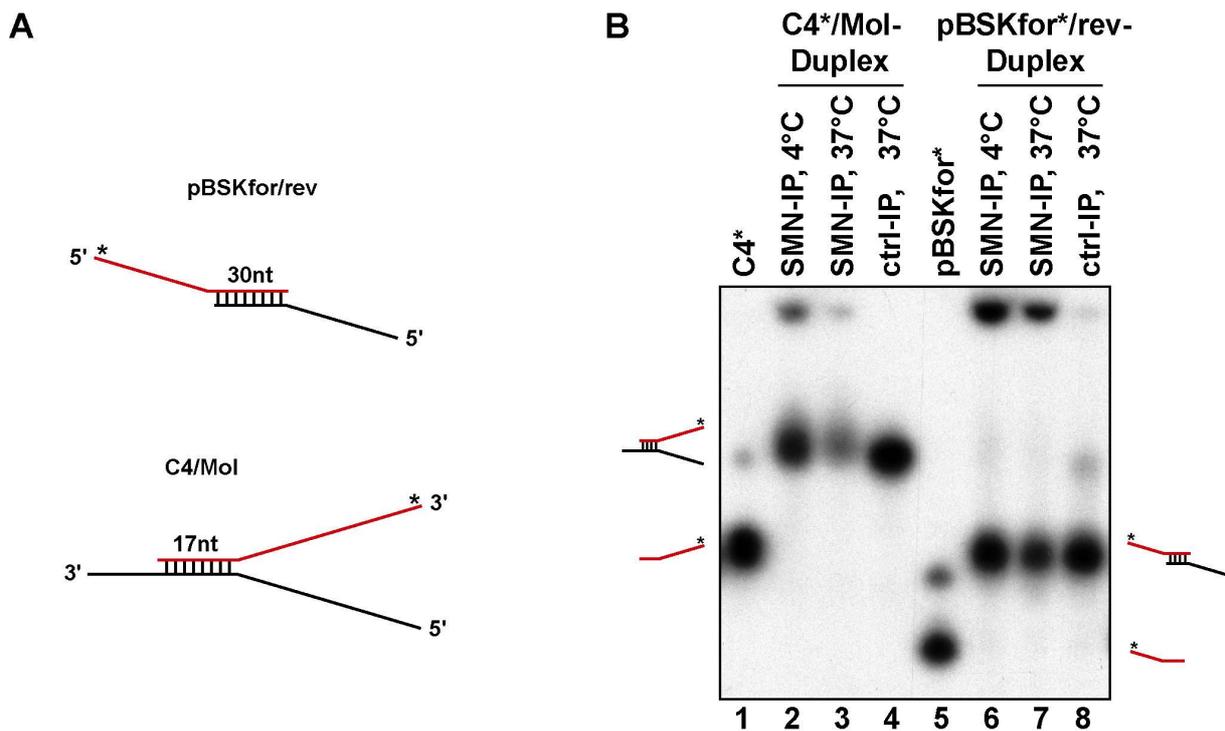


Abbildung 31: Isolierter SMN-Komplex kann auch artifizielle RNA-Duplices nicht entwinden. Die Duplices C4/Mol und pBluescriptfor/pBluescriptrev wurden mit SMN-, bzw. Kontroll-IPs inkubiert und anschließend in nativen RNA-Gelen aufgetrennt. Spuren 1 und 5: radioaktiv markierte Einzelstränge, Spuren 2 und 3: Inkubation von C4/Mol mit einer SMN-IP bei 4°C, bzw. 37°C, Spur 4: Inkubation von C4/Mol mit einer anti-FLAG Kontroll-IP bei 37°C, Spuren 6 und 7: Inkubation von pBSKfor/rev mit einer SMN-IP bei 4°C, bzw. 37°C, Spur 8: Inkubation von C4/Mol mit einer anti-FLAG Kontroll-IP bei 37°C. * markieren radioaktiv markierte Stränge.

Aus diesen Resultaten kann jedoch nicht geschlossen werden, dass der SMN-Komplex grundsätzlich keine Helikaseaktivität ausübt. In beiden Experimenten wurde die Helikaseaktivität speziell für den stem-loop E der U1 snRNA untersucht. Um zu klären, ob Gemin3 im Verbund des SMN-Komplexes eine von stem-loop E unabhängige RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität besitzt, wurden weitere Helikaseassays mit isoliertem SMN-Komplex und zwei artifiziellen Helikasesubstraten durchgeführt. C4/Mol stellt ein Standard-Helikasesubstrat dar und wurde bereits erfolgreich in Helikaseassays eingesetzt (Scheffner et al., 1989). pBSKfor/rev ist eine Duplex aus zwei revers transkribierten Sequenzen von einem pBluescript-Vektor. Beide Duplices sind als Schemata in Abbildung 31 A dargestellt.

Auch in diesen Experimenten wurde bei beiden Substraten weder mit der Kontroll- noch mit der SMN-Immunpräzipitation einzelsträngige RNA freigesetzt (Abbildung 31, Spuren 2 bis 4 und 6 bis 8). Der SMN-Komplex kann demnach auch keine Standard-Helikase-Substrate entwinden.

Die durchgeführten Helikaseexperimente in Extrakt und mit isolierten SMN- und PRMT5-Komplexen lassen vermuten, dass stem-loop E während der Zusammenlagerung des U1 snRNPs nicht entwunden werden muss. Auch für andere Helikasesubstrate zeigten weder der SMN- noch der PRMT5-Komplex eine RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität.

7.6 pICln kann unspezifische Aggregationen von Sm-Proteinen verhindern

In den vorangehenden Kapiteln wurden Spezifität und Mechanismus der Beladung von snRNAs mit Sm-Proteinen untersucht. In Kapitel 7.3 wurde gezeigt, dass Sm-Proteine unspezifisch auch an Nicht-snRNAs binden und die Spezifität für snRNAs in der Zelle vom SMN-Komplex sichergestellt wird. Allerdings wirft die Tatsache, dass Sm-Proteine an Nicht-snRNAs binden können ein weitergehendes Problem auf. Wie wird verhindert, dass die Sm-Proteine in der Zeit zwischen ihrer Synthese und der

Bindung an den SMN-Komplex unspezifisch mit „fremden“ RNAs aggregieren? Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden die Sm-Proteine vor der Rekrutierung durch den SMN-Komplex von pICln gebunden und im PRMT5-Komplex methyliert. pICln könnte dabei als eine Art Speicher-Protein fungieren, das die Sm-Proteine direkt nach oder sogar noch während der Translation bindet und sie dadurch zunächst „inaktiviert“. In diesem pICln-gebundenen Zustand würden sie dann solange verweilen, bis sie durch den SMN-Komplex übernommen werden. So könnte verhindert werden, dass die Sm-Proteine spontan und unspezifisch an Nicht-snRNAs binden. Diese Hypothese wird durch eine Studie von Pu et al. (1999) gestützt, die zeigt, dass in *Xenopus* Oocyten nahezu der gesamte Vorrat von Sm-Proteinen an pICln gebunden vorliegt.

7.6.1 pICln hemmt die spontane Bindung von Sm-Proteinen an RNA

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden sogenannte TPs („total protein“, Gesamtproteine aus isolierten humanen UsnRNPs gereinigt) mit rekombinantem pICln, immunpräzipitiertem pICln (PRMT5-Komplex) oder nur mit PBS, bzw. einer Kontroll-Immunpräzipitation vorinkubiert. Bei den Immunpräzipitationen handelte es sich um Hochsalzaufreinigungen (500mM NaCl), die keine oder nur kaum Sm-Proteine enthalten. Diese Ansätze wurden anschließend mit radioaktiv markierter U1 snRNA zusammengegeben und die Komplex-Bildung in einem nativen RNA-Gel überprüft.

Inkubierte man U1 snRNA mit TPs alleine oder TPs, die mit einer Kontroll-IP vorinkubiert wurden, bildeten sich die Komplexe R und M, sowie ein dritter niedermolekularer Komplex (Abbildung 32, Spur 2, bzw. Spur 5). Das Auftauchen eines zusätzlichen Komplexes könnte auf die Entstehung von Intermediärkomplexen hindeuten, da TPs nicht nur Sm-Proteine, sondern auch einige der UsnRNP-spezifischen Proteine enthalten. Wurden die TPs mit rekombinantem pICln vorinkubiert, konnte die Entstehung des Komplex M dagegen effizient unterbunden werden (Spur 3). Inkubierte man die TPs mit einer pICln-IP vor, kam es ebenso zu einer deutlich reduzierten Bildung von Komplex M (Spur 4). Dass die Bildung von

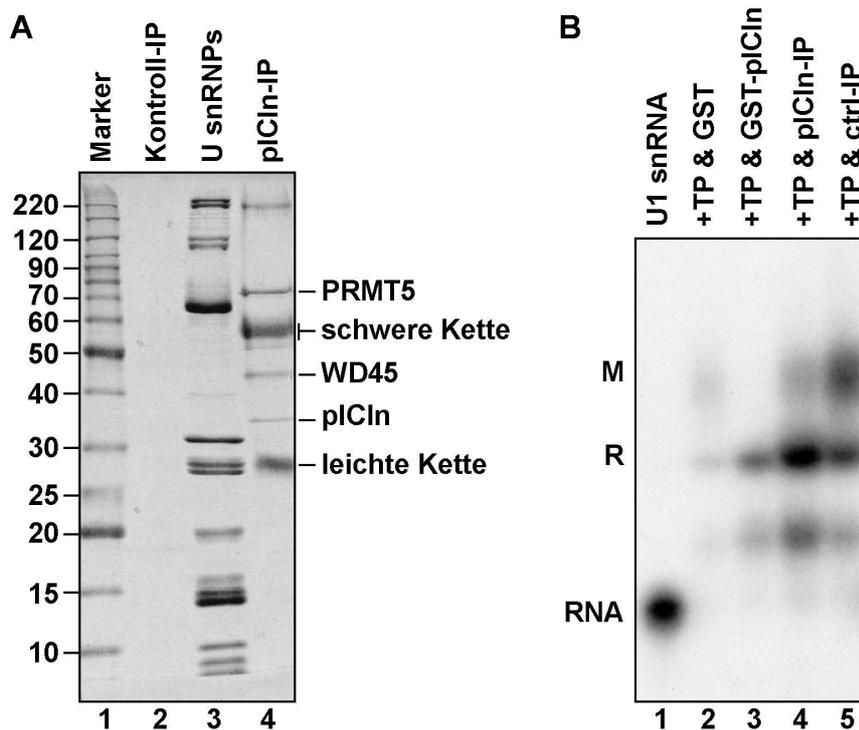


Abbildung 32: pICln kann die Bindung von Sm-Proteinen an U1 snRNA unterbinden. (A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der in (B) verwendeten Kontroll- (Spur 2) und pICln-Immunpräzipitationen (Spur 4), Spur 3 zeigt einen UsnRNP-Marker. **(B)** Inkubation von TPs mit U1 snRNA in An- und Abwesenheit von rekombinantem pICln oder isoliertem pICln-Komplex, bzw. einer Kontroll-IP.

Komplex M hier nicht vollständig inhibiert wurde, lag möglicherweise daran, dass der isolierte pICln/PRMT5-Komplex bereits einen gewissen Anteil endogene Sm-Proteine enthielt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bindung der Sm-Proteine durch pICln deren Assoziation mit U1 snRNA unterbinden oder zumindest stark beeinträchtigen kann.

7.6.2 pICln kann die Selbstaggregation von Sm-Proteinen unterdrücken

Sm-Proteine binden jedoch nicht nur spontan an RNAs. Sie zeigen *in vitro* auch eine starke Tendenz zur Selbstaggregation. Dies überrascht nicht, denn die Sm-Proteine bieten mit ihren Sm-folds hervorragende Interaktionsflächen untereinander. Es muss

daher in der Zelle einen Mechanismus geben, der diese Aggregationen verhindert und die Sm-Proteine für die nachfolgenden Reaktionen löslich hält. Da pICln bereits die Assoziation der Sm-Proteine mit RNAs unterbindet, liegt es nahe, dass es auch die Aggregation der Sm-Proteine untereinander verhindern könnte.

In den folgenden Experimenten sollte daher die Wirkung von pICln auf die Selbstaggregation der Sm-Proteine untersucht werden. Dazu wurden Löslichkeitsversuche für rekombinant exprimiertes SmB in HeLa-Zellextrakt und mit rekombinatem pICln durchgeführt. Die Löslichkeit wurde durch Zentrifugation der Proben bei 7000 x g und anschließender Trennung von Überstand und Pellet untersucht. Über einen Immunoblot konnten jeweils die SmB-Mengen in Pellet und Überstand densitometrisch bestimmt werden.

Zunächst wurde die Löslichkeit von rekombinatem His-SmB (3µg) in PBS und in HeLa Cytoplasmaextrakt (~300µg Gesamtprotein) bestimmt (Abbildung 33). Der Überstand des PBS-Ansatzes enthielt nur sehr geringe Mengen (11%) des Sm-Proteins, während der Großteil im Pellet zu finden war (Abbildung 33 A, Spuren 1 und 2 sowie Abbildung 33 B). Im Extrakt war dagegen ein Drittel (34%) des Proteins im Überstand gelöst, was einer Verdreifachung im Vergleich zur PBS-Probe bedeutet (Abbildung 33, Spuren 3 und 4 sowie Abbildung 33 B). Dass nur etwa ein Drittel der SmB-Menge im Überstand gelöst war lag vermutlich daran, dass die eingesetzte SmB-Menge immerhin etwa 1% der Gesamtprotein-Menge des HeLa-Extraktes entsprach.

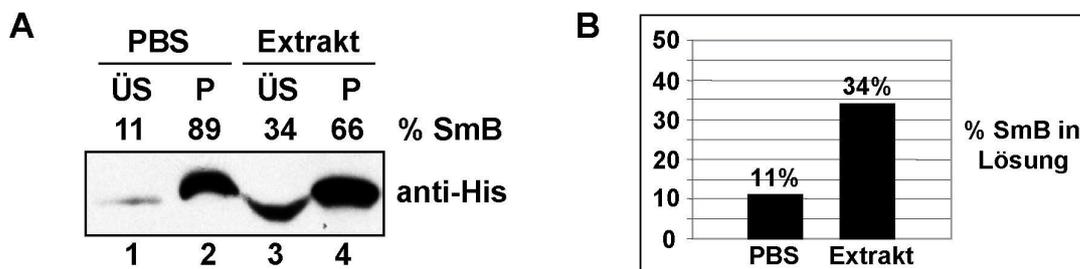


Abbildung 33: Die Löslichkeit von SmB ist in HeLa Cytoplasmaextrakt höher als in PBS. Pelletierungsexperiment von rekombinatem His-SmB in PBS und in HeLa-Cytoplasmaextrakt. **(A)** Immunoblot mit anti-His-Antikörper; ÜS = Überstand, P = Pellet; die Prozentzahlen über den Spuren geben jeweils die Menge SmB prozentual zur eingesetzten Gesamtmenge an (ÜS + P = 100%). **(B)** Diagramm der Ergebnisse aus (A).

Zum direkten Nachweis, dass pICln derjenige Faktor ist, der die Sm-Proteine in Lösung halten, bzw. bringen kann, wurde ein Löslichkeitstest ausschließlich mit rekombinanten Komponenten angesetzt. His-markiertes SmB (3µg) wurde dazu mit steigenden Mengen rekombinant hergestelltem GST-pICln (2µg, 6µg und 18µg) inkubiert und der zuvor angewendeten Pelletierungsprozedur unterzogen.

Im Immunoblot in Abbildung 34 A ist zu erkennen, dass die Menge SmB im Überstand mit steigender Menge pICln tatsächlich deutlich zunahm. Während bei Zugabe von 2µg pICln nur 17% SmB in Lösung ging, waren es bei 18µg pICln über 81% der eingesetzten Menge SmB (siehe Diagramm in Abbildung 34 B). Die Menge im Überstand gelösten rekombinanten SmBs steigt also proportional mit der Menge an vorhandenem GST-pICln.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente deuten darauf hin, dass pICln die Aggregation von Sm-Proteinen sowohl mit RNA als auch untereinander unterbinden kann. pICln könnte somit, neben dem SMN-Komplex, zur Spezifität der UsnRNP-Biogenese beitragen.

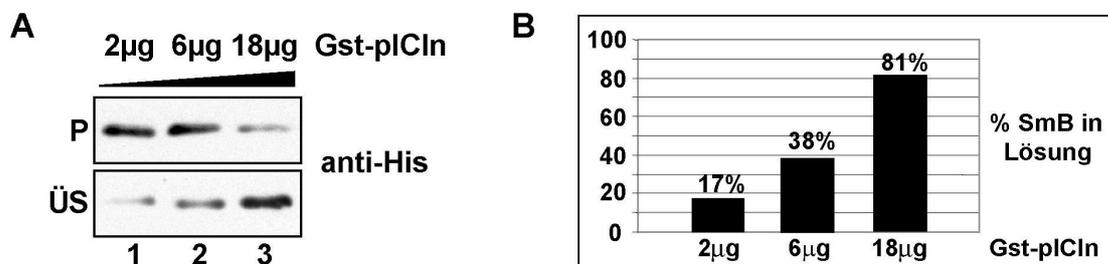


Abbildung 34: Rekombinantes pICln kann die Löslichkeit von SmB stark erhöhen. Pelletierungsexperiment von rekombinantem His-SmB nach Inkubation mit steigenden Mengen rekombinantem GST-pICln. **(A)** Immunoblot mit anti-His-Antikörper; ÜS = Überstand, P = Pellet. **(B)** Diagramm der Ergebnisse in (A), die Prozentzahlen über den Balken geben jeweils die Menge SmB im Überstand prozentual zur eingesetzten Gesamtmenge an.

7.7 Native Aufreinigung des SMN-Komplexes für die Kryoelektronenmikroskopie

Die biochemische Zusammensetzung des SMN-Komplexes ist inzwischen recht gut untersucht. Alle Hauptkomponenten des Komplexes sind bekannt und eine Fülle von weiteren Proteinen identifiziert, die mit dem SMN-Komplex interagieren können. Dennoch liegt die Funktion der meisten Komponenten noch im Dunkeln. Neben der biochemischen und funktionellen Charakterisierung der Proteine würde auch ein Modell der dreidimensionalen Struktur des Komplexes einen entscheidenden Schritt vorwärts bedeuten. Aus diesem Grunde sollte in dieser Arbeit eine Aufreinigungsstrategie etabliert werden, mit der sich der SMN-Komplex in nativer Form isolieren und in der Kryoelektronenmikroskopie abbilden lässt. Die Kryoelektronenmikroskopie erlaubt die Darstellung ganzer Komplexe in nativer Form und bei hoher optischer Auflösung (unter 10Å). Zum einen können so Komplexe abgebildet werden, die sich nicht kristallisieren lassen, zum anderen ermöglicht sie eine sehr schonende und „*in vivo*-nahe“ Abbildung der Probe. Die Arbeit am Elektronenmikroskop wurde in Zusammenarbeit mit Monika Golas aus der Arbeitsgruppe von Holger Stark am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

7.7.1 Etablierung eines Reinigungsprotokolls zur nativen Elution des SMN-Komplexes

Um den SMN-Komplex in nativer Form aus Zellextrakten zu isolieren, wurden Antikörper gegen ein Peptid der Aminosäuren 1 bis 20 des SMN-Proteins in Hasen hergestellt und über eine SMN-gekoppelte Sepharosematrix affinitätsgereinigt. Die Spezifität des Antikörpers wurde im Immunoblot verifiziert (Abbildung 35 A). Um bei der Peptid-Elution möglichst hohe Ausbeuten des SMN-Komplexes zu erreichen, wurden Testelutionen unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt.

Dazu wurde der SMN-Komplex mit einer Antikörper-gekoppelten Protein G-Sepharose-Matrix aus HeLa Cytoplasmaextrakt isoliert (1 Stunde, 4°C). Nach

viermaligem Waschen mit PBS/0,01%Igepal wurden Elutionen mit einer Konzentration von 1µg/µl SMN1-20-Peptid in folgenden Puffer durchgeführt:

PBS/0,01% Igepal, 150mM NaCl, pH 6,5

PBS/0,01% Igepal, 150mM NaCl, pH 8,5

PBS/0,01% Igepal, 300mM NaCl, pH 6,5

PBS/0,01% Igepal, 300mM NaCl, pH 8,5

Die Elutionen erfolgten für eine Stunde bei 4°C. Die Eluate wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran geblottet. Die Ausbeute wurde mittels Immunoblot gegen SMN und die Sm-Proteine bestimmt (Abbildung 35 B).

Bei einer Salzkonzentration von 300mM NaCl und einem pH von 8,5 konnte die größte Menge an SMN-Komplex eluiert werden (Abbildung 35 B, Spur 4). In Spur 5 ist die Nachelution der Antikörper-Matrix aus Spur 4 mit Glycin pH 2,3 gezeigt. Etwa die Hälfte des gebundenen SMN-Proteins wurde durch das Peptid eluiert (vergleiche Spuren 4 und 5).

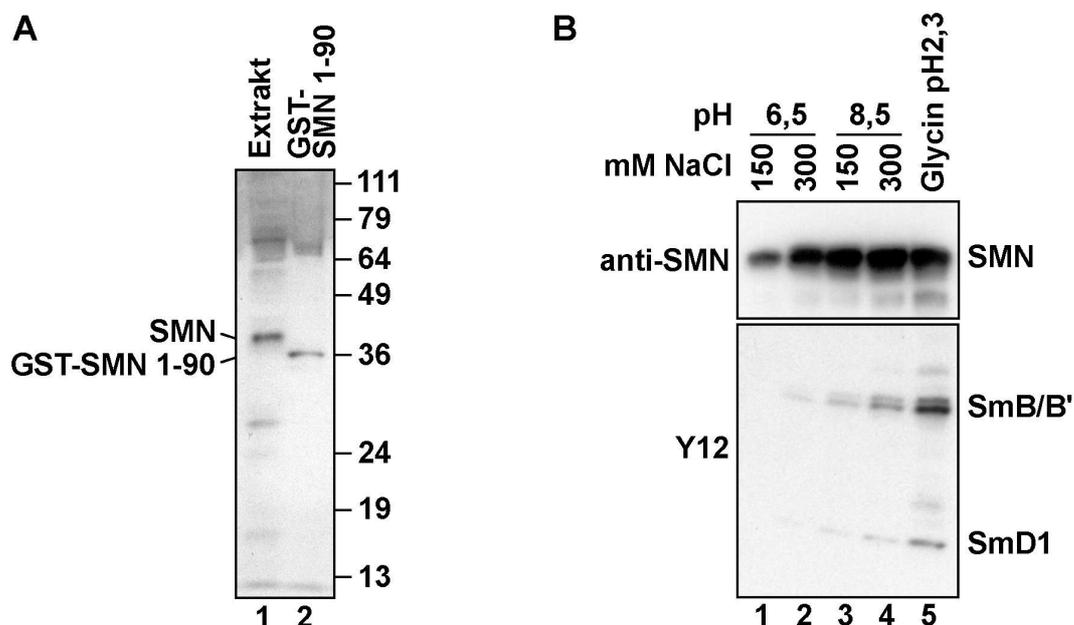


Abbildung 35: (A) Affinitäts-gereinigter Antikörper im Immunoblot mit HeLa Cytoplasmaextrakt und GST-SMN1-90. (B) Peptid-Elution des SMN-Komplexes unter verschiedenen pH- und Salzbedingungen. Immunoblot gegen SMN (7B10-Antikörper, oberer Teil) und Sm-Proteine (Y12-Antikörper, unterer Teil).

Um Verunreinigungen aus der Probe besser zu entfernen wurde ein erweitertes Elutionsschema entwickelt, das in Abbildung 36 graphisch dargestellt ist. Nach der Immunpräzipitation und intensivem Waschen wurden zwei aufeinander folgende Vorelutionsschritte mit einem „fremden“ Peptid (FMR1-20) durchgeführt. Der hohe Überschuss dieser Peptide sollte unspezifisch an Matrix oder Antikörper gebundene Proteine verdrängen. Nach weiterem ausgiebigem Waschen wurde dann der SMN-Komplex durch das SMN1-20-Peptid eluiert.

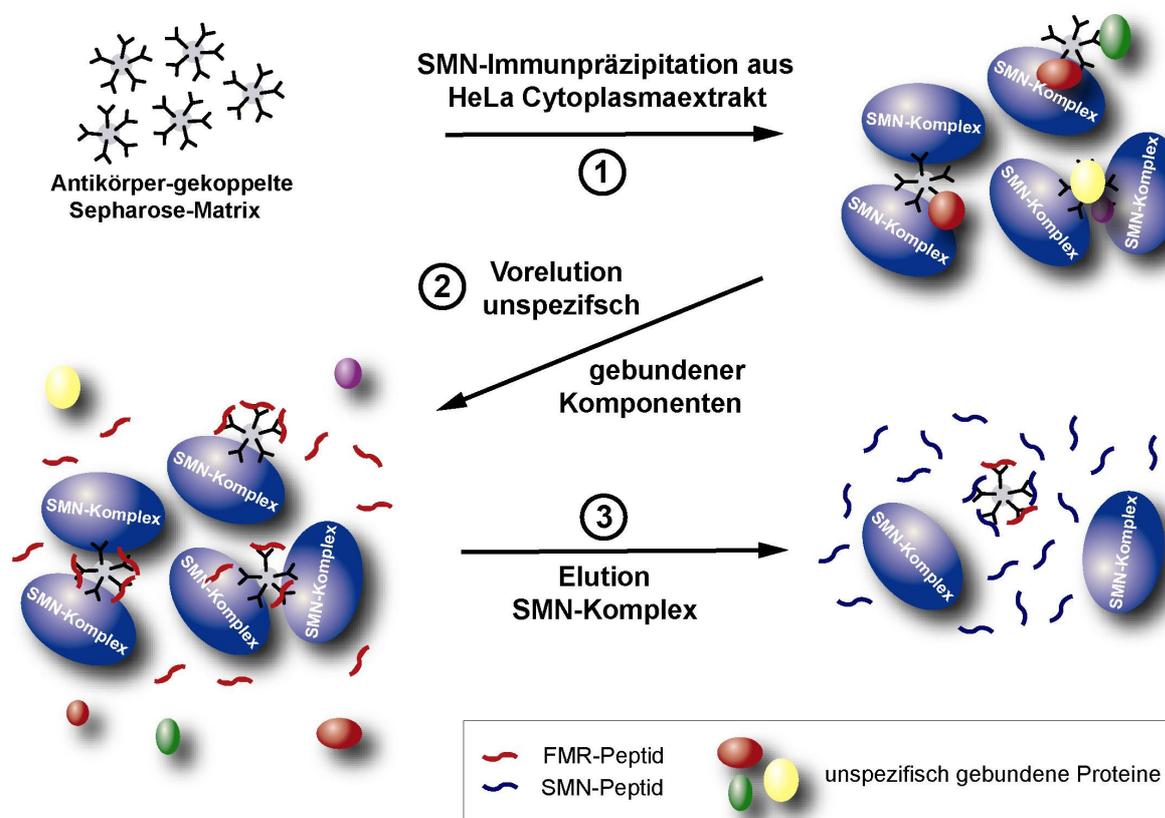


Abbildung 36: Elutionsschema für die Aufreinigung und native Elution des SMN-Komplexes

Der Erfolg der einzelnen Elutions- und Vorelutionsschritte wurde jeweils mittels SDS-PAGE überprüft. Spur 1 der Abbildung 37 zeigt die Elution des SMN-Komplexes mit dem SMN1-20-Peptid. Zur besseren Orientierung bezüglich der Sm-Proteine wurde in Spur 2 ein snRNP-Marker aufgetragen. Sehr deutlich sind in der Aufreinigung SMN, Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin5 und die Sm-Proteine B und B' zu

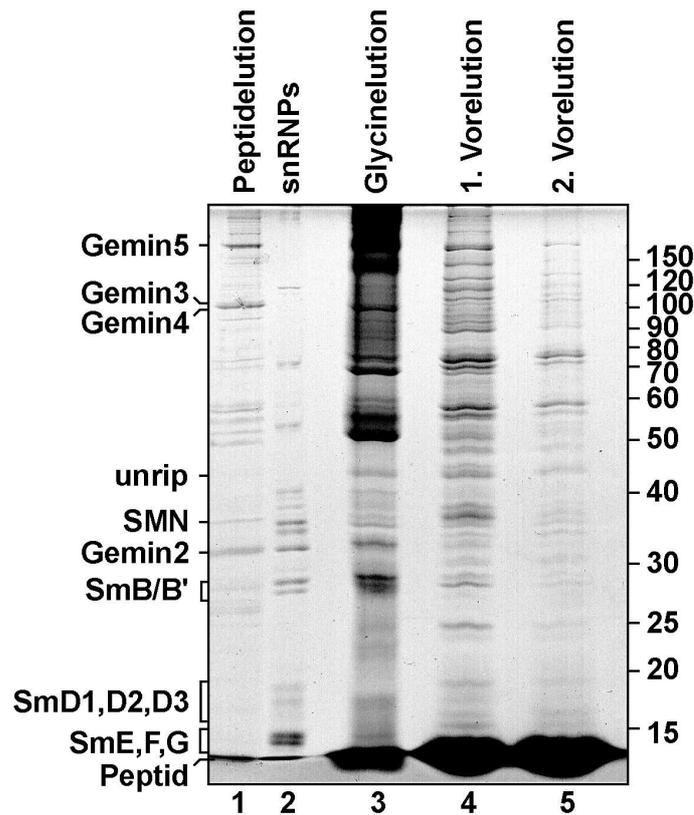


Abbildung 37: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit den verschiedenen Schritten der Elutionsprozedur

erkennen. Die anderen Sm-Proteine sowie unrip, Gemin6 und Gemin7 sind aufgrund der geringen aufgetragenen Menge nicht oder nur sehr schwer auszumachen. Spur 3 zeigt die Nachelution der Antikörpermatrix mit Glycin pH 2,3 die noch einiges an SMN-Komplex, vor allem aber auch viele unspezifische Proteine enthielt. In den Spuren 4 und 5 sind die Überstände der Vorelution mit den FMR1-20-Peptiden zu sehen. Sowohl in der ersten wie auch der zweiten Vorelution konnten eine ganze Reihe unspezifischer Proteine aus der Immunpräzipitation entfernt werden. SMN wurde dabei nicht von der Matrix gelöst (in Immunoblots überprüft, Daten nicht gezeigt).

7.7.2 Kryo-Elektronenmikroskopie des eluierten SMN-Komplexes

Die aufgereinigten Komplexe wurden in 2% Uranylformiat nach der sogenannten Sandwich-Technik zwischen zwei dünnen Kohlefilmen auf Elektronenmikroskop-

Netze (carbon grids) aufgebracht (Golas et al., 2003). Nach zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Philips CM200 FEG Elektronenmikroskop (High Tension 160kV, Vergrößerung 50.000fach, Temperatur -176°C) analysiert.

In Abbildung 38 A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der eluierten SMN-Komplexe bei 50.000facher Vergrößerung. Die abgebildeten Partikel hatten meist eine leicht ovale Form und entsprachen mit einer Größe von 20nm bis 40nm (je nach Orientierung des Partikels) der berechneten Größe des SMN-Komplexes. Auffallend war, dass viele Partikel einen ringförmig aussehenden Bereich enthielten (Abbildung 38 B, umrandeter Bereich). Diese Bereiche zeigten in Struktur und Größe eine auffallende Ähnlichkeit zu isolierten Sm-core-Partikeln, die ebenfalls regelmäßig in den Elutionen vorkamen (Abbildung 38 C). Diese Tatsache ermutigt zu der Annahme, dass es sich bei diesen länglichen Partikeln tatsächlich um Sm-Protein-haltige SMN-Komplexe handelt.

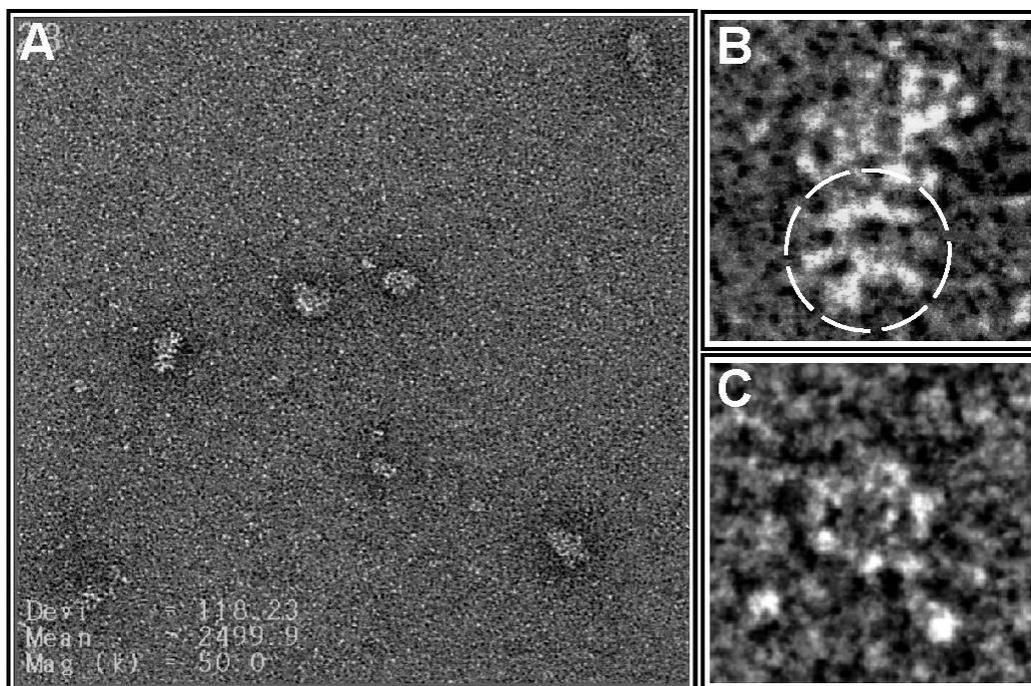


Abbildung 38: (A) Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer SMN-Elution. (B) Ausschnittsvergrößerung eines typischen zu findenden Partikels, das der berechneten Größe des SMN-Komplexes gut entspricht. Der eingekreiste Teil des Partikels ähnelt sehr einem Sm-core-Partikel, wie es in (C) zu sehen ist. Losgelöste Sm-core-Partikel sind ebenfalls regelmäßig in den Aufreinigungen zu finden.

Mit der zuvor beschriebenen Aufreinigungsstrategie wurde der SMN-Komplex in ausreichender Reinheit für die Kryo-Elektronenmikroskopie gewonnen. Allerdings war es im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht möglich, statistisch aussagekräftige Mengen mit entsprechender Reinheit zu isolieren. Für die Berechnung einer zuverlässigen 3D-Struktur sind mindestens 30.000 Partikel erforderlich (Golas et al., 2003). Neueste Ergebnisse mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode sehen jedoch sehr vielversprechend aus und werden in Kürze zur ersten Kryo-Elektronenmikroskopischen 3D-Struktur des SMN-Komplexes führen (Experimente von Matthias Grimmer fortgeführt).

8. Diskussion

8.1 Untersuchungen der molekularen Ursachen der Spinalen Muskelatrophie

Die Genetik der Spinalen Muskelatrophie ist heute, 10 Jahre nach der Entdeckung des Krankheitsgens *SMN* (Lefebvre et al., 1995), recht gut verstanden. Im Gegensatz hierzu steht die Suche nach der kausalen Verbindung zwischen zellulären Prozessen und der Entstehung der Krankheit noch am Anfang. Eine der Hürden bei diesen Bemühungen ist die verwirrende Vielfalt an Funktionen, die dem SMN-Protein zugeschrieben werden; neben der UsnRNP-Biogenese auch in der Transkription, dem prä-mRNA-Spleißen und dem axonalem Transport. Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die am besten verstandene Funktion von SMN, die Biogenese von spleißosomalen UsnRNPs. Anhand eines SMA-Modells in HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Mangel von SMN, wie er bei SMA-Patienten vorliegt, zu einer reduzierten UsnRNP-Biogenese *in vitro* und *in vivo* führt. Die Etablierung eines zweiten Modells für die SMA in Zebrafisch-Embryonen ermöglichte es, zu untersuchen, ob die eingeschränkte UsnRNP-Produktion zur Degeneration von Motoneuronen führt. In der Tat löste nicht nur der Mangel von SMN, sondern auch zweier weiterer essentieller Faktoren der UsnRNP-Zusammenlagerung (Gemin2 und pICln) die Degeneration von Axonen der α -Motoneurone aus. Belegt wurde dieser Befund schließlich durch die Supplementierung der betroffenen Embryonen mit isolierten nativen UsnRNPs, wodurch die Axon-Degenerationen verhindert und die Embryonen gerettet werden konnten.

8.1.1 SMN-Mangel führt zu reduzierter UsnRNP-Synthese in HeLa-Zellen

Aus Mikroinjektionsstudien in *Xenopus laevis* Oocyten weiß man, dass der SMN-Komplex essentiell für die Biogenese von spleißosomalen UsnRNPs ist (Fischer et

al., 1997). Meister et al. (2001a; 2002) konnten zeigen, dass die vollständige Entfernung des SMN-Komplexes aus Zellextrakten eine komplette Inhibition der UsnRNP-Zusammenlagerung *in vitro* zur Folge hat. Allerdings blieb offen, ob die Reduktion von SMN alleine (nicht des gesamten SMN-Komplexes), wie sie der SMA zugrunde liegt, ebenfalls eine Auswirkung auf die UsnRNP-Biogenese hat. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten SMA-Modell in HeLa-Zellen konnte dies erstmalig direkt untersucht werden. Die Eignung der RNAi-behandelten Zellen als SMA-Modell spiegelte sich dabei in verschiedenen Aspekten wider: a) Die SMN-Menge konnte auf Niveaus gesenkt werden, wie sie typischerweise in Patienten-Fibroblasten vorliegen. b) Die RNAi-behandelten Zellen teilten wichtige Eigenschaften mit Patienten-Fibroblasten, wie zum Beispiel stark reduzierte Proliferationsraten und das Verschwinden von SMN aus den nukleären Gems (vergleiche hierzu auch Doktorarbeit Gunter Meister). c) Die Absenkung der SMN-Menge über das in Patienten-Fibroblasten festgestellte Maß hinaus führte zum Zelltod durch Apoptose, wie es beispielsweise auch in Blastocysten von heterozygoten SMN^{+/-}-Mausembryonen der Fall ist. Die Tatsache, dass die Zusammenlagerungsaktivität für UsnRNPs in Zellextrakten aus derart behandelten Zellen von der vorhandenen SMN-Menge abhängig war, lieferte einen direkten Zusammenhang zwischen der SMN-Menge und der Synthese von UsnRNPs. Das unter Kapitel 7.1.3 beschriebene pulse-chase-Experiment, mit dem die *de novo*-Synthese von UsnRNPs in SMN-defizienten HeLa-Zellen untersucht wurde, zeigte schließlich, dass dieser Effekt auch *in vivo* rekapituliert werden kann. Zu den gleichen Resultaten kamen auch andere Studien, die in ähnlichen Experimenten ebenfalls einen direkten Zusammenhang zwischen vorhandener SMN-Menge und der Effizienz der UsnRNP-Biogenese beobachteten (Feng et al., 2005; Wan et al., 2005).

Im Bezug auf das Krankheitsbild der SMA stellte sich nun die Frage, ob die vom SMN-Mangel hervorgerufene Beeinträchtigung der UsnRNP-Zusammenlagerung tatsächlich für die Degeneration von Motoneuronen verantwortlich ist. Dieser Frage musste insbesondere aufgrund der vielen anderen Funktionen von SMN - seien es etablierte oder lediglich postulierte Funktionen - große Bedeutung beigemessen werden.

8.1.2 SMN-Mangel führt zu SMA-ähnlichen Phänotypen in Zebrafisch-Embryonen

Der Zebrafisch *Danio rerio* bietet ein gutes Tiermodell für SMA. Hierfür sprechen die technischen Möglichkeiten zur Reduktion der Genexpression, die Transparenz der Embryonen sowie die Tatsache, dass dieser Organismus eindeutig ein Ortholog für SMN enthält (Bertrand et al., 1999). Mit Hilfe der Morpholino-Technik konnte von McWhorter et al. (2003) gezeigt werden, dass eine starke Reduktion der SMN-Menge in Zebrafisch-Embryonen letal ist. Wurde die Inhibition der SMN-Expression weniger stringent (mit geringeren Morpholino-Konzentrationen) durchgeführt, stiegen die Überlebensraten auf nahezu normale Werte, aber die Fische zeigten eine SMA-ähnliche Degeneration von Motoraxonen. Betroffen waren die caudalen und variablen primären Motoneurone (CaPs und VaPs), welche jeweils in der Mitte jedes Hemisegmentes der Wirbelsäule lokalisiert sind. Die Axone der CaPs innervieren die ventralen Myotome, die der VaPs die rostralen Myotome. Beide Zelltypen sind α -Motoneurone und gehören zu den ersten sich im Zebrafisch-Embryo entwickelnden Motoneuronen. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit wiederholt und das experimentelle System für weiterführende Fragen angewandt werden.

8.1.3 Der Mangel von Gemin2 und pICln führt ebenfalls zu Defekten der Motoneurone in Zebrafisch-Embryonen

Vor dem Hintergrund, dass der SMN-Mangel in HeLa-Zellen zu einer reduzierten UsnRNP-Synthese führt, könnten die Motoraxon-Defekte der SMN-defizienten Zebrafisch-Embryonen auf einem Mangel von UsnRNPs beruhen. In diesem Fall sollte die reduzierte Expression anderer essentieller Zusammenlagerungs-Faktoren, deren Funktion ausschließlich auf die UsnRNP-Biogenese beschränkt ist, auch zur Degeneration der Motoraxone führen. Tatsächlich zeigten Zebrafisch-Embryonen mit reduzierter Expression von Gemin2 und pICln die gleichen Fehlentwicklungen der Motoraxone von CaPs wie die Embryonen mit reduzierter SMN-Menge. Weder Gemin2 noch pICln wurden bisher mit anderen Funktionen von SMN, wie axonalem Transport, Spleißen oder Transkription in Verbindung gebracht. Im Falle des

axonalen Transports konnte eine Beteiligung von Gemin2 sogar ausgeschlossen werden (Jablonka et al., 2001). Es sollte hier erwähnt werden, dass Gemin2, genau wie SMN, nicht nur in dem cytosolischen, sondern auch in dem nukleären SMN-Komplex zu finden ist. In unserem Labor wurde jedoch kürzlich gezeigt, dass dieser Komplex keine Einheit mit eigener Funktion darstellt, sondern ein Intermediat im Kreislauf des Zusammenlagerungs-Prozesses von UsnRNPs ist (Grimmler et al., 2005). Das funktionelle Zusammenspiel von SMN und Gemin2 ist also wahrscheinlich auf die Biogenese von UsnRNPs beschränkt. Auch für pICln, dessen ursprünglich beschriebene Funktion als Modulator der Chlorid-Leitfähigkeit (Krapivinsky et al., 1994) bisher nicht weiter bestätigt werden konnte, scheint dieser Prozess die einzige mit SMN gemeinsame zelluläre Funktion zu sein (Friesen et al., 2001b; Meister et al., 2001b; Meister und Fischer, 2002; Pu et al., 1999). Demnach sollte die Reduktion der Gemin2- oder pICln-Menge spezifisch nur den UsnRNP-Syntheseweg betreffen. Es ist daher wahrscheinlich, dass tatsächlich die eingeschränkte UsnRNP-Zusammenlagerung für die Motoraxon-Defekte in Zebrafisch-Embryonen verantwortlich ist. Diese Schlussfolgerung wird von genetischen Studien in *Drosophila melanogaster* gestützt, wo der Mangel einer weiteren essentiellen Komponente des UsnRNP-Biogenesewegs, des UsnRNA-Exportfaktors PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export), zu neuromuskulären Defekten führt (G. Matera, persönliche Korrespondenz).

8.1.4 Die Degeneration der Motoraxone kann durch die Koinjektion von isolierten UsnRNPs verhindert werden

Die zuvor diskutierten Befunde aus HeLa und Zebrafisch führten zu der Hypothese, dass eine durch SMN-Mangel beeinträchtigte UsnRNP-Synthese der Grund für die Entstehung von SMA sein könnte. Diese Verknüpfung bleibt jedoch rein spekulativ, solange keine direkte Verbindung zwischen den Motoneuron-Defekten und einem UsnRNP-Mangel bewiesen ist. Dazu müsste neben den im vorangehenden Kapitel diskutierten Ergebnissen eine weitere Forderung erfüllt werden. Die beschriebenen Entwicklungsdefekte müssen sich durch die Koinjektion des Endproduktes dieses

Synthesewegs, nämlich von isolierten nativen UsnRNPs, verhindern lassen. Tatsächlich konnte dadurch die Reduktion sowohl von SMN als auch von Gemin2 kompensiert und die Embryonen vor der Motoraxon-Degeneration bewahrt werden. Dabei kann relativ sicher ausgeschlossen werden, dass verunreinigende Faktoren in den snRNP-Aufreinigungen das Ergebnis positiv verfälschten. Zum einen wurde kopräzipitiertes SMN vor der Injektion komplett aus den Proben entfernt. Zum anderen konnte bei ähnlichen Experimenten in *X. laevis* Embryonen gezeigt werden, dass RNase-verdaute UsnRNPs die SMN-defizienten Embryonen nicht retten können (für die von Dietmar Gradl, Universität Karlsruhe durchgeführten Experimente in *X. laevis* wurden dieselben UsnRNP-Aufreinigungen wie in dieser Arbeit verwendet)(Winkler et al., 2005). Da der Effekt der injizierten Proben strikt abhängig von der Integrität der UsnRNPs war, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung spezifisch durch die UsnRNPs vermittelt wurde. Interessant ist auch, dass die Embryonen nicht nur durch die Injektion von humanen, sondern auch von *X. laevis* UsnRNPs gerettet werden konnten. Angesichts der hohen phylogenetischen Konservierung von Spleißfaktoren ist dies nicht überraschend. Auffallend war in diesen Experimenten, dass die Effizienz der Komplementation bei Fischen mit Gemin2-Mangel schlechter ausfiel als bei SMN-defizienten Tieren. Möglicherweise ist der Effekt des Gemin2-Mangels gravierender als der eines SMN-Mangels. Dafür spricht die Tatsache, dass in *X. laevis* Oocyten die Injektion von Gemin2-Antikörpern zu einer sehr starken Inhibition der UsnRNP-Synthese führt.

Zusammengenommen zeigen die präsentierten Experimente, dass der Mangel von SMN zu einer reduzierten Synthese von UsnRNPs führt und die unzureichende UsnRNP-Produktion die Degeneration von Axonen der α -Motoneurone verursachen kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die SMA durch eine solche UsnRNP-Insuffizienz ausgelöst werden könnte.

Die Beobachtung, dass die Supplementierung mit UsnRNPs einen SMN-, bzw. Gemin2-Mangel kompensieren und die Degeneration von Motoneuronen verhindern kann, wirft eine entscheidende Frage auf. Bis heute ist unklar, weshalb der Mangel an ubiquitären Proteinen (SMN und Gemin2) einen Zelltyp-spezifischen Phänotyp verursachen kann. Auf der Suche nach einer Antwort lohnt sich der Blick auf eine

andere ebenfalls mit dem RNA-Metabolismus verknüpfte Krankheit, die Retinitis pigmentosa (RP). Wie SMA ist auch diese Erkrankung durch die Degeneration eines spezifischen Zelltyps gekennzeichnet, in diesem Fall die retinalen Photorezeptoren. Als Ursache wurden, neben einigen anderen Loci, Mutationen in drei integralen UsnRNP-Komponenten identifiziert (siehe auch Faustino and Cooper, 2003). Vorausgesetzt, dass diese Mutationen zu einem Verlust der Funktion dieser Proteine führen, ist die resultierende Haploinsuffizienz gut vergleichbar mit der SMA. Was diesen Vergleich so bemerkenswert macht, ist die Tatsache, dass in beiden Fällen Gewebe betroffen sind, die einen extrem hohen Umsatz spezifischer mRNAs aufweisen. Während für Entwicklung und Homöostase der Photorezeptoren große Mengen Opsin gebraucht werden, sind für das Auswachsen der Motoneurone eine Fülle von Rezeptoren und Neurotropinen nötig (zusammengefasst in Beattie, 2000; Chisholm and Tessier-Lavigne, 1999; Tear, 1999). Es ist gut vorstellbar, dass die Nachfrage nach solchen Proteinen von den Zellen nicht mehr erfüllt werden kann, wenn die entsprechenden prä-mRNAs nur ineffizient gespleißt werden. Faustino und Cooper (2003) haben kürzlich die Hypothese aufgestellt, dass die meisten ubiquitär exprimierten prä-mRNAs schneller gespleißt werden als Gewebe-spezifische prä-mRNAs. Verfolgt man diese Idee weiter, könnte eine gewebespezifische prä-mRNA, die suboptimale Spleißelemente enthält, empfindlicher auf verringerte Mengen von Spleißfaktoren reagieren als andere. Die Reduktion von UsnRNP-Komponenten (wie bei RP) oder von Proteinen, die an der UsnRNP-Biogenese beteiligt sind (wie bei SMA), würde in beiden Fällen einen Zelltyp-spezifischen Phänotyp hervorrufen.

Alternativ könnte die unzureichende UsnRNP-Synthese die Motoneuronen nur soweit schwächen, dass die Zelle kumulativ durch den Ausfall einer anderen Motoneuron-spezifischen Funktion von SMN geschädigt wird. Die Funktion von SMN im axonalen Transport könnte eine solche Funktion sein (Jablonka et al., 2001; Rossoll et al., 2003; Zhang et al., 2003), da SMN-defiziente Motoneurone schwere Defekte im sogenannten „pathfinding“ der Axone zeigen (diese Arbeit und McWhorter et al. (2003) und dieser Prozess stark abhängig von einem reibungslosen Transport ist (Steward, 2002). Um diese Aspekte zu klären, sind detaillierte Analysen der anderen SMN-Funktionen in SMN-defizienten Zellen nötig.

Eine weitere interessante Frage, die mit der Rettung der Embryonen durch UsnRNPs auftaucht, ist, zu welchem Zeitpunkt während der Entwicklung der SMN-Mangel kompensiert werden muss. Die Motoneurone in Zebrafisch müssen während des Auswachsens ihrer Axone bestimmte Kontrollpunkte passieren (zusammengefasst in (Beattie, 2000)). An diesen Kontrollpunkten, die in festgelegter räumlicher und zeitlicher Abfolge auftreten, sind eine ganze Serie von Cytokinen und Rezeptorproteinen beteiligt, die an Oberfläche der Wachstumskegel der Axone liegen oder umgekehrt den Wachstumskegeln präsentiert werden (sogenannte „axon guidance“, zusammengefasst in Chisholm and Tessier-Lavigne, 1999; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Die beiden in SMN-defizienten Zebrafischen betroffenen α -Motoneuron-Klassen (CaPs und VaPs) gehören zu den ersten, die sich im Embryo entwickeln. Ihr Schicksal wird bereits am Ende der Gastrulation bestimmt, die in unseren Experimenten wenige Stunden nach der Koinjektion der anti-SMN-Morpholinos und UsnRNPs einsetzt. Man kann deshalb spekulieren, dass es ein kurzes Zeitfenster gibt, in dem die Entwicklung stark von ausreichenden UsnRNP-Leveln abhängt. Es stellt sich ebenso die Frage, wie robust und anhaltend die Kompensation des SMN-defizienten Phänotyps durch UsnRNPs wirkt. Wir wissen, dass die Embryonen mindestens bis über das Schlüpfen, etwa 31 Stunden nach Injektion überleben. Weitere Studien werden zeigen müssen, wie stabil der Effekt im Verlauf der Zebrafisch-Ontogenese ist.

8.2 Untersuchungen zu den Grundlagen der Spezifität in der SMN-vermittelten UsnRNP-Zusammenlagerung

Aus der Sicht der Grundlagenforschung sind die molekularen Grundlagen der UsnRNP-Zusammenlagerung von großer Bedeutung. Deshalb wurden in weiteren Projekten der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Spezifität dieser Reaktion, den dafür erforderlichen RNA-Motiven und der Beteiligung der putativen RNA-Helikase Gemin3 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der SMN-Komplex die Spezifität der Zusammenlagerung von Sm-Proteinen mit den korrekten RNAs sicherstellen kann. Während isolierte Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven

Bedingungen (ohne Zugabe von Kompetitor-tRNA) spontan und unspezifisch an verschiedene RNAs banden, lud der SMN-Komplex die Sm-Proteine ausschließlich auf eine intakte UsnRNA. Damit eine RNA dabei als Substrat für die SMN-vermittelte Zusammenlagerung erkannt wurde, musste sie mindestens aus der Sm-site mit einem 3'-flankierenden stem-loop bestehen. Während der Zusammenlagerungsreaktion konnte zudem keine RNA-Doppelstrang-entwindende Funktion von Gemin3 nachgewiesen werden. Ein weiteres Projekt beschäftigte sich darüberhinaus mit der Frage nach der Speicherung von Sm-Proteinen durch pICln. Es wurde festgestellt, dass auch pICln durch Bindung der Sm-Proteine deren spontane Assoziation mit RNA sowie auch untereinander unterbindet und so zur Spezifität in der UsnRNP-Biogenese beiträgt.

8.2.1 Der SMN-Komplex stellt die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung sicher

Die Frage nach der Spezifität des Transfers von Sm-Proteinen auf die richtigen RNAs (spleißosomale UsnRNAs und U7snRNA) ist ein wichtiger Aspekt der UsnRNP-Zusammenlagerung. In der Zelle gibt es eine Fülle von RNAs, die Sm-site ähnliche Motive besitzen und somit potentielle Kandidaten für eine unspezifische Bindung von Sm-Proteinen sind. Raker et al. (1999) haben zwar gezeigt, dass *in vitro* nur RNAs mit korrekter Sm-site mit Sm-Proteinen beladen werden, jedoch wurden diese Studien mit isolierten Komponenten und vor allem unter stringenten Bedingungen (Zugabe von Kompetitor-tRNA und Detergenz) durchgeführt. Da dies nicht den natürlichen Bedingungen in der Zelle entspricht, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst geklärt, ob isolierte Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen tatsächlich nur an snRNAs mit kompletter Sm-site binden können. Es stellte sich heraus, dass sie dabei auch unspezifisch mit anderen RNAs, die normalerweise keine Sm-Proteine binden (U1mutSm mit mutierter Sm-site und U17 small nucleolar RNA), interagierten. Die Bindung war also keinesfalls auf intakte snRNAs beschränkt. Damit ergibt sich jedoch ein gravierendes Problem für die Zellen. Wenn die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung nicht gesichert würde,

müsste zwangsläufig ein großer Teil Sm-Proteine an „falsche“ RNAs binden und diese in ihrer Funktion beeinflussen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der SMN-Komplex, der *in vivo* für den Transfer der Sm-Proteine zuständig ist, diese ausschließlich auf intakte snRNAs lädt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass der SMN-Komplex *in vivo* die UsnRNP-Zusammenlagerung nicht nur vermittelt, sondern auch die Spezifität der Reaktion sicherstellt.

8.2.2 pICln verhindert unspezifische Aggregationen der Sm-Proteine

Aus der Tatsache, dass Sm-Proteine unter nicht-kompetitiven Bedingungen auch an Nicht-snRNAs binden können ergibt sich für die Zelle ein weiteres Problem. Sie muss gewährleisten, dass die Sm-Proteine in der Zeit zwischen ihrer Synthese und der Bindung an den SMN-Komplex nicht unspezifisch mit RNAs interagieren. Pu et al. (1999) zeigten, dass nahezu alle Sm-Proteine in *X. laevis* Oocyten mit pICln assoziiert sind. Der verbleibende Anteil stellt vermutlich die in den SMN-Komplex oder UsnRNPs eingebaute Fraktion dar. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Sm-Proteine in der Zeit zwischen Synthese und Bindung an den SMN-Komplex an pICln gebunden vorliegen. Die Autoren schlugen deshalb auch eine Funktion für pICln als Speicher für Sm-Proteine vor (Pu et al., 1999). Friesen et al. (2001) zeigten in Dichtegradientenzentrifugationen, dass in humanen 293-Zellen zwei pICln-Populationen existieren. Der kleinere Teil befand sich in einer 20S großen Fraktion, die dem PRMT5-Komplex entspricht, der größere Teil komigrierte bei 6S zusammen mit Sm-Proteinen. Daraus entstand die Idee, dass pICln als eine Art Chaperon für Sm-Proteine dienen könnte, indem es neu synthetisierte Sm-Proteine bindet und ihre unspezifische Assoziation mit RNA und möglicherweise auch untereinander verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die Präinkubation von Sm-Proteinen mit pICln oder isoliertem PRMT5-Komplex deren Bindung an U1snRNA unterbindet (wenn pICln alleine eingesetzt wurde) oder zumindest stark schwächt (wenn immunpräzipitierter PRMT5-Komplex verwendet

wurde). Auch die Ergebnisse von Löslichkeitsversuchen, in denen die Zugabe von pICln die Selbstaggregation von rekombinantem SmB verhinderte, untermauern diese These. pICln könnte daher *in vivo* eine Chaperon-ähnliche Funktion speziell für Sm-Proteine ausüben. Vorläufige Ergebnisse aus Gradientenzentrifugationen (Daten nicht gezeigt) deuten auch an, dass pICln bereits bei der Translation von Sm-Proteinen verstärkt mit Ribosomen assoziiert und die Sm-Proteine tatsächlich direkt am Ribosom binden könnte.

Aus den hier diskutierten Daten (diese Arbeit sowie Pu et al., 1999) und Friesen et al., 2001) lässt sich eine Hypothese erstellen, wie die Spezifität der UsnRNP-Biogenese sichergestellt werden könnte (siehe Abbildung 39). Demnach würden die Sm-Proteine direkt nach oder sogar noch während der Translation von pICln am Ribosom gebunden. pICln könnte sie dann solange in einem nativen Zustand erhalten, bis sie für die UsnRNP-Synthese benötigt werden. Auf ein entsprechendes Signal hin (denkbar wäre eine Phosphorylierung von pICln, siehe auch Grimmer et al., 2005), würde der pICln/Sm-Protein-Komplex mit den anderen Komponenten des PRMT5-Komplexes fusionieren. Die Sm-Proteine würden methyliert, auf den SMN-Komplex übertragen und von dort aus auf die UsnRNAs transferiert. In diesem Modell käme also zunächst pICln der Schutz der Sm-Proteine vor unspezifischer Aggregation zu, während der SMN-Komplex dann im weiteren Verlauf für den spezifischen Transfer der Sm-Proteine auf snRNAs verantwortlich ist. Durch das enge Zusammenspiel beider Systeme wäre der Weg der Sm-Proteine zu jeder Zeit streng kontrolliert und die Spezifität der UsnRNP-Synthese sichergestellt.

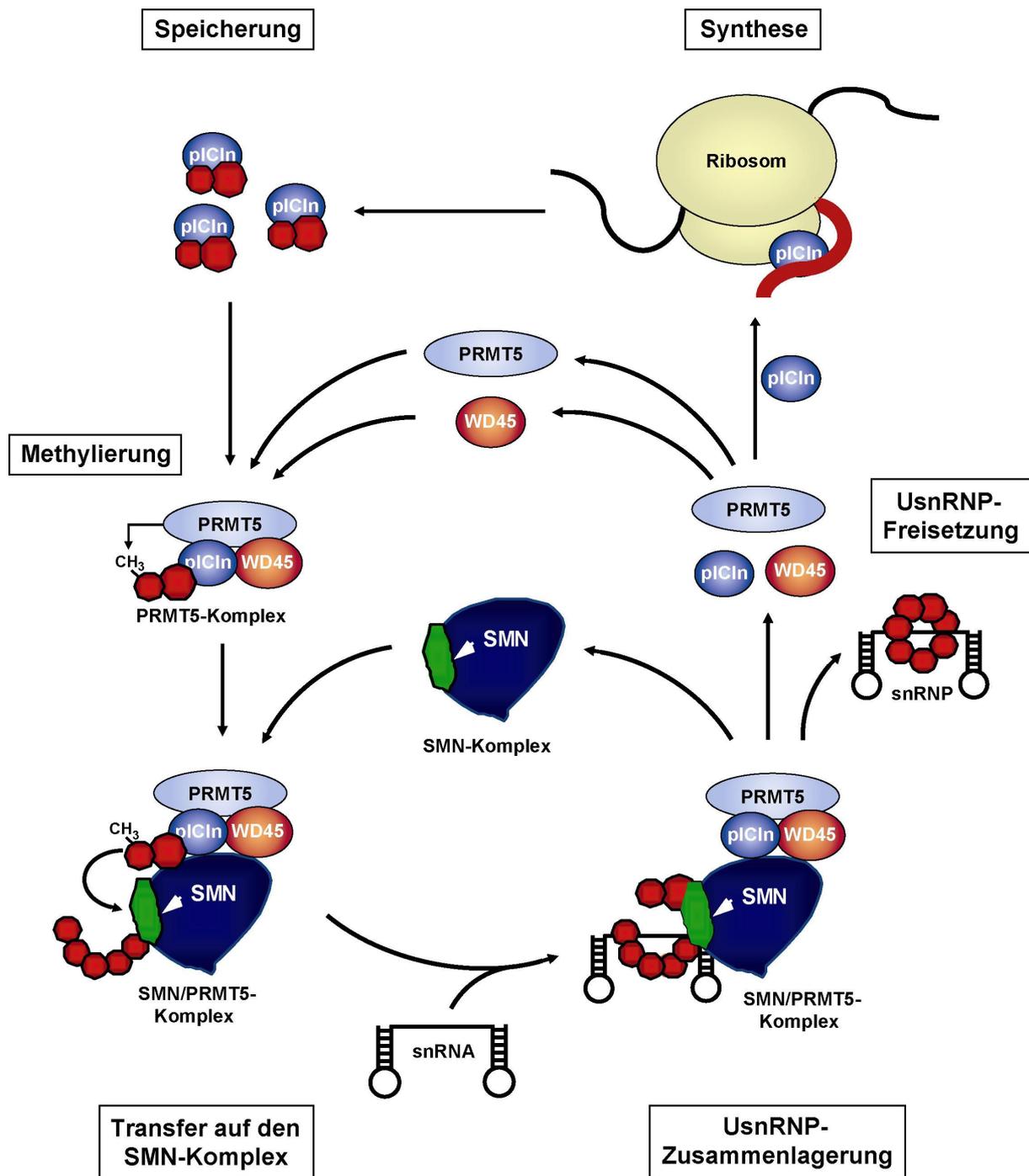


Abbildung 39: Modell über die Sicherstellung der Spezifität der UsnRNP-Biogenese. Beschrieben ist der Weg der Sm-Proteine von ihrer Synthese bis zum Einbau in die UsnRNPs. (nähere Erläuterung siehe im Text)

8.2.3 Der für die Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen minimal erforderliche Sequenzbereich der U1 snRNA besteht aus der Sm-site und einer 3'-flankierenden Sequenz

Die Spezifität der UsnRNP-Zusammenlagerung impliziert, dass sich die RNA-Substrate durch bestimmte Sequenz- oder Strukturmotive auszeichnen müssen. Verschiedene Studien haben sich bereits mit dieser Frage auseinandergesetzt, kommen allerdings teilweise zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen (Hamm et al., 1987; Jarmolowski and Mattaj, 1993; McConnell et al., 2003; Yong et al., 2002). Konsens herrscht einzig darüber, dass die Sm-site unerlässlich ist, weil sie allein die Bindeplattform für die Sm-Proteine darstellt. Yong et al. (2002) kamen zu dem Schluss, dass darüberhinaus auch stem-loop A für die SMN-vermittelte Zusammenlagerung der U1snRNA mit Sm-Proteinen notwendig sei, weil einerseits die RNAs U1 Δ A sowie U1 Δ A3 nicht mehr an den SMN-Komplex binden konnten und andererseits die Injektion eines hohen Überschusses von stem-loop A in *X. laevis* Oocyten den SMN-Komplex sättigen konnte und so zu einer verringerten UsnRNP-Synthese führte. Von Jarmolowski and Mattaj (1993) wurde dagegen gezeigt, dass stem-loop E der U1snRNA notwendig für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen ist. Bestätigt wurde dies durch den Befund, dass stem-loop E mit dem Sm-Ring in Kontakt tritt und für die stabile Bindung der Sm-Proteine erforderlich ist (McConnell et al., 2003). Zusammengenommen liefern all diese Studien jedoch keine zufriedenstellende Antwort darauf, welche RNA-Motive für eine SMN-vermittelte Zusammenlagerung mit Sm-Proteinen erforderlich sind.

Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit die minimal für eine Zusammenlagerung notwendigen RNA-Motive der U1snRNA in HeLa Cytoplasmaextrakt und *X. laevis* Eiextrakt bestimmt. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte die „Minimal“-snRNA auf die Sm-site und einen flankierenden 3'-stem-loop in HeLa, bzw. einen halbierten einzelsträngigen stem-loop in *X. laevis* eingegrenzt werden. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der Studien von Jarmolowski and Mattaj (1993) und McConnell et al. (2003), die zeigten, dass stem-loop E für die Zusammenlagerungsreaktion erforderlich ist und mit dem Sm-Ring in Kontakt tritt. McConnell et al. (2003) postulierten, dass stem-loop E dabei sequenzunabhängig als

Klammer wirkt, die den Sm-Ring auf der UsnRNA fixiert. Dies erscheint plausibel, da einerseits die Interaktion mit dem Sm-Ring über das Phosphat-Rückgrat der RNA erfolgte und andererseits alle vom SMN-Komplex beladenen UsnRNAs unterschiedliche Sequenzen im terminalen stem-loop besitzen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter erhärtet, denn die Sequenz des terminalen stem-loops spielte auch hier keine spezifische Rolle.

Eine etwas differenziertere Auseinandersetzung erfordern die Daten bezüglich des stem-loops A der U1snRNA. Yong et al. (2002) zeigten, dass snRNAs ohne stem-loop A nicht an den SMN-Komplex binden können und postulierten eine aktive Rolle des stem-loops A in der UsnRNP-Zusammenlagerung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beladung mit Sm-Proteinen jedoch weder durch die Deletion von stem-loop A alleine (U1 Δ A), noch der gesamten 5'-terminalen Kleeblattstruktur (U1 Δ ABC) beeinträchtigt. Die Kinetik der Zusammenlagerungsreaktion zeigte in Effizienz und Geschwindigkeit für beide RNA-Deletionsmutanten keine wesentlichen Unterschiede zur Wildtyp U1snRNA. Lediglich die Substitutionsmutante U1 Δ A3 konnte in HeLa Extrakt nicht mit Sm-Proteinen beladen werden. Es ist jedoch fraglich, ob dieser Effekt nicht artifiziell hervorgerufen ist, da die Entfernung des gesamten stem-loops A sowie aller drei stem-loops A, B und C keinerlei Auswirkungen auf die Zusammenlagerungsreaktion hatte. Zudem berichteten auch andere Studien, dass stem-loop A nicht für die Zusammenlagerungsreaktion notwendig ist (Hamm et al., 1987; Jarmolowski and Mattaj, 1993). Sogar von Yong et al. (2002) selber wurde gezeigt, dass in Oocyten injizierte U1 Δ A RNA effizient mit Sm-Proteinen beladen wird. Demnach ist es sehr unwahrscheinlich, dass stem-loop A eine essentielle aktive Rolle in der UsnRNP-Zusammenlagerung spielt. Dennoch kann die Bindung von stem-loop A an den SMN-Komplex auch in *X. laevis* Oocyten beobachtet werden (nicht gezeigte Daten von Prof. U. Fischer). Möglicherweise ist diese Interaktion nicht für die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen, sondern zu einem späteren Zeitpunkt in der UsnRNP-Biogenese von essentieller Bedeutung, denn in Oocyten injizierte U1 Δ A RNA kann zwar mit Sm-Proteinen beladen, aber nicht in den Kern transportiert werden (Yong et al., 2002). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass für die Zusammenlagerungsreaktion zwischen RNA und Sm-Proteinen tatsächlich nur die

Sm-site und ein 3'-terminaler stem-loop notwendig sind. Die erfolgreiche Zusammenlagerung der U7opt RNA konnte dies eindeutig bestätigen.

8.2.4 Der SMN-Komplex übt während der Zusammenlagerung von UsnRNPs keine RNA-Doppelstrang-entwindende Funktion aus

In den vorangehenden Kapiteln wurde diskutiert, wie die Spezifität der Zusammenlagerungsreaktion von UsnRNPs sichergestellt wird und auf welchen Eigenschaften der RNA sie beruht. Ein weiterer Aspekt der UsnRNP-Zusammenlagerung ist der Mechanismus, wie die Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf die RNA übertragen werden. Grundsätzlich sind dafür zwei Möglichkeiten denkbar: entweder werden die Sm-Proteine einzeln, bzw. in Form von Hetero-Oligomeren um die RNA gebunden, oder sie bilden bereits am SMN-Komplex einen geschlossenen Ring aus, durch den dann die RNA „hindurchgefädelt“ wird. In beiden Fällen könnte die DEAD-box RNA-Helikase Gemin3 des SMN-Komplexes eine zentrale Rolle spielen, denn die Beladung der RNA mit Sm-Proteinen erfolgt ATP-abhängig und Gemin3 ist die einzige Komponente des SMN-Komplexes, die eine ATPase-Domäne enthält. Im ersten Modell käme Gemin3 die Funktion einer RNase zu. Unter RNasen versteht man Proteine (meist Helikasen), die RNA-abhängig eine Konformationsänderung in Proteinkomplexen induzieren. Eine solche induzierte Konformationsänderung des SMN-Komplexes könnte den Ringschluss der Sm-Proteine um die RNA bewirken. Im zweiten Fall würde Gemin3 partiell die Sekundärstruktur der RNA auflösen und so das „Hindurchfädeln“ der RNA durch den Kanal des Sm-Ringes ermöglichen. Für rekombinant hergestelltes Gemin3 konnte eine solche „klassische“ Helikaseaktivität bereits *in vitro* demonstriert werden (Yan et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde in Helikaseassays untersucht, ob Gemin3 auch im Kontext des SMN-Komplexes RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität besitzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass isolierter SMN-Komplex aus HeLa-Zellen unter Bedingungen, bei denen die UsnRNP-Zusammenlagerung stattfindet, weder für stem-loop E, noch für zwei artifizielle Helikase-Substrate RNA-Doppelstrang entwindende Aktivität besitzt. Diese Ergebnisse legten nahe, dass

Gemin3 im Kontext des SMN-Komplexes keine RNA-Doppelstrang-entwindende Aktivität besitzt. Mit Sicherheit kann zumindest eine Entwindung des stem-loops E ausgeschlossen werden. Unter dieser Voraussetzung ist es wahrscheinlich, dass Gemin3 als RNase Konformationsänderungen im SMN-Komplex katalysiert. Es wurde hierzu bereits die Möglichkeit des Ringschlusses der Sm-Proteine um die Sm-site der snRNA angesprochen. Die Reaktion könnte nach dem Modell des sogenannten „clamp loadings“ der DNA-Polymerasen funktionieren (für eine Zusammenfassung des Clamp loading Mechanismus siehe Ellison and Stillman, 2001). „Clamps“ sind Protein-Oligomere (z.B. die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III von *Escherichia coli*), die ringförmig um DNA binden und die nur schwach prozessive Polymerase an der DNA festhalten. Sogenannte „Clamp loader“ halten die „Clamps“ zunächst mit Hilfe von ATP geöffnet. Legt sich ein DNA-Strang in den offenen „Clamp“-Ring, wird der „Clamp loader“ unter ATP-Verbrauch abgelöst und der Ring schnappt zu. Den Sm-Proteinen käme in diesem Modell die Rolle der „Clamps“, Gemin3 die des „Clamp-loaders“ zu. Unterstützt wird die Hypothese eines solchen energieabhängigen Mechanismus dadurch, dass die UsnRNP-Zusammenlagerung strikt ATP-abhängig verläuft (Meister et al., 2001a). Für Gemin3 konnte bereits ATPase-Aktivität nachgewiesen werden (Grundhoff et al., 1999). Zudem. Interessanterweise binden die Sm-Proteine B und D3 einerseits an Gemin3 und sind andererseits deutlich lockerer mit dem SMN-Komplex assoziiert als die anderen Sm-Proteine. Bei der Behandlung von isoliertem SMN-Komplex mit Hochsalz-Puffer (über 600mM) dissoziieren sie als erstes vom Komplex. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese beiden Proteine als beweglicher Arm der Sm-Protein-Klammer fungieren und beim Ringschluss von Gemin3 aktiv auf die anderen Sm-Proteine zu bewegt wird. Es daher denkbar, dass Gemin3 die treibende Kraft für den Ringschluss der Sm-Proteine um die RNA ist. Die Kryo-Elektronenmikroskopische Struktur des SMN-Komplexes wird Aufschluss über die Anordnung der Sm-Proteine geben können und weitere Einblicke in den Mechanismus der UsnRNP-Zusammenlagerung ermöglichen.

8.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigten erstmalig eine Verbindung zwischen einer durch SMN-Mangel reduzierten UsnRNP-Synthese und der Degeneration von Motoneuronen. Weitere Studien werden nun klären, warum dieser globale Defekt die Degeneration speziell der Motoneurone auslöst, sich aber nicht auf andere Zelltypen auswirkt. Hierbei wäre von Interesse, ob bestimmte Motoneuron-spezifische prä-mRNAs, die z.B. für Rezeptoren der sogenannten „axon guidance“ kodieren, schlechter als andere prä-mRNAs gespleißt werden (siehe auch Kapitel 8.1) und die Motoneuronen so anfälliger für einen Mangel von Spleißfaktoren machen. Darüberhinaus wäre es wichtig zu klären, ob bestimmte Entwicklungsphasen besonders stark durch einen Mangel von SMN betroffen sind und dadurch bereits frühzeitig der Grundstein für spätere Störungen gelegt wird (siehe auch Kapitel 8.1). Diese Frage ist von besonderer Relevanz für die Entwicklung von Therapieansätzen.

Schließlich liegt auch eine große Herausforderung in der Frage, ob und welche RNPs außer den UsnRNPs mit Hilfe des SMN-Komplexes zusammengebaut werden. In jüngster Zeit konnten bereits zwei Beispiele hierfür gezeigt werden: das U7snRNP (Pillai et al., 2003) und das Herpesvirus saimiri, welches den SMN-Komplex benutzt um Sm-cores auf seine kurzen viralen RNAs zu laden (Golembe et al., 2005). Weitere Studien werden zeigen, ob dies auch auf weitere RNPs wie z.B. das U6snRNP zutrifft.

9. Literaturverzeichnis

- Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M. und R, L. (1999) A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'- end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *Embo J*, **18**, 5789-5802.
- Appel, B., Korzh, V., Glasgow, E., Thor, S., Edlund, T., Dawid, I.B. und Eisen, J.S. (1995) Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish. *Development*, **121**, 4117-4125.
- Beattie, C.E. (2000) Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res Bull*, **53**, 489-500.
- Bertrand, S., Burlet, P., Clermont, O., Huber, C., Fondrat, C., Thierry-Mieg, D., Munnich, A. und Lefebvre, S. (1999) The RNA-binding properties of SMN: deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum Mol Genet*, **8**, 775-782.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. und Luhrmann, R. (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *Rna*, **7**, 1531-1542.
- Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L. und Luhrmann, R. (2000) The C-terminal RG Dipeptide Repeats of the Spliceosomal Sm Proteins D1 and D3 Contain Symmetrical Dimethylarginines, Which Form a Major B-cell Epitope for Anti-Sm Autoantibodies. *J Biol Chem*, **275**, 17122-17129.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Haendler, B. und Jacob, M. (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *Embo J*, **1**, 1259-1265.
- Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S. und Clarke, S. (2001) PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem*, **276**, 32971-32976.
- Bringmann, P. und Luhrmann, R. (1986) Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *Embo J*, **5**, 3509-3516.
- Buhler, D., Raker, V., Luhrmann, R. und Fischer, U. (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **8**, 2351-2357.
- Cartegni, L. und Krainer, A.R. (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*, **30**, 377-384.

- Chisholm, A. und Tessier-Lavigne, M. (1999) Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, **9**, 603-615.
- Dragon, F., Pogacic, V. und Filipowicz, W. (2000) In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol Cell Biol*, **20**, 3037-3048.
- Ellison, V. und Stillman, B. (2001) Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell*, **106**, 655-660.
- England, T.E. und Uhlenbeck, O.C. (1978) 3'-terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. *Nature*, **275**, 560-561.
- Faustino, N.A. und Cooper, T.A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, **17**, 419-437.
- Feng, W., Gubitz, A.K., Wan, L., Battle, D.J., Dostie, J., Golembe, T.J. und Dreyfuss, G. (2005) Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex. *Hum Mol Genet*, **14**, 1605-1611.
- Fischer, U., Liu, Q. und Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, **90**, 1023-1029.
- Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. und Luhrmann, R. (1993) Nucleocytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *Embo J*, **12**, 573-583.
- Friesen, W.J. und Dreyfuss, G. (2000) Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem*, **275**, 26370-26375.
- Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. und Dreyfuss, G. (2001a) SMN, the Product of the Spinal Muscular Atrophy Gene, Binds Preferentially to Dimethylarginine-Containing Protein Targets. *Mol. Cell*, **7**, 1111-1117.
- Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M. und Dreyfuss, G. (2001b) The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol*, **21**, 8289-8300.
- Golas, M.M., Sander, B., Will, C.L., Luhrmann, R. und Stark, H. (2003) Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science*, **300**, 980-984.
- Golembe, T.J., Yong, J., Battle, D.J., Feng, W., Wan, L. und Dreyfuss, G. (2005) Lymphotropic Herpesvirus saimiri uses the SMN complex to assemble Sm cores on its small RNAs. *Mol Cell Biol*, **25**, 602-611.
- Grimmler, M., Bauer, L., Nousiainen, M., Korner, R., Meister, G. und Fischer, U. (2005) Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep*, **6**, 70-76.
- Grundhoff, A.T., Kremmer, E., Türeci, Ö., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Müller-Lantzsch, N., Schubach, W.H. und Grässer, F.A. (1999) Characterisation of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear

- proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.*, **27**, 19136-19144.
- Hamm, J., Dathan, N.A., Scherly, D. und Mattaj, I.W. (1990) Multiple domains of U1 snRNA, including U1 specific protein binding sites, are required for splicing. *Embo J*, **9**, 1237-1244.
- Hamm, J., Kazmaier, M. und Mattaj, I.W. (1987) In vitro assembly of U1 snRNPs. *Embo J*, **6**, 3479-3485.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Huber, J., Dickmanns, A. und Luhrmann, R. (2002) The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J Cell Biol*, **156**, 467-479.
- Jablonka, S., Bandilla, M., Wiese, S., Buhler, D., Wirth, B., Sendtner, M. und Fischer, U. (2001) Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **10**, 497-505.
- Jablonka, S., Schrank, B., Kralewski, M., Rossoll, W. und Sendtner, M. (2000) Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet*, **9**, 341-346.
- Jarmolowski, A. und Mattaj, I.W. (1993) The determinants for Sm protein binding to Xenopus U1 and U5 snRNAs are complex and non-identical. *EMBO J.*, **12**, 223-232.
- Jones, K.W., Gorzynski, K., Hales, C.M., Fischer, U., Badbanchi, F., Terns, R.M. und Terns, M.P. (2001) Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem*, **276**, 38645-38651.
- Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J.M., de la Fortelle, E., Raker, V.A., Luhrmann, R., Li, J. und Nagai, K. (1999) Crystal Structures of Two Sm Protein Complexes and Their Implications for the Assembly of the Spliceosomal snRNPs. *Cell*, **96**, 375-387.
- Kashima, T. und Manley, J.L. (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **34**, 460-463.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. und Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, **203**, 253-310.
- Krapivinsky, G.B., Ackerman, M.J., Gordon, E.A., Krapivinsky, L.D. und Clapham, D.E. (1994) Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell*, **76**, 439-448.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. und et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene [see comments]. *Cell*, **80**, 155-165.

- Lefebvre, S., Bulet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G. und Melki, J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **16**, 265-269.
- Liu, Q. und Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J*, **15**, 3555-3565.
- Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. und Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, **90**, 1013-1021.
- Lorson, C.L. und Androphy, E.J. (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*, **9**, 259-265.
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. und Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6307-6311.
- McBride, A.E. und Silver, P.A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, **106**, 5-8.
- McConnell, T.S., Lokken, R.P. und Steitz, J.A. (2003) Assembly of the U1 snRNP involves interactions with the backbone of the terminal stem of U1 snRNA. *Rna*, **9**, 193-201.
- McWhorter, M.L., Monani, U.R., Burghes, A.H. und Beattie, C.E. (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol*, **162**, 919-931.
- Meister, G., Buhler, D., Laggenbauer, B., Zobawa, M., Lottspeich, F. und Fischer, U. (2000) Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet*, **9**, 1977-1986.
- Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. und Fischer, U. (2001a) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat Cell Biol*, **3**, 945-949.
- Meister, G., Eggert, C., Buehler, D., Brahm, H., Kambach, C. und Fischer, U. (2001b) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Current Biology*, **11**, 1990-1994.
- Meister, G., Eggert, C. und Fischer, U. (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol*, **12**, 472-478.
- Meister, G. a. F. U. (2002) Assisted RNP assembly from purified components: SMN- and pICln-complexes cooperate in the formation of spliceosomal U snRNPs. *submitted*.
- Melancon, E., Liu, D.W., Westerfield, M. und Eisen, J.S. (1997) Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J Neurosci*, **17**, 7796-7804.
- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J. und Bordonne, R. (2002)

- Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol Cell*, **9**, 891-901.
- Narayanan, U., Ospina, J.K., Frey, M.R., Hebert, M.D. und Matera, A.G. (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet*, **11**, 1785-1795.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. und Mattaj, I.W. (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell*, **101**, 187-198.
- Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B. und Dreyfuss, G. (2001) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol*, **11**, 1079-1088.
- Pellizzoni, L., Charroux, B. und Dreyfuss, G. (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11167-11172.
- Pillai, R.S., Grimmier, M., Meister, G., Will, C.L., Luhrmann, R., Fischer, U. und Schumperli, D. (2003) Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev*, **17**, 2321-2333.
- Pillai, R.S., Will, C.L., Luhrmann, R., Schumperli, D. und Muller, B. (2001) Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *Embo J*, **20**, 5470-5479.
- Ponting, C.P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci*, **22**, 51-52.
- Pu, W.T., Krapivinsky, G.B., Krapivinsky, L. und Clapham, D.E. (1999) pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 4113-4120.
- Raker, V.A., Hartmuth, K., Kastner, B. und R, L. (1999) Spliceosomal U snRNP Core Assembly: Sm Proteins Assemble onto an Sm Site RNA Nonanucleotide in a Specific and Thermodynamically Stable Manner. *Mol Cell Biol*, **19**, 6554-6565.
- Raker, V.A., Plessel, G. und Luhrmann, R. (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *Embo J*, **15**, 2256-2269.
- Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R. und Sendtner, M. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*, **163**, 801-812.
- Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S. und Seraphin, B. (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *Embo J*, **18**, 3451-3462.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

- Scheffner, M., Knippers, R. und Stahl, H. (1989) RNA unwinding activity of SV40 large T antigen. *Cell*, **57**, 955-963.
- Schrank, B., Gotz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G. und Sendtner, M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9920-9925.
- Steward, O. (2002) Translating axon guidance cues. *Cell*, **110**, 537-540.
- Sumpter, V., Kahrs, A., Fischer, U., Kornstadt, U. und Luhrmann, R. (1992) In vitro reconstitution of U1 and U2 snRNPs from isolated proteins and snRNA. *Mol Biol Rep*, **16**, 229-240.
- Tear, G. (1999) Neuronal guidance. A genetic perspective. *Trends Genet*, **15**, 113-118.
- Tessier-Lavigne, M. und Goodman, C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science*, **274**, 1123-1133.
- Toro, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Seraphin, B. und Suck, D. (2001) RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *Embo J*, **20**, 2293-2303.
- Wan, L., Battle, D.J., Yong, J., Gubitzi, A.K., Kolb, S.J., Wang, J. und Dreyfuss, G. (2005) The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol Cell Biol*, **25**, 5543-5551.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J. und Riggleman, B. (1996) Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development*, **122**, 271-280.
- Westerfield, M. 1995 The Zebrafish Book. University of Oregon Press, Eugene, Oregon
- Will, C.L. und Luhrmann, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 290-301.
- Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Lagerbauer, B. und Fischer, U. (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev*, im Druck, Oktoberausgabe 2005.
- Winkler, C., Schafer, M., Duschl, J., Scharl, M. und Volff, J.N. (2003) Functional divergence of two zebrafish midkine growth factors following fish-specific gene duplication. *Genome Res*, **13**, 1067-1081.
- Yan, X., Mouillet, J.F., Ou, Q. und Sadovsky, Y. (2003) A novel domain within the DEAD-box protein DP103 is essential for transcriptional repression and helicase activity. *Mol Cell Biol*, **23**, 414-423.
- Yong, J., Pellizzoni, L. und Dreyfuss, G. (2002) Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex. *Embo J*, **21**, 1188-1196.

-
- Young, P.J., Man, N., Lorson, C.L., Le, T.T., Androphy, E.J., Burghes, A.H. und Morris, G.E. (2000) The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding [In Process Citation]. *Hum Mol Genet*, **9**, 2869-2877.
- Zeller, R., Carri, M.T., Mattaj, I.W. und De Robertis, E.M. (1984) *Xenopus laevis* U1 snRNA genes: characterisation of transcriptionally active genes reveals major and minor repeated gene families. *Embo J*, **3**, 1075-1081.
- Zhang, H.L., Pan, F., Hong, D., Shenoy, S.M., Singer, R.H. und Bassell, G.J. (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci*, **23**, 6627-6637.

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	Alpha
β	Beta
μ	Mikro
A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-Diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5´-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5´-Triphosphatase
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CNBr-aktivierte Sepharose	Cyan-Bromid-aktivierte Sepharose
cpm	Zerfälle pro Minute (engl.: counts per minute)
d	desoxy
Da	Dalton

ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
et al.	und andere (lat.: et alterae)
FCS	Foetales Kälberserum (engl: fetal calf serum)
g	Gramm
G	Guanosin
GpppG	Guanylyl-(5'-5')-Guanosin-Triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
k-	Kilo-
l	Liter
m-	Milli-
M	molar
μg	Mikrogramm

m ³ G	N ² ,N ² , N ⁷ -Trimethylguanosin
m ⁷ G	N ⁷ -Monomethylguanosin
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger-RNA)
n-	Nano-
p-	Piko-
³² P	radioaktives Phosphorisotop der Massenzahl 32
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate-buffered saline)
pCp	Cytidin-3´-5´-Bisphosphat
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
prä-mRNA	Primärtranskript einer mRNA
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten

SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl.:sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SIP1	SMN interagierendes Protein 1/Gemin2
siRNA	short interfering RNA
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	Survival Motor Neuron Gen
SMN	Survival Motor Neuron Protein
snRNA	kleine nukleäre RNA (engl.:small nuclear RNA)
snRNP	kleines nukleäres RNP (engl.:small nuclear RNP)
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (engl.:small nucleolar RNA)
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (engl.:small nucleolar RNP)
T	Thymin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
3'UTR	3'-untranslatierte Region
5'UTR	5'-untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
vol	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

10.2 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln publiziert:

Winkler C, Eggert C *, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Lagerbauer B, Wedlich D, Fischer U. (2005) Reduced production of UsnRNPs leads to motor neuron degeneration: implications for spinal muscular atrophy. *Genes&Development*, im Druck (Oktoberausgabe 2005).

* gleichberechtigte Autorenschaft der ersten drei Autoren

Eggert C, Fischer U. (2003) Der Spinalen Muskelatrophie auf der Spur. *Bioforum* **11**/2003, 704-706.

Eggert C, Fischer U. (2003) RNA-Interferenz: Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion. *Biospektrum* **4**/2003, 372-374.

Meister G, Eggert C, Fischer U. (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol* Oct;**12**(10):472-8.

Meister G, Eggert C, Buhler D, Brahms H, Kambach C, Fischer U. (2001) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol* Dec **11**;11(24):1990-4.

10.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Fischer für die Überlassung des Themas, eine sehr gute Betreuung und mir jederzeit offen stehende Türen.

Herrn Professor Grummt danke ich herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Ebenso danke ich Herrn Professor Höhn für die Bereitschaft, als dritter Prüfer meine Prüfungskommission zu vervollständigen.

Vielen Dank an die ganze Arbeitsgruppe für die nette Arbeitsatmosphäre, vor allem aber an das rosa Labor, Simone, Michaela und Andrea, ich werde den täglichen Testosteronschub vermissen. Und nicht zu vergessen, auch ein großer Dank an Frau Kießling, Herrn Sickinger, Gudrun, Lissy, Erika, Emilia und Frau Hohmann dafür, dass der Laden immer lief. Merci bien auch an meine Laborsklaven Andreas und Charlotte (tja, jeder fängt mal ganz unten an..., gell?!). Special thanks auch an meine growse Idol Michael Howie Klingendale für die growsartige Musik. Wonderful!

Bernhard (Mister „Born to fish, forced to work“), einen riesigen Dank für unzählige Korrekturen und tröstende Worte zum Thema Fahrstuhlmannschaft!!! Am End hät et jo immer noh joot jejange...

Lisa & Liane, das Duo infernale..., was soll ich noch sagen?!!!

Dank auch an das Martinsrieder Labor: Gunter, Oliver, Eva, Martin,....., vor allem aber an Gaby für viele lustige Stunden und an Massimo als meinen Italienisch-Lehrer!

Merci bien, Neige et Alexandra, pour tous les jours magnifiques à Blaubeuren, Vienna, Göttingen, Banff et bien sûr à Bern...!

Christoph Winkler und Marieke Giegerich danke ich für die gute Zusammenarbeit in dem Zebrafisch-Projekt. Monika Golas und Björn Sander gilt mein Dank für die nette Zusammenarbeit am Kryo-Elektronenmikroskop.

Ein großer Dank gebührt auch meinen Eltern, ohne die das alles hier nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank auch Dir, Simone, für Deine Geduld und nimmermüde Unterstützung!

Allen meinen guten Freunden, die ich während dieser Zeit oft vernachlässigt habe und die mir trotzdem treu geblieben sind: Danke!

10.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eggert
Vorname: Christian
Wohnort: Alte Kasernstrasse 20, 97082 Würzburg
Geburtsdatum: 28. April 1975
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1985 -1994 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Bergisch Gladbach
1994 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Laufbahn

1994 - 2000 Studium der Biologie an den Universitäten Würzburg und Bonn
2000 Diplom im Fach Biologie (Note 1,3)
1999 - 2000 Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie der Pflanzen, Universität Bonn, Arbeitsgruppe Professor Menzel
2000 - 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in einem Schmerzforschungsprojekt am Institut für Anästhesiologie der Universitätsklinik Bonn
2001 - 2005 Anfertigen der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried und der Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Professor Fischer

10.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Untersuchungen zur Biogenese spleißosomaler UsnRNPs und ihrer Bedeutung für die Pathogenese der SMA“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im September 2005