

**Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner

**Untersuchungen zum Pathomechanismus
der spinalen Muskelatrophie (SMA):
Funktionen des SMN-Proteins für das Axonwachstum**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kathrin Nora Karle

aus Würzburg

Würzburg, April 2007

**Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner

**Untersuchungen zum Pathomechanismus
der spinalen Muskelatrophie (SMA):
Funktionen des SMN-Proteins für das Axonwachstum**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kathrin Nora Karle

aus Würzburg

Würzburg, April 2007

Referent: Professor Dr. med. Michael Sendtner

Koreferent: Professor Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die spinale Muskelatrophie (SMA)	1
1.1.1	Klinisches Erscheinungsbild der SMA.....	1
1.1.2	Genetische Grundlage der spinalen Muskelatrophie beim Menschen	2
1.1.3	Verteilung des SMN-Proteins.....	4
1.1.4	Bindungspartner und Funktionen des SMN-Proteins.....	6
1.1.5	Tiermodelle für SMA	10
1.2	Molekularbiologische Grundlagen	13
1.2.1	Axonaler Transport der β -Aktin-mRNA	13
1.2.2	Das somatoviszzerale sensorische System.....	14
2	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	16
3	Material	18
3.1	Technische Geräte	18
3.2	Mauslinie $Smn^{-/-};SMN2$	18
3.3	Medien, Puffer, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur	18
3.3.1	Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.....	18
3.3.2	Medien.....	19
3.3.3	Puffer	19
3.3.4	Lösungen	20
3.3.5	Zusätze.....	20
3.4	Antikörper	21
3.5	Reagenzien für die PCR und Gelelektrophorese.....	21
4	Methoden	23
4.1	Präparation des Rückenmarks und der Hinterwurzelganglien (DRGs).....	23
4.2	Motoneuronzellkultur	23
4.3	Zellkultur der sensorischen Neurone aus den Hinterwurzelganglien (DRGs)....	24
4.4	Bestimmung der Überlebensraten	25
4.5	Immunocytochemie der Moto- und sensorischen Neurone.....	25
4.6	Datenanalyse	26
4.7	DNA-Aufreinigung	26
4.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27

4.9	Gelelektrophorese.....	28
5	Ergebnisse	29
5.1	Untersuchung der Motoneurone.....	29
5.1.1	Bestimmung der Überlebensraten von kultivierten Motoneuronen	29
5.1.2	Längenmessungen der Nervenzellfortsätze von Motoneuronen	31
5.1.3	Verteilung des Zytoskelettproteins β -Aktin in Motoneuronen.....	34
5.1.4	Vergleich der Wachstumskegelflächen von Motoneuronen.....	38
5.1.5	Verteilung von hnRNP R in Motoneuronen.....	40
5.2	Untersuchung sensorischer Neurone der Hinterwurzelganglien (DRGs)	42
5.2.1	Längenmessungen der Zellfortsätze der sensorischen Neurone.....	42
5.2.2	Vergleich der Flächen der Wachstumskegel von sensorischen Neuronen .	46
6	Diskussion.....	50
6.1	Morphologische Veränderungen in kultivierten Motoneuronen	50
6.2	Morphologische Veränderungen in kultivierten sensorischen Nervenzellen der Hinterwurzelganglien (DRGs).....	56
7	Zusammenfassung	59
8	Literaturverzeichnis	61

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

ALS	amyotrophic lateral sclerosis, amyotrophe Lateralsklerose
ATP	adenosine triphosphate, Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bp	base pairs, Basenpaare
BPV	boviner Papilloma-Virus
BSA	bovine serum albumine, bovines Serum-Albumin
CB	coiled bodies, Cajal bodies
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CT-1	Cardiotrophin-1
DmSMN	<i>Drosophila melanogaster</i> SMN
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxynucleoside triphosphate, Desoxynukleosidtriphosphat
DRG	dorsal root ganglion, Hinterwurzelganglion
E#	embryonaler Entwicklungstag
EK	Endkonzentration
ESE	exonic splice enhancer
FL SMN	full length SMN
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
Gems	gemini of coiled bodies/Cajal bodies
GIP1	Gemin3 interacting protein 1
HeLa	Helene Lange
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
<i>hnRNP R-KO</i>	<i>hnRNP R-Knockout</i>
kb	kilobases, Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
MAP-2	microtubule associated protein 2
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NGF	nerve growth factor
NSE	Neuron-spezifische Enolase

nt	nucleotide, Nukleotid
NT-3	neurotrophin-3
PC12	pheochromocytoma cells, Phäochromozytom-Zellen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFN	Profilin
phospho-tau	phosphorylated tau protein, phosphoryliertes tau-Protein
pol II	Polymerase II
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RRM	RNA recognition motif, RNA-Bindungsdomäne
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
SIP1	SMN interacting protein 1
Sm-Proteine	Smith-Antigen Proteine
SMA	spinal muscular atrophy, spinale Muskelatrophie
SMARD	spinal muscular atrophy with respiratory distress
SMN	survival of motor neuron
<i>Smn</i> ^{+/+}	<i>Smn</i> -Wildtyp
<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> -Wildtyp, transgen für humanes <i>SMN2</i>
<i>Smn</i> ^{+/-}	heterozygoter <i>Smn</i> -KO
<i>Smn</i> ^{-/-}	homozygoter <i>Smn</i> -KO
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	homozygoter <i>Smn</i> -KO, transgen für humanes <i>SMN2</i>
snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
Trk	tyrosine kinase, Tyrosinkinase
TR SMN	truncated SMN, trunkiertes SMN
UsnRNA	uridine-rich small nuclear ribonucleic acid
UsnRNP	uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein
UTR	untranslated region, untranslatierte Region
ZBP	zipcode-binding protein, Zipcode-bindendes Protein
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die spinale Muskelatrophie (SMA)

Degenerative Motoneuronenerkrankungen sind eine heterogene Gruppe schwerer Krankheiten, bei denen der Verlust von Motoneuronen ein gemeinsames Symptom ist. Nach dem typischen Befallsmuster der oberen, der unteren oder beider Motoneuronklassen werden die Krankheiten weiter unterteilt. Eine Untergruppe von Motoneuronenerkrankungen ist die spinale Muskelatrophie (SMA). Bei dieser Erkrankung ist das zweite Motoneuron betroffen. Der klinische Phänotyp, die Vererbung, bekannte molekulare Grundlagen sowie vorhandene Tiermodelle der SMA sollen im Folgenden dargestellt werden. Im Gegensatz dazu sind bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beide Motoneuronklassen in den Krankheitsprozess miteinbezogen. Es kommt zu einer Kombination aus atrophischen und spastischen, rasch progredienten Lähmungen.

1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der SMA

Die spinale Muskelatrophie führt zu einer Degeneration der motorischen Vorderhornzellen im Rückenmark, d. h. der unteren α -Motoneurone. Die proximale spinale Muskelatrophie (SMA, OMIM #253300) wird autosomal-rezessiv vererbt. Sie tritt mit einer Häufigkeit von circa 1 : 5,000 bis 1 : 10,000 auf, die Heterozygotenfrequenz beträgt circa 1 : 50 (Pearn, 1973; Pearn, 1978a; Pearn, 1978b). Damit stellt sie eine der häufigsten erblichen Ursachen für den Tod im Kindesalter dar. Hauptkennzeichen ist eine langsam progrediente, symmetrische und proximal betonte Muskelschwäche und -atrophie. Die Patienten zeigen erloschene Muskeleigenreflexe und faszikuläre Zuckungen. Sekundär können Skelettanomalien (Skoliose, Hyperlordose) auftreten (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2002). Sensibilitätsstörungen gehören nicht zu den klassischen Kennzeichen der spinalen Muskelatrophie, werden jedoch vereinzelt bei der schwersten Form (Typ I) beobachtet: Es zeigen sich reduzierte sensible Nervenleitgeschwindigkeiten (Anagnostou et al., 2005) oder eine Unerregbarkeit sensorischer Nerven (Omran et al., 1998) und histologisch eine axonale Degeneration im Nervus suralis (Rudnik-Schöneborn et al., 2003). Vegetative Funktionen, wie Trophik und Entleerung von Blase und Darm, bleiben ungestört. Auch die Intelligenz ist nicht beeinträchtigt (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2002). Abhängig vom Beginn der Erkrankung, den erreichten motorischen

Meilensteinen und der Schwere des Verlaufes werden nach dem International SMA Consortium on Childhood SMA drei klinische Typen unterschieden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Kriterien für die Klassifikation der kindlichen Formen der SMA (nach Munsat und Davies, 1992).

Typ	Beginn (Monate)	motorische Meilensteine	Tod (Jahre)
I	< 6	niemals freies Sitzen	< 2
II	< 18	niemals freies Gehen	> 2
III	> 18	freies Stehen und Gehen	Erwachsenenalter

Die akute SMA Typ I (Werdnig-Hoffmann) beginnt innerhalb der ersten sechs Lebensmonate, bevor die Kinder das Sitzen erlernen. Eine schwere generalisierte Muskelschwäche führt zum Tod durch Atemlähmung meist innerhalb der ersten beiden Lebensjahre. Kinder mit SMA Typ II lernen das Sitzen, können jedoch nicht ohne Hilfe gehen. Sie werden meist älter als zwei Jahre. Von SMA Typ III (Kugelberg-Welander) betroffene Patienten zeigen eine proximal betonte Muskelschwäche, die erst nach einem Alter von 18 Monaten auftritt. Die Kinder können bis dahin sitzen und laufen. Die Krankheitsprogression ist variabel, so dass zum Teil eine normale Lebenserwartung erreicht wird (Munsat und Davies, 1992; Frugier et al., 2002; Nicole et al., 2002). Neben der klassischen proximalen SMA gibt es zahlreiche, jedoch seltenere Sonderformen mit jeweils unterschiedlichen Symptomen und verschiedenen Vererbungsmodi. Bei der Sonderform SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1) ist das führende Symptom eine lebensbedrohliche Ateminsuffizienz durch Zwerchfelllähmung. Der Genlocus wurde von Grohmann und Mitarbeitern identifiziert (Grohmann et al., 2001).

1.1.2 Genetische Grundlage der spinalen Muskelatrophie beim Menschen

Das Krankheitsgen der spinalen Muskelatrophie, das sogenannte *survival of motor neuron gene* (SMN-Gen), ist auf Chromosom 5q13 lokalisiert (Brzustowicz et al., 1990; Gilliam et al., 1990; Melki et al., 1990). Die chromosomale Region um das SMN-Gen liegt dupliziert vor und schließt mindestens vier Gene ein: SMN, NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), basal transcription factor subunit p44 und H4F5 (Lefebvre et al., 1995; Roy et

al., 1995; Bürglen et al., 1997; Carter et al., 1997; Scharf et al., 1998; Übersichtsartikel: Wirth, 2000).

Das *SMN*-Gen umfasst 20 Kilobasen (kb) und enthält neun Exone (Exon 1, 2a, 2b, 3–8) und acht Introne. Es liegt beim Menschen durch die Duplikation in zwei Kopien vor: ein telomer gelegenes *SMN*-Gen (*SMNt*, *SMN1*) und ein zentromer gelegenes *SMN*-Gen (*SMNc*, *SMN2*). *SMN1* und *SMN2* sind zu 99% homolog. Sie unterscheiden sich nur in insgesamt fünf Nukleotiden (Bürglen et al., 1996). Der Cytosin-zu-Thymidin-Austausch im sechsten Nukleotid von Exon 7 (Codon 280) des *SMN2*-Gens führt aufgrund eines alternativen Spleiß-Prozesses bei 90% der *SMN2*-Transkripte zu einem Verlust von Exon 7-kodierten Regionen und somit zu einem verkürzten Genprodukt (*SMN Δ Ex7*) (Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999b). Während also das *SMN1*-Gen zu 100% in ein funktionsfähiges SMN-Protein (full length SMN, FL SMN) übersetzt wird, wird vom *SMN2*-Gen hauptsächlich (90%) ein trunkiertes SMN-Protein (truncated SMN, TR SMN) gebildet und nur zu 10% das FL SMN-Protein (Lorson und Androphy, 2000). Das alternative Spleißen im *SMN2*-Gen wird durch eine schwache 5' Spleißstelle des Exons 7 begünstigt (Singh et al., 2004b). Im Exon 7 findet sich eine Region, die als ESE (exonic splice enhancer) fungiert und für den konstitutiven Einschluss des Exons 7 notwendig ist. Eine Störung in diesem Element könnte das geänderte Spleißen erklären (Lorson et al., 1999; Lorson und Androphy, 2000; DiDonato et al., 2001; Cartegni und Krainer, 2002). Andere experimentelle Ergebnisse zeigen, dass das Herausspleißen des Exons 7 durch zwei inhibitorische Regulationselemente begünstigt wird. Deren Hemmung führt zum Einschluss des Exons 7 (Singh et al., 2004a; Singh et al., 2004b; Singh et al., 2006).

Die spinale Muskelatrophie wird durch Verlust des *SMN1*-Gens bzw. in selteneren Fällen auch durch Mutationen innerhalb des *SMN1*-Gens verursacht und kann nicht durch das vorhandene intakte *SMN2*-Gen ausgeglichen werden (Lefebvre et al., 1995). Die genomische Organisation des SMA-Lokus bei Gesunden und bei Patienten mit SMA sowie die resultierenden Proteinmengen zeigt die Abbildung 1.

Im *SMN1*-Gen betroffener Patienten treten unterschiedliche Mutationen auf. Bei circa 95% der Patienten mit SMA findet man homozygot Deletionen in den Exonen 7 und 8 des Gens (Hahnen et al., 1995; Brahe et al., 1996), in 5% der Fälle ereigneten sich Punktmutationen in diesem Bereich (Brahe et al., 1996; Wirth et al., 1999; Skordis et al., 2001; Monani et al., 2003; Übersichtsartikel: Jablonka und Sendtner, 2003).

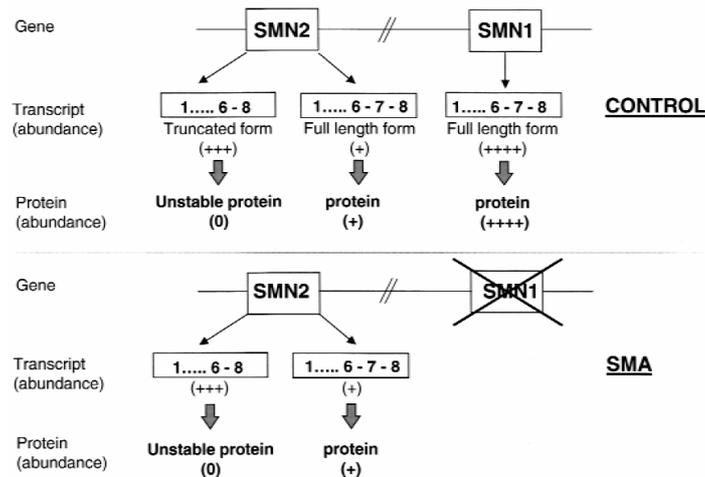


Abbildung 1. Obere Reihe: Genomische Organisation des SMA-Lokus bei Gesunden (Kontrolle). Die Transkripte des *SMN1*- und *SMN2*-Genes sind jeweils in den Boxen dargestellt. *SMN1* wird hauptsächlich in die intakte Form (1...6-7-8) übersetzt, während bei *SMN2* vor allem eine verkürzte Form gebildet wird, der das Exon 7 fehlt (1...6-8). Untere Reihe: Genomische Organisation des SMA-Lokus bei Patienten mit SMA. Mindestens eine Kopie des *SMN2*-Genes bleibt erhalten. Die Instabilität des trunkierten Proteins und die geringen Mengen an intaktem Protein führen zu einer verminderten Menge an SMN bei Patienten mit SMA (nach Nicole et al., 2002).

Bei der Mehrheit der Patienten mit SMA Typ I liegt im *SMN1*-Gen eine Deletion dieser Exone vor, bei der Mehrheit der Patienten mit SMA Typ II und III findet man eine Konversion des *SMN1*-Genes zum *SMN2*-Gen. Je höher jedoch die Anzahl der verbleibenden *SMN2*-Kopien bei den Patienten ist, desto mehr (intaktes und trunkiertes) *SMN*-Transkript wird gebildet und desto schwächer ausgeprägt ist der Phänotyp. Die spinale Muskelatrophie ist bedingt durch einen klassischen Gendosis-Effekt (Burghes, 1997; Campbell et al., 1997; DiDonato et al., 1997a; Parsons et al., 1998; Vitali et al., 1999; Prior et al., 2004; Yamashita et al., 2004; Cuscó et al., 2006; Wirth et al., 2006; Übersichtsartikel: Wirth, 2000).

1.1.3 Verteilung des SMN-Proteins

Das 38 Kilodalton (kDa) große SMN-Protein besteht aus 294 Aminosäureeinheiten. Die Sequenz zeigt keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen. Die Proteinstruktur ist hochkonserviert; es finden sich im Tierreich zahlreiche Analoga, so zum Beispiel in der Maus (Schrank et al., 1997), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Miguel-Aliaga et al., 2000), dem Rundwurm *Caenorhabditis elegans* (Miguel-Aliaga et al., 1999) oder der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Hannus et al., 2000; Owen et al., 2000; Paushkin et al., 2000). Das SMN-Protein wird ubiquitär exprimiert. Hohe Mengen an SMN werden in humanen fetalen Geweben gefunden mit einem deutlichen Rückgang in der postnatalen

Periode (Burllet et al., 1998). Größere Mengen an SMN sind besonders in den Motoneuronen des Rückenmarks vorhanden (Battaglia et al., 1997). In allen untersuchten Geweben von Patienten mit SMA sind die Mengen an SMN-Protein signifikant reduziert (Burllet et al., 1998), stark betroffen ist hierbei auch das Rückenmark (Coover et al., 1997). Die Proteinmenge ist bei Typ I SMA Patienten geringer als bei den Typen II und III (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; Burllet et al., 1998).

Die Promotorsequenz und -aktivität der beiden *SMN*-Gene ist identisch. Eine unterschiedliche Regulation der Genexpression als Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Proteinmenge kann daher weitgehend ausgeschlossen werden (Echaniz-Laguna et al., 1999; Monani et al., 1999a).

Innerhalb einer Zelle ist SMN homogen im Zytoplasma verteilt. Im Zellkern finden sich punktartige Ansammlungen von SMN sowohl in den sogenannten Gems (gemini of coiled bodies), die den coiled bodies/Cajal bodies (CB) benachbart sind (Liu und Dreyfuss, 1996; Young et al., 2000a; Malatesta et al., 2004), als auch in den Cajal bodies selbst (Carvalho et al., 1999). Für die Cajal bodies wird angenommen, dass sie an der Assemblierung der Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind (Gall, 2000). Die Anzahl der Gems ist in Geweben von SMA-Patienten deutlich vermindert. Auch hier zeigt sich eine Korrelation zum Schweregrad der Erkrankung. Von Typ III über Typ II zu Typ I findet man schrittweise weniger Gems (Coover et al., 1997). Der Aufbau der Cajal bodies wird durch Depletion von SMN gestört (Girard et al., 2006).

Da sich im Fall der spinalen Muskelatrophie speziell die Frage nach der Motoneuron-spezifität stellt, wurde die Verteilung von SMN in Motoneuronen genauer untersucht. Neben der Anreicherung in Zytoplasma und Zellkern (Gems und Cajal bodies) konnte das SMN-Protein auch in punktförmigen Ansammlungen entlang der Dendriten und Axone und in den axonalen Wachstumskegeln nachgewiesen werden (Béchade et al., 1999; Pagliardini et al., 2000; Fan und Simard, 2002; Zhang et al., 2003). Die intrazelluläre Verteilung des SMN-Proteins im humanen ZNS ändert sich im Laufe der Entwicklung: Während in frühen Entwicklungsstadien hauptsächlich der Zellkern SMN enthält, finden sich in späteren Stadien starke Anreicherungen im Zytoplasma und in den Axonen der Nervenzellen (Giavazzi et al., 2006). Der Transport des SMN-Proteins über längere Strecken erwies sich als Mikrotubuli-abhängig, für kurze Strecken ist intaktes Mikrofilament erforderlich (Zhang et al., 2003). Im Gegensatz zum intakten SMN-Protein

ist SMN Δ Ex7 ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Das Exon 7 enthält also eine Sequenz, die für die korrekte Lokalisation des Proteins verantwortlich ist. Daneben zeigen diese Motoneurone ein um 25% verkürztes Neuritenwachstum (Wang und Dreyfuss, 2001; Zhang et al., 2003). Insgesamt deutet dies auf das Vorliegen eines aktiven axoplasmatischen Transports des SMN-Proteins und auf eine Funktion des SMN-Proteins für das Auswachsen von Neuriten hin.

1.1.4 Bindungspartner und Funktionen des SMN-Proteins

SMN ist ein Tudor-Domänen-Protein (Selenko et al., 2001), das durch mehrere Bindungsstellen für verschiedene Proteine gekennzeichnet ist (Abbildung 2).

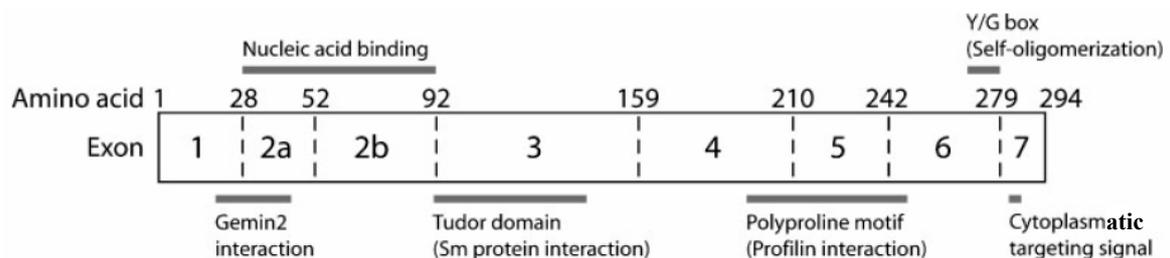


Abbildung 2. Schematisches Diagramm des SMN-Proteins mit den kodierenden Exonen und der relativen Lage ausgesuchter Domänen mit bekannter Funktion. Im SMN2-Gen wird das Exon 7 herausgespleißt. Dies führt zu einem trunkeierten Protein, dem die C-terminalen 16 Aminosäureeinheiten fehlen (nach Briese et al., 2005).

Das SMN-Protein besitzt in Exon 2-kodierten Domänen eine Bindungsstelle für Nukleinsäuren (Lorson und Androphy, 1998b) und im Exon 6-kodierten Bereich eine Bindungsstelle für weitere SMN-Proteine. Das Fehlen von Exon 7-kodierten Domänen führt zu einer verminderten Eigenbindung des SMN-Proteins, die mit dem klinischen Schweregrad korreliert (Lorson et al., 1998a).

Gemin2/SIP1 (SMN interacting protein 1) bindet an das aminoternale Ende des SMN-Proteins (Liu et al., 1997; Young et al., 2000b). Beide Proteine sind in den verschiedenen Geweben sehr ähnlich verteilt, auch verlaufen die Mengenänderungen während der Entwicklung parallel. Bei *Smn*^{+/-} Mäusen und bei Patienten mit SMA war sowohl die Menge an SMN als auch die Menge an Gemin2 vermindert (Jablonka et al., 2001). Die beiden Proteine scheinen also koreguliert zu werden. In kultivierten Motoneuronen findet sich im Zellkörper eine Kolo-kalisation von Gemin2 und SMN sowohl im Zytoplasma als auch in den Gems (Jablonka et al., 2001). In den Nervenzellfortsätzen finden Zhang et al. (2006) zum einen eine Kolo-kalisation von SMN und Gemin2 in granulären

Anreicherungen und zum anderen eine größere Menge an beiden Proteinen, die unabhängig voneinander in den Axonen verteilt sind. Sharma et al. (2005) zeigten, dass SMN und Gemin-Proteine in den Axonen stets kolokalisiert sind, während Jablonka et al. (2001) diese Kolokalisation nicht sehen konnten. Gemin3/dp103, Gemin5/p175 und Gemin7 binden direkt an SMN und an mehrere Sm-Proteine (Smith-Antigen Proteine) (Charroux et al., 1999; Baccon et al., 2002; Gubitx et al., 2002). Gemin4/GIP1 (Gemin3 interacting protein 1) bindet an Gemin3 (Charroux et al., 2000), Gemin6 wird über die Bindung an Gemin7 an den SMN-Komplex angegliedert (Pellizzoni et al., 2002a). Gemin8 bindet direkt an das Gemin6-Gemin7-Heterodimer. Seine Expression ist in Zellen mit niedrigem SMN-Protein-Gehalt herunterreguliert (Carissimi et al., 2006). Zusammenfassend sind die Proteine Gemin2 bis Gemin8 und das SMN-Protein in den Gerns und im Zytoplasma kolokalisiert und in einem gemeinsamen Komplex assoziiert, der in Abbildung 3 dargestellt ist (Übersichtsartikel: Gubitx et al., 2004).

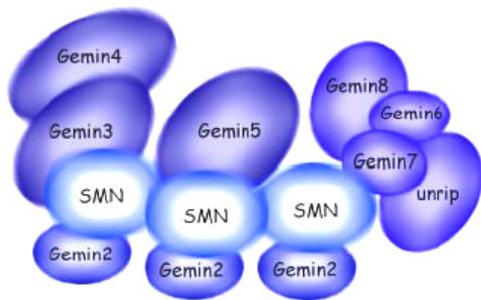


Abbildung 3. Schematische Darstellung der bislang bekannten Komponenten des SMN-Komplexes und ihrer gegenseitigen Interaktionen (nach Carissimi et al., 2006).

SMN bindet transient an Komponenten des Spleißosoms, nämlich einzelne UsnRNAs (uridine-rich small nuclear ribonucleic acids) und Sm-Proteine (Bühler et al., 1999; Pellizzoni et al., 1999; Friesen und Dreyfuss, 2000; Selenko et al., 2001; Yong et al., 2004). Die Bildung des Spleißosoms ist schematisch in Abbildung 4 gezeigt.

Zunächst werden die UsnRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert. Die Sm-Proteine bilden einen ringförmigen Sm-Kern mit einer Bindungsstelle für die UsnRNAs in der Mitte. Dies ist notwendig für die Reifung der UsnRNPs (UsnRNP, uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein). Der Komplex aus Sm-Proteinen und UsnRNAs wird als UsnRNP bezeichnet und in den Zellkern zurücktransportiert. Dort binden im letzten Schritt die UsnRNP-spezifischen Proteine an den Komplex (Will und Lührmann, 2001).

Während die UsnRNP-Assemblierung *in vitro* spontan abläuft, zeigt sich *in vivo* eine Abhängigkeit von ATP (Adenosintriphosphat) und von der Anwesenheit des SMN-Komplexes (Meister et al., 2001). Der SMN-Komplex garantiert die koordinierte Bildung

der UsnRNPs und verhindert unspezifische Bindungen (Pellizzoni et al., 2002b). Damit ist der SMN-Komplex an der Biogenese der spleißosomalen snRNPs beteiligt (Fischer et al., 1997; Jablonka et al., 2002; Übersichtsartikel: Meister et al., 2002). Paushkin et al. (2002) bezeichnen ihn nach seiner Funktion bei der Assemblierung als „Assemblysome“.

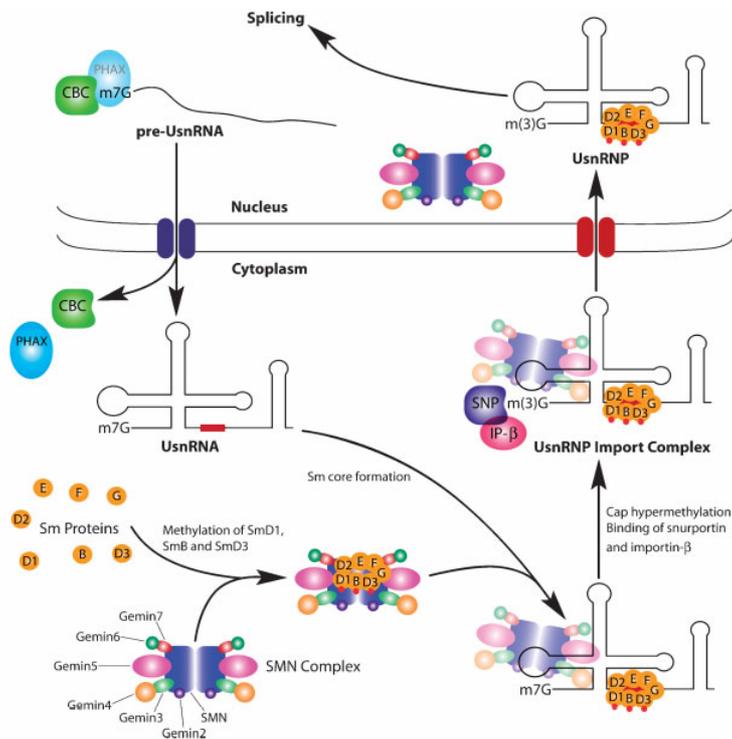


Abbildung 4. Funktion des SMN-Proteins bei der Bildung des Spleißosoms. Nach der Transkription werden die prä-UsnRNAs am 5' Ende gekappt. Die weitere Reifung der UsnRNAs findet im Zytoplasma statt und benötigt die Bildung des Sm-Kerns durch Zusammenlagerung mehrerer Sm-Proteine an die UsnRNAs. Der SMN-Komplex hilft bei der Zusammenlagerung der Sm-Proteine, bevor er diese ATP-abhängig auf die UsnRNAs transferiert. Nach dem Reimport in den Zellkern fungieren die UsnRNPs als Teil des Spleißosoms für das Spleißen von prä-mRNAs (nach Briese et al., 2005).

Die Ausschaltung einzelner Komponenten des SMN-Komplexes, d. h. SMN oder einzelner Gemin-Proteine, führt zu einer Beeinträchtigung der snRNP-Assemblierung in HeLa-Zellen (Feng et al., 2005; Shpargel und Matera, 2005; Carissimi et al., 2006). Bei Fibroblasten von Patienten mit SMA finden sich ähnliche Störungen (Wan et al., 2005; Renvoisé et al., 2006), ebenso wie bei den verschiedenen Tiermodellen, bei denen es zu einem Entwicklungsstopp bzw. zur Motoneurondegeneration kommt (Jablonka et al., 2002; Winkler et al., 2005). Der Defekt im SMN-Protein führt also zu einer Störung der Spleißosom-Assemblierung. Daraus ergibt sich die Frage, ob dadurch dessen Funktion, das korrekte Spleißen von prä-mRNA, gestört ist. *In vitro* können derartige Defekte beobachtet werden (Pellizzoni et al., 1998). Im Mausmodell der SMA zeigen sich bei den

untersuchten prä-mRNAs (Ich-1) jedoch keine Spleißdefekte (Jablonka et al., 2000a; Jablonka et al., 2004).

Neben der Bindung von SMN an Proteine des SMN-Komplexes wurden zahlreiche weitere Interaktionen mit anderen Proteinen gefunden, die auf anderweitige Funktionen des SMN-Proteins hindeuten: Fibrillarin und GAR1 sind Teil der snoRNPs (small nucleolar ribonucleoproteins), die im Nukleolus für prä-rRNA-Transkription und -Prozessierung verantwortlich sind. Beide binden an das SMN-Protein, das ebenfalls im Nukleolus gefunden wird und damit möglicherweise an prä-rRNA-Spleiß-Vorgängen beteiligt ist (Liu und Dreyfuss, 1996; Jones et al., 2001; Pellizzoni et al., 2001b). Der bovine Papillomavirus (BPV) E2-Transaktivator wurde als direkter Bindungspartner des SMN-Proteins identifiziert. Eine transiente Expression des SMN-Proteins erhöht die E2-abhängige Genaktivierung. Missense-Mutationen im *SMN*-Gen, wie sie bei Patienten mit SMA gefunden werden, hemmen dagegen die E2-Aktivität. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Funktion des SMN-Proteins für die Regulation der Genexpression hin (Strasswimmer et al., 1999). Eine Verminderung der Menge an FL SMN führt zu einer Fehlverteilung sowie verminderten Transkriptionsaktivität einer Polymerase (pol II) und kann ein Hinweis für eine Funktion des SMN-Komplexes bei der Zusammenlagerung des Transkriptosoms sein (Pellizzoni et al., 2001a).

Profiline (PFNs) sind kleine Proteine, die an der Kontrolle der Aktin-Dynamik beteiligt sind. Motoneurone enthalten besonders reichlich mRNA für beide Profilin-Isoformen. Die Profilin-Proteine kolokalisieren mit SMN in den Gems und im Zytoplasma (Giesemann et al., 1999). In PC12-Zellen findet sich eine weitere Kolokalisation in den Neuriten-ähnlichen Zellfortsätzen, hier besonders in den Wachstumskegeln (Sharma et al., 2005). Die direkte Bindung der Profiline an das SMN-Protein erfolgt über dessen poly-Prolin-Domänen. *SMN Δ Ex7* kann dagegen keine Profiline binden (Giesemann et al., 1999). Profilin II alleine führt zu einer verminderten Aktin-Stabilität (Da Silva et al., 2003; Sharma et al., 2005). Dagegen bewirkt der Komplex aus Profilin II und SMN eine vermehrte Aktin-Polymerisation (Sharma et al., 2005).

Die Familie der hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) besteht bisher aus circa 30 Proteinen, die eine wichtige Rolle für alle Aspekte der mRNA-Prozessierung spielen, so für prä-mRNA-Spleißen, mRNA-Transport, -Translation, -Stabilität und -Turnover (Kiebler und DesGroseillers, 2000; Shyu und Wilkinson, 2000; Mourelatos et

al., 2001). Durch das Yeast-Two-Hybride System konnten die sehr nahe verwandten Proteine hnRNP R und Q als Interaktionspartner des SMN-Proteins identifiziert werden (Mourelatos et al., 2001; Rossoll et al., 2002). Die Aminosäuresequenzen beider Proteine sind zwischen Maus und Mensch zu 98–99% identisch. Mutierte Formen des SMN-Proteins versagen bei der Bindung. Neben der Bindungsstelle für SMN besitzt hnRNP R zwei RNA-Bindungsdomänen (RNA recognition motif, RRM), eine dritte ist nur putativ. hnRNP R wird in vielen Geweben exprimiert. Die Proteinmenge im Rückenmark ist in der späten Embryogenese am höchsten und fällt nach der Geburt stark ab. Im Nervensystem findet sich hnRNP R hauptsächlich in Motoneuronen und weniger in sensorischen Neuronen. Innerhalb der Zelle ist hnRNP R im Zytoplasma und in den Neuriten verteilt. hnRNP R kolokalisiert nicht mit SMN in den Gems. In den Nervenzellfortsätzen findet sich hnRNP R hauptsächlich in den Axonen, deutlich weniger in den Dendriten (Rossoll et al., 2002).

1.1.5 Tiermodelle für SMA

Die Duplikation des *SMN*-Gens stellt ein evolutionsgeschichtlich spätes Ereignis dar; nur der Mensch und die Primaten besitzen ein dupliziertes *SMN*-Gen. Der Mensch allein trägt ein *SMN2*-Gen, das durch alternatives Spleißen in ein trunkiertes SMN-Protein übersetzt wird (Rochette et al., 2001). Die Maus besitzt lediglich eine Kopie des *Smn*-Gens, das auf Chromosom 13 lokalisiert ist. Es liegen keine Hinweise für ein alternatives Spleißen des murinen *Smn*-Gens vor. Die kodierende Nukleinsäuresequenz des murinen *Smn*-Gens bzw. die Aminosäuresequenz des murinen Smn-Proteins ist mit den humanen Entsprechungen zu 81% bzw. 82% identisch (DiDonato et al., 1997b; Viollet et al., 1997). Die homozygote Ausschaltung der beiden *Smn*-Allele (*Smn*^{-/-}) bei der Maus verläuft bereits im frühen Blastozysten-Stadium durch massive apoptotische Zelluntergänge letal. Das Smn-Protein scheint also eine essentielle Funktion für die Vitalität der Zelle zu besitzen (Schrank et al., 1997).

Sechs Monate alte Mäuse mit einer heterozygoten Inaktivierung des *Smn*-Gens (*Smn*^{+/-}) zeigen eine ungefähr 46%ige Reduktion der Smn-Protein-Menge im Rückenmark. Die Zahl der Gems ist nicht vermindert. Die Anzahl der Motoneurone im Rückenmark ist um 40% reduziert, bei ein Jahr alten Mäusen sogar um > 50%. Die Krankheitsentwicklung ähnelt der menschlichen SMA Typ III (Jablonka et al., 2000a).

Um der genetischen Situation des Menschen möglichst nahe zu kommen, wurde ein Mausmodell generiert, bei dem das endogene *Smn*-Gen homozygot ausgeschaltet ist und das humane *SMN2*-Gen (in zwei bzw. acht Kopien) überexprimiert wird (*Smn*^{-/-};*SMN2*). Die genetische Situation dieses Mausmodells ausgehend von der Situation bei Patienten mit SMA ist in Abbildung 5 dargestellt.

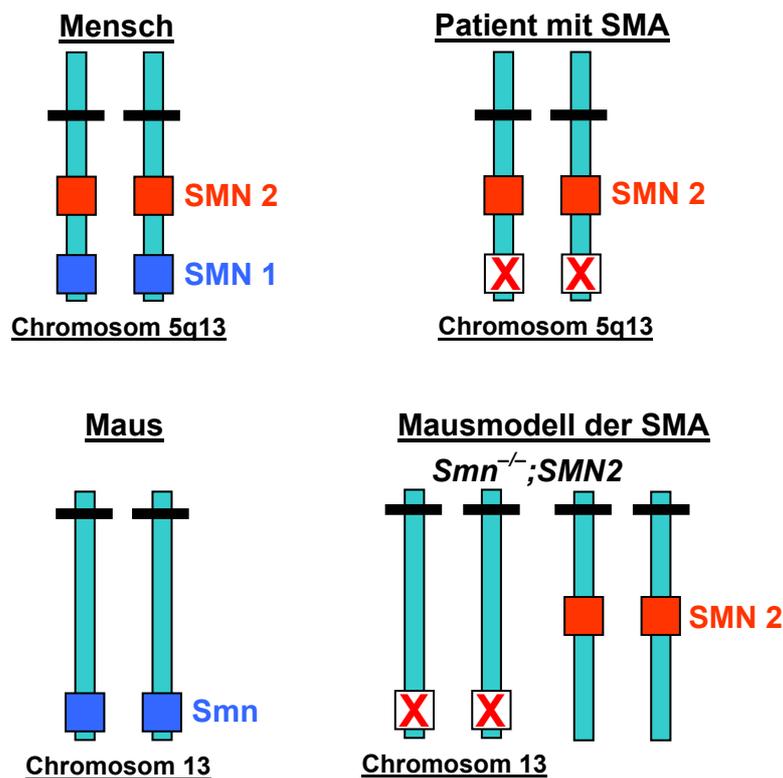


Abbildung 5. Obere Reihe: Chromosomale Situation bei gesunden Menschen und bei Patienten mit SMA. Dem ist in der unteren Reihe die Struktur bei Wildtyp-Mäusen und die Struktur des im Text beschriebenen *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mausmodells gegenübergestellt.

In Abhängigkeit von der Kopienzahl des *SMN2*-Gens entwickeln sich zwei unterschiedliche Phänotypen. Bei Mäusen, die nur zwei *SMN2*-Kopien besitzen („low copy“), ist die Gesamtmenge an *Smn*-Protein drastisch reduziert. Klinisch zeigen sie bereits kurz nach der Geburt verminderte Bewegungen und eine Atrophie der Interkostalmuskulatur. Sie saugen weniger, haben ein geringeres Körpergewicht und sterben innerhalb weniger Tage. Am ersten Tag nach der Geburt beträgt der Motoneuronverlust im Rückenmark lediglich 18%. Erst am Tag 5 sind 35% der Zellen zugrunde gegangen. Histologisch besitzen die Motoneurone fast keine Gems, was den Befunden bei Patienten mit SMA Typ I ähnelt. Mäuse mit acht *SMN2*-Kopien („high copy“) haben normale Mengen an *Smn*-Protein, eine unveränderte Anzahl an Gems und zeigen keine

klinischen Auffälligkeiten (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000a). Dies bestätigt die Korrelation zwischen der *SMN2*-Kopienzahl, der Gesamtmenge an Smn-Protein und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (Gendosis-Effekt).

Eine französische Arbeitsgruppe schaltete durch konditionalen Knockout mittels des Cre-LoxP-Systems das Exon 7 des *Smn*-Gens in einzelnen Geweben aus. In allen anderen Geweben bleiben beide Allele des *Smn*-Gens erhalten. Die Expression von Cre unter Kontrolle des NSE-Promotors (NSE: Neuron-spezifische Enolase) führt im Tiermodell zur homozygoten Deletion von Exon 7 des *Smn*-Gens in Neuronen. Die Tiere zeigen motorische Defekte und eine reduzierte Lebenserwartung. Die Zahl der Motoneurone ist deutlich verringert und in den Wachstumskegeln finden sich Neurofilament-Anreicherungen. Die Gems fehlen vollständig, außerdem erscheint die korrekte CB-Bildung gestört. Die Muskelfasern sind histologisch denerviert und atrophisch. Die Funktion der Motoneurone ist also durch eine Verminderung der Smn-Menge beeinträchtigt (Frugier et al., 2000; Cifuentes-Diaz et al., 2002; Übersichtsartikel: Monani et al., 2000b).

Neben Mäusen eignen sich auch andere, gut charakterisierte Tiere als Modell für die SMA. Bei Zebrafischen ist die Entwicklung des Nervensystems sehr gut bekannt. Sie besitzen wie Mäuse nur eine Kopie des *smn*-Gens, das in allen Zelltypen exprimiert wird. Die Motoneurone mit reduzierten *smn*-Mengen zeigen eine Verminderung der Axonlänge und eine Vermehrung der axonalen Verzweigungen, aber keine Zunahme apoptotischer Zellen. Die Veränderungen sind motoneuronspezifisch; sensorische Neurone oder Interneurone sind nicht beeinträchtigt. Auch Muskelgewebe, Synapsen und motorische Endplatten entwickeln sich unauffällig. Die Beobachtungen am Zebrafisch lassen eine Funktion von *smn* für das Auswachsen der Axone während der Motoneuron-Entwicklung vermuten (McWhorter et al., 2003).

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besitzt ebenfalls ein orthologes SMN-Protein, DmSMN (Miguel-Aliaga et al., 2000). Homozygoter Knockout des *DmSMN*-Gens führt durch Bereitstellung maternalen mRNA-Transkripts zum Überleben bis ins späte Larvenstadium. Phänotypisch zeigen die Larven verminderte und unkoordinierte Bewegungen. Histologisch finden sich Strukturstörungen an den neuromuskulären Endplatten (Chan et al., 2003).

1.2 Molekularbiologische Grundlagen

1.2.1 Axonaler Transport der β -Aktin-mRNA

Nervenzellen besitzen als morphologische Besonderheit sehr lange zelluläre Fortsätze. In diesen müssen weit entfernt vom Zellkern Wachstum, Stoffwechsel und Funktionen gewährleistet werden. Die Translation verschiedener mRNAs findet nicht nur in der Nähe des Zellkerns, sondern auch in diesen Zellfortsätzen statt (Crino und Eberwine, 1996; Mohr und Richter, 2001). Eine wichtige Komponente für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Struktur einer Zelle ist das Zytoskelett. Aktin ist ein ubiquitärer Bestandteil mit verschiedenen Isoformen, die in Geweben und innerhalb einer Zelle unterschiedlich verteilt sind: α -, β - und γ -Aktin. Während die α -Aktin- und γ -Aktin-mRNAs hauptsächlich perinukleär verteilt sind, findet sich für β -Aktin-mRNA neben der perinukleären eine starke Anreicherung in den Fortsätzen und Wachstumskegeln der Zellen. Eine ähnliche Verteilung wird für die entsprechenden Proteine gefunden (Hill und Gunning, 1993; Kislauskis et al., 1993; Hill et al., 1994; Kislauskis et al., 1997; Bassell et al., 1998). Die Anreicherung der β -Aktin-mRNA in peripheren Zellfortsätzen weist auf einen spezifischen Transport und eine dort lokal stattfindende Proteinbiosynthese hin (Bassell et al., 1994b; Hill et al., 1994). Für den Transport der β -Aktin-mRNA wird eine spezielle Sequenz, der sogenannte Zipcode, benötigt. Dieser umfasst 54 Nukleotide (nucleotides, nt) und ist in der 3' untranslatierten Region (untranslated region, UTR) der β -Aktin-mRNA lokalisiert (Kislauskis et al., 1993; Kislauskis et al., 1994).

An den Zipcode binden Transportproteine, die für die Lokalisation der β -Aktin-mRNA in den Neuriten ebenfalls notwendig sind. Als erster Bindungspartner wurde das Zipcode-bindende Protein 1 (zipcode binding protein 1, ZBP-1) identifiziert (Ross et al., 1997; Zhang et al., 2001; Eom et al., 2003). ZBP-1 wandert entlang von Dendriten und Axonen (Tiruchinapalli et al., 2003) und erhöht die Filopodien-Dichte in der hippocampalen Zellkultur (Eom et al., 2003). β -Aktin-mRNA und ZBP-1 sind innerhalb der Nervenzellfortsätze in kleinen Anreicherungen lokalisiert; diese enthalten weitere Komponenten für den Translationsprozess (Knowles et al., 1996; Tiruchinapalli et al., 2003). ZBP-1 könnte als „Adapter“ zwischen mRNA und Zytoskelettstruktur dienen (Bassell und Kelic, 2004) oder aber auch die vorzeitige Translation der mRNA verhindern (Hüttelmaier et al., 2005). Als weiterer Bindungspartner für den Zipcode der β -Aktin-

mRNA wurde das Zipcode-bindende Protein 2 (zipcode binding protein 2, ZBP-2) identifiziert. Es weist zahlreiche Homologien zu ZBP-1 auf, ist nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert und scheint ebenfalls eine Aufgabe für die Lokalisierung der β -Aktin-mRNA wahrzunehmen (Gu et al., 2002). Weitere Zipcode-bindende Proteine beeinflussen Transport und Funktion (Snee et al., 2002).

Der mRNA-Transport läuft entlang des bereits bestehenden Zytoskeletts ab. In Neuronen scheint er Mikrotubuli-abhängig zu sein (Bassell et al., 1994a; Knowles et al., 1996; Bassell et al., 1998; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2001), in Fibroblasten dagegen Mikrofilament-abhängig (Sundell und Singer, 1991; Übersichtsartikel: Bassell et al., 1999). Auch neurotrophe Faktoren können die Aktivität des mRNA-Transportes und/oder der mRNA-Translation regulieren. Die Applikation von NT-3 (neurotrophin-3) führt zu einem raschen Anstieg der Anzahl an RNA-anreichernden Strukturen in Neuriten (Knowles und Kosik, 1997), dabei auch zur Lokalisation von β -Aktin-mRNA und -Protein in die Wachstumskegel (Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2001).

Die Funktionen von β -Aktin in Nervenzellfortsätzen sind vielfältig. Es ist am Auswachsen der Axone und Wachstumskegel beteiligt (Zhang et al., 2001). Außerdem kann es als Leitstruktur, für Wachstum, Bildung und Aufrechterhaltung von Synapsen und für synaptische Übertragungsmodulation verantwortlich sein (Doussau und Augustine, 2000; Morales et al., 2000; Zhang und Benson, 2001; Shupliakov et al., 2002; Luo, 2002; Bloom et al., 2003; Sankaranarayanan et al., 2003; Chen et al., 2004).

1.2.2 Das somatoviszzerale sensorische System

Die motorischen Neurone leiten Informationen vom ZNS in die Peripherie zum Muskel und ermöglichen somit Bewegungen. Dagegen nehmen die sensorischen Neurone Informationen von Nervenendigungen oder Sinneszellen in der Peripherie auf und leiten diese in das ZNS weiter, wo die Erregung als Empfindung wahrgenommen werden kann. Die klassischen Sinnesmodalitäten umfassen das Sehen, das Gehör, das Riechen, den Geschmack und das Gefühl (somatoviszzerales sensorisches System) (Schmidt et al., 2000). Für die verschiedenen Qualitäten des somatoviszzeralen sensorischen Systems existieren Subpopulationen von Neuronen, die durch unterschiedliche neurotrophe Faktoren stimuliert werden. Deren Wirkung wird jeweils hauptsächlich über einen bestimmten Rezeptortyp vermittelt. Bereits am Tag 15 der embryonalen Entwicklung kann

man bei sensorischen Nervenzellen der Hinterwurzelganglien (dorsal root ganglia, DRGs) eine Aufteilung der Rezeptortypen erkennen. Diese kann sich im Laufe der Entwicklung verändern, findet sich aber auch bei erwachsenen Mäusen (Mu et al., 1993; Baudet et al., 2000; Josephson et al., 2001; Agerman et al., 2003; Kashiba et al., 2003). Neurotrophe Faktoren werden von den Zielgeweben (z. B. Haut oder Muskel) der Neurone sezerniert, rezeptorvermittelt in die Synapse aufgenommen und können dann spezifisch retrograd in den Zellkörper transportiert werden (Matheson et al., 1997). Die Zugabe der neurotrophen Faktoren bewirkt in den sensorischen Nervenzellen der Hinterwurzelganglien eine erhöhte Überlebensrate und ein vermehrtes Auswachsen der Neuriten (Matheson et al., 1997; Gavazzi et al., 1999). Neben dieser klassischen Wirkungsweise können die neurotrophen Faktoren auch weitere Funktionen für das Überleben der Neurone, die Regulation der Schwann-Zell-Aktivität und die Signalweiterleitung von Neuronen an deren Zielgewebe erfüllen (Schecterson und Bothwell, 1992).

NGF (nerve growth factor) entfaltet seine Wirkung über den Trk-A-Rezeptor (Tyrosinkinase-A-Rezeptor). Er stimuliert vor allem kleinere, unmyelinisierte oder gering myelinisierte Neurone, die den größten Anteil an Hinterwurzelganglien-Zellen einnehmen. Sie sind für Nozizeption und Temperaturempfindung verantwortlich (Lewin et al., 1992; Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994). BDNF bindet an den Trk-B-Rezeptor. Die dazugehörigen Neurone sind von mittlerer Größe und Myelinisierung und vermitteln langsam adaptierende Mechanozeption (Ernfors et al., 1994; Carroll et al., 1998). NT-3 und sein Rezeptor Trk-C wirken an großen, stark myelinisierten Neuronen. Diese übertragen die propriozeptive Wahrnehmung (Farinas et al., 1994; Wright et al., 1997). Die Wirkungen von GDNF lassen sich nicht so gut eingrenzen, GDNF scheint auf verschiedene Subpopulationen der Hinterwurzelganglien und über verschiedene Rezeptortypen zu wirken (Mu et al., 1993; Buj-Bello et al., 1995; Snider und Wright, 1996; Matheson et al., 1997).

2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Bislang konnte nicht geklärt werden, warum der ubiquitäre SMN-Verlust hauptsächlich zu einer Motoneurondegeneration führt. Die bisherigen Forschungen ergaben zahlreiche Bindungspartner des SMN-Proteins und die Involvierung in vielfältige zelluläre Funktionen. Einige davon sind für alle Gewebetypen essentiell (Übersichtsartikel: Jablonka et al., 2000b; Briese et al., 2005; Monani, 2005; Eggert et al., 2006). Im Kontrast dazu stehen die Beobachtungen an Patienten mit SMA (Munsat und Davies, 1992; Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2002) und auch an Tiermodellen (Jablonka et al., 2000a; Monani et al., 2000a; Hsieh-Li et al., 2000; Frugier et al., 2000; Cifuentes-Diaz et al., 2002; McWhorter et al., 2003; Chan et al., 2003; Übersichtsartikel: Monani et al., 2000b), die auf einen motoneuronspezifischen Pathomechanismus hindeuten. Neue Ansätze zur Klärung der Pathophysiologie der SMA sollten also die besondere Situation in Nervenzellen erhellen.

Um den bei SMA-Patienten vorherrschenden Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche an primär kultivierten Motoneuronen des Rückenmarks bzw. sensorischen Neuronen der Hinterwurzelganglien von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen durchgeführt, einem Modell der SMA Typ I (Monani et al., 2000a; siehe Abschnitt 1.1.5). Folgende Fragestellungen sollten näher untersucht werden:

1. Die Überlebensraten der *Smn*-defizienten Motoneurone sollten bestimmt und die Zellen morphologisch charakterisiert werden. Hierzu sollten die Längen der Nervenzellfortsätze vermessen sowie das Aussehen besonders des präsynaptischen Bereiches genauer untersucht werden.
2. Die neu identifizierten SMN-Bindungsproteine hnRNP R und Q weisen auf eine Verbindung von SMN zum mRNA-Metabolismus hin (Mourelatos et al., 2001; Rossoll et al., 2002). Weiterhin gibt es zunehmende Erkenntnisse über die Bedeutung des mRNA-Transportes für die polare Differenzierung und Entwicklung einer Zelle (Crino und Eberwine, 1996; Mohr und Richter, 2001). Um einer Beteiligung derartiger Prozesse bei der SMA-Erkrankung nachzugehen, sollte die Verteilung von hnRNP R und mehrerer Zytoskelett-Proteine innerhalb der Motoneurone untersucht werden.
3. Die SMA ist eine Erkrankung, die fast ausschließlich die Motoneurone betrifft. Dennoch findet man bei Patienten mit der schwersten Form der SMA Typ I auch diskrete sensible Defizite und neurophysiologische Auffälligkeiten sensorischer

Nerven (Omran et al., 1998; Rudnik-Schöneborn et al., 2003; Anagnostou et al., 2005). Um mögliche Veränderungen im sensorischen System zu detektieren, wurden Zellkulturen der sensorischen Neurone der Hinterwurzelganglien angelegt. Es sollten – parallel zum Vorgehen bei den Motoneuronen – das Längenwachstum und die Morphologie der sensorischen Nervenzellen des *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausmodells genauer charakterisiert werden.

Diese detaillierten Untersuchungen an primär kultivierten *Smn*-defizienten Motoneuronen und sensorischen Nervenzellen sollten Hinweise auf den für die Erkrankung verantwortlichen Pathomechanismus geben und damit einen Beitrag zum Verständnis der Krankheit und der Entwicklung von Behandlungsstrategien liefern.

3 Material

3.1 Technische Geräte

Elektrophorese-Kammer	PeqLab
Inkubator	NUAIRE US Autoflow CO ₂ Water-Jacketed
Konfokales Mikroskop	Leica TCS 4D
Lichtmikroskop	Leica DM IRB
Neubauer Zählkammer	Zeiss
PCR-Cycler	Eppendorf Mastercycler
Photometer	Eppendorf BioPhotometer
Schüttler	Eppendorf Thermomixer comfort
UV-Transilluminator	INTAS Classic-Box
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R

3.2 Mauslinie *Smn*^{-/-}; *SMN2*

Smn^{-/-} als Hintergrund/ humanes *SMN2* („low copy“) Monani et al., 2000a

3.3 Medien, Puffer, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

Zum Einstellen von pH-Werten wurde NaOH bzw. HCl verwendet.

3.3.1 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

Aceton	J. T. Baker
Agarose	Invitrogen
B27 Supplement	Gibco
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Chloroform	J. T. Baker
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
F14-Medium	Gibco
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Gibco

Horse Serum (hitzeinaktiviertes Pferdeserum)	Linaris
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Laminin-111, gereinigt aus EHS-Tumorgewebe (0.7 mg/ml)	Rupert Timpl, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax)	Gibco
Mowiol	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Neurobasal (NB)	Gibco
p75-Antikörper (2.4 mg/ml)	Abcam
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Linaris
Poly-DL-Ornithin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roche
Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck
Trypsin	Worthington
Trypsin-Inhibitor	Linaris
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich

3.3.2 Medien

Motoneuronen-Medium Neurobasal-Medium, 10% Horse Serum,
2% B27 Supplement, 500 μ M Glutamax

3.3.3 Puffer

Borat-Puffer	0.15 M Borsäure, aqua bidest., pH 8.3, Autoklavieren
Lysis-Puffer	10 mM TRIS pH 7.5, 100 mM EDTA, 0.5% SDS
50·TAE	242 g (2 mol) TRIS, 60 g (1 mol) Essigsäure, 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0
1·TAE	0.04 M TRIS·CH ₃ COOH, 0.01 M EDTA, pH 8.0

1·TBS-T	TRIS-buffered Saline mit Tween; 20 mM TRIS·HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20
1·TE	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.5
TRIS-Puffer	10 mM, pH 9.5

3.3.4 Lösungen

Depolarisationslösung	30 mM KCl, 137 mM NaCl, aqua dest.
EDTA-Lösung	0.5 M EDTA, aqua dest., pH 8.0
4% PFA-Lösung	40 g PFA, 500 ml aqua dest., 1 NaOH-Plättchen; auf 60 °C erwärmen, pH auf 7.4 einstellen, 410 ml Na ₂ HPO ₄ (0.2 M) und 90 ml NaH ₂ PO ₄ (0.2 M) zugeben

3.3.5 Zusätze

Laminin-111	Verdünnung 1 : 250 mit HBSS, EK = 2.5 µg/ml
Mowiol-Präparat	10 g Mowiol, 40 ml PBS (pH 8.0), 20 ml wasserfreies Glycerin; 24 Stunden bei 60 °C rühren
100·PORN	500 mg Poly-DL-Ornithin Hydrobromid, 10 ml Borat-Puffer (0.15 M, pH 8.35)
1·PORN	500 µl 100·PORN, 50 ml Borat-Puffer
1%iges Trypsin	0.25 g Trypsin-Pulver, 25 ml HBSS

Tabelle 2. Wachstumsfaktoren für die Zellkultur.

Neurotropher Faktor	Endkonzentration	Bezugsquelle
BDNF	1 ng/ml	Chemicon
CNTF	1 ng/ml	M. Sendtner, Institut für Klinische Neurobiologie, Würzburg, Deutschland
GDNF	1 ng/ml	Chemicon
NGF	1 ng/ml	Peptotech
NT-3	1 ng/ml	Sigma-Aldrich

3.4 Antikörper

Tabelle 3. Primärantikörper für die Immunzytochemie.

Primärantikörper	Verdünnung	Typ, Herkunft	Bezugsquelle
actin	1 : 200	monoklonal, Maus	Boehringer Mannheim / Roche
β-actin	1 : 1000	monoklonal, Maus	Abcam
hnRNP R	1 : 500	polyklonal, Kaninchen	Rossoll et al., 2002
MAP-2	1 : 1000	monoklonal, Maus	Chemicon
phospho-tau	1 : 1000	polyklonal, Kaninchen	Sigma-Aldrich

Tabelle 4. Sekundärantikörper für die Immunzytochemie.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Typ	Bezugsquelle
Cy-2	1 : 200	monoklonal, anti-Maus	Dianova
Cy-2	1 : 200	polyklonal, anti-Kaninchen	Dianova
Cy-3	1 : 300	monoklonal, anti-Maus	Dianova
Cy-3	1 : 300	polyklonal, anti-Kaninchen	Dianova

Alle sekundären Antikörper wurden in Ziegen hergestellt.

3.5 Reagenzien für die PCR und Gelelektrophorese

Betain 5 M	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
dATP, dTTP, dCTP, dGTP (dNTPs)	MBI Fermentas
Glycerin	Merck
Primer SMN (GMS11, MSMN11, GNA3ab)	Invitrogen
Primer SMN2 (541C960-f, 541c1120-r)	MWG-Biotech AG
10-Puffer	Biotherm
Taq-Polymerase	Biotherm
Xylencyanol	Sigma-Aldrich
6-Ladepuffer	30% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol in 1·TAE

Oligonukleotidsequenzen für die *Smn*-PCR

GMS11 5'-GGC CTG GAA TTC AAT ATG CTA GAC TGG CC-3'

MSMN11 5'-GTT TCA AGG GAG TTG TGG CAT TCT TC-3'

GNA3ab 5'-CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA CG-3'

Oligonukleotidsequenzen für die *SMN2*-PCR

541C960-f 5'-GTA ATA ACC AAA TGC AAT GTG AA-3'

541c1120-r 5'-CTA CAA CAC CCT TCT CAC AG-3'

Molekulargewichtstandards für doppelsträngige DNA

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder MBI Fermentas

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus MBI Fermentas

bp: base pairs

4 Methoden

4.1 Präparation des Rückenmarks und der Hinterwurzelganglien (DRGs)

Der Tag nach der Paarung (Vaginalpfropf) wurde als Tag 1 der Embryonalentwicklung gezählt. Am 14. Tag (E14) wurden die trächtigen Mäuse mit Äther narkotisiert, mittels Genickbruch getötet und die beiden Hörner der Gebärmutter am Stück entnommen. Die Embryonen wurden einzeln aus den Fruchthäuten präpariert, Kopf und Schwanz wurden abgetrennt und der Kopf zur Genotypisierung in 500 µl Lysispuffer überführt. Das lumbale Rückenmark wurde mit zwei Pinzetten am Stück präpariert und von der Dura mater befreit. Weiterhin wurden die seitlich am Rückenmark anhängenden Hinterwurzelganglien isoliert. Das präparierte Rückenmark und die sensorischen Ganglien wurden in separate Eppendorf-Röhrchen in 180 µl HBSS bzw. 100 µl 1-PBS überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

4.2 Motoneuronzellkultur

Die primären Motoneurone wurden aus dem lumbalen Rückenmark 14 Tage alter Mausembryonen (E14) gewonnen. Der feste Gewebeverband des Rückenmarks wurde durch eine 15-minütige Behandlung mit 20 µl 1%igem Trypsin bei 37 °C angedaut. Das Rückenmark wurde entnommen, erneut in 180 µl HBSS suspendiert und die Trypsin-Reaktion mittels 20 µl 0.1%igem Trypsin-Inhibitor gestoppt. Durch vorsichtiges Triturieren erhielt man eine Einzelzell-Suspension, der im Anschluss 800 µl Neurobasal-Medium zugegeben wurde. Als Panning-Platten wurden 24-well-Platten (Nunclon™ Surface) vorbereitet, indem sie mit einer Lösung von monoklonalem p75-Antikörper (Endkonzentration 10 ng/ml) in 5 ml TRIS-Puffer (10 mM, pH 9.5) für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Zur Entfernung des nichtgebundenen Antikörpers wurden die Platten anschließend drei Mal mit Neurobasal-Medium gewaschen. Der p75-Antikörper bindet selektiv Zellen, die den niederaffinen Neurotrophin-Rezeptor p75 exprimieren; dies sind im Wesentlichen die α -Motoneurone in den Vorderhörnern des Rückenmarks. Auf die so vorbereiteten Panning-Platten wurde nun die Zellsuspension aufgebracht und 30–60 Minuten erschütterungsfrei bei Raumtemperatur inkubiert. Die nichtgebundenen Anteile der Zellsuspension wurden

mittels dreimaligem Waschen mit Neurobasal-Medium entfernt. Die p75-Motoneuron-Bindung wurde daraufhin durch Zugabe von 500 µl Depolarisationslösung gelöst und die Motoneurone in 500 µl auf 37 °C vorgewärmtem Motoneuronen-Medium suspendiert. Die Zellen wurden bei 400 × g fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 200 µl abgenommen. Die Zellzahl/ml wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die Zellen mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm² auf vorbereitete 6-well-Platten (Greiner) ausplattiert. Als Nährmedium wurde Motoneuronen-Medium (2 ml) verwendet, das mit CNTF und BDNF jeweils in einer Endkonzentration von 1 ng/ml angereichert wurde. Eine Motoneuron-Zellkultur wurde fünf Tage lang bei 37 °C und 5% CO₂ angelegt und jeden Tag 50% des Nährmediums ausgewechselt.

Die verwendeten 6-well-Platten wurden folgendermaßen vorbereitet: Runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 22 mm wurden mit 70% Ethanol abgeflammt, jeweils eines in eine 6-well-Vertiefung gelegt, mit 2 ml 1-PORN überschichtet und entweder über Nacht im Kühlschrank oder für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 1-PORN wurde durch dreimaliges Waschen mit HBSS entfernt und die wells mit 1 ml Laminin-111 überschichtet. Das überschüssige, nicht gebundene Laminin-111 wurde vor dem Aufbringen der Zellen abgesaugt.

4.3 Zellkultur der sensorischen Neurone aus den Hinterwurzelganglien (DRGs)

Die isolierten Hinterwurzelganglien waren in 100 µl 1-PBS überführt und wurden mit Trypsin in einer Endkonzentration von 0.05% 35 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Andauung wurde durch Zugabe von 500 µl F14-Medium mit 10% Horse Serum und 35 mM KCl gestoppt. Der Zellverband wurde durch vorsichtiges Triturieren gelöst und die Zellsuspension 3–4 Stunden bei 37 °C ausplattiert. Anschließend wurde der Überstand zentrifugiert (10 Minuten bei 400 × g). Der Überstand wurde abgenommen, und die am Boden gesammelten Zellen wurden erneut in 500 µl F14-Medium mit 10% Horse Serum und 35 mM KCl suspendiert. Die Zellzahl/ml wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die Zellen in einer Dichte von 2000 Zellen/cm² auf vorbereitete Schalen ausplattiert. Die Vorbehandlung der 6-well-Platten entsprach derjenigen bei der Motoneuronzellkultur. Als Nährmedium wurde F14-Medium (2 ml) verwendet, dem jeweils einzeln ein neurotropher Faktor BDNF, GDNF, NGF oder NT-3 in einer

Endkonzentration von 1 ng/ml zugefügt wurde. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

4.4 Bestimmung der Überlebensraten

Die erste Bestimmung der Anzahl der an den Zellkulturboden attachierten Zellen wurde frühestens vier Stunden nach Ausplattierung durchgeführt, wenn sich die meisten überlebenden Zellen an den Boden angeheftet hatten. Jeden Tag wurde die Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt, indem jeweils pro Vertiefung zehn Felder mit einer Größe von je 1.16 mm²/Feld ausgezählt wurden.

Die Werte der einzelnen Kulturen (Prozent überlebender Motoneurone zur Anzahl ursprünglich attachierter Motoneurone in jeder einzelnen Vertiefung) wurden zusammengenommen und die Ergebnisse als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

4.5 Immunozytochemie der Moto- und sensorischen Neurone

Die Motoneurone wurden nach fünftägiger, die sensorischen Neurone nach 24-stündiger Zellkultur mit 4% PFA-Lösung fixiert und konnten so bei 4 °C gelagert werden.

Für die immunzytochemische Färbung wurden die Glasplättchen durch dreimaliges Waschen mit 1·TBS-T rehydriert und fünf Minuten mit 2 ml –20 °C kaltem 100% Aceton behandelt. Anschließend wurden die Plättchen drei Mal mit 1·TBS-T gewaschen und unspezifische Bindungen 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 ml 10% BSA (in 1·TBS-T) blockiert. Der Primärantikörper wurde in den in Abschnitt 3.4 angegebenen Verdünnungen in 1 ml 1·TBS-T mit 1% BSA gelöst. Nach Absaugen der Lösung zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Glasplättchen mit der Lösung des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 1·TBS-T entfernt und ein erneutes Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 2 ml 10% BSA (in 1·TBS-T) 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Der fluoreszierende Sekundärantikörper wurde in den in Abschnitt 3.4 angegebenen Verdünnungen in 1 ml 1·TBS-T mit 1% BSA gelöst. Die Inkubation mit der Sekundärantikörper-Lösung wurde jeweils 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtabschluss durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit 1·TBS-T wurden die Glasplättchen in Mowiol-Präparat eingebettet. Die fertigen Plättchen wurden unter

Lichtabschluss bei 4 °C gelagert. Die Immunfluoreszenz wurde mit einem Konfokalen Mikroskop der Firma Leica sichtbar gemacht, wobei jeweils identische Einstellungen für Pinhole (Blende) und Voltage (Laserstärke) für zusammengehörende Experimente verwendet wurden.

4.6 Datenanalyse

Für die Quantifizierung der Neuritenlängen der Motoneurone wurden nur solche Neurone ausgewählt, die eine klare Unterscheidung zwischen Axonen und Dendriten zuließen. Axone wurden als phospho-tau-positive Fortsätze identifiziert, die mindestens zweimal länger waren als phospho-tau-negative und MAP-2-positive Dendriten. Es wurde sowohl der längste axonale Zweig als auch die Gesamtlänge aller axonalen Verzweigungen ausgemessen. Für die Quantifizierung der Neuritenlängen der sensorischen Neurone wurden die phospho-tau positiven Fortsätze ausgewählt. Für die Bestimmung der Größe der Wachstumskegel wurden bei Motoneuronen und sensorischen Neuronen β -Aktin-positive Wachstumskegel untersucht. Die Bilder, die mit dem Konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden, wurden mit Scion Image software package (Scion Corporation, National Institute of Health) ausgewertet. Die Daten wurden mit Hilfe des t-Tests analysiert.

4.7 DNA-Aufreinigung

Als Material zur Genotypisierung wurden die Köpfe der Mausembryonen, die in 500 μ l Lysis-Puffer gelegt wurden, verwendet. Zur Verdauung der Proteine und Freilegung der DNA wurde 30 μ l Proteinase K zugegeben und der Ansatz 3–4 Stunden bei 60 °C in den Schüttler (bei circa 750 $U \times \text{min}^{-1}$) gestellt. Anschließend wurde 1 ml 100% Ethanol zur Ausfällung der DNA zugegeben und der Überstand abgenommen. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Proben mit 1 ml 70% Ethanol für 4 Minuten bei 13,000–14,000 $U \times \text{min}^{-1}$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und die DNA in 500 μ l H_2O gelöst (37 °C, Schüttler, circa 30 Minuten). Nach Zugabe von 500 μ l Chloroform wurde erneut zentrifugiert (10 Minuten) und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 1 ml 100% Ethanol und 50 μ l 3 M Natriumacetat pH 4.9 wurden die Schritte Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wiederholt. Das Sediment wurde in 1 ml 70% Ethanol suspendiert, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das gereinigte

DNA-Sediment wurde nach der Trocknung in 1·TE mindestens 30 Minuten bei 37 °C im Schüttler oder über Nacht im Kühlschrank gelöst.

Die erreichte DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und auf eine Endkonzentration von 80–100 ng/μl mit 1·TE verdünnt.

4.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können DNA-Abschnitte mit bereits bekannter Sequenz amplifiziert werden. In einem Reaktionszyklus wird zunächst der DNA-Doppelstrang durch Erhöhen der Temperatur auf etwa 90 °C denaturiert. Bei 50 °C können sich die Primer, die jeweils komplementär zur Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge sind, anlagern. Bei Temperaturen von 60–70 °C synthetisiert eine hitzebeständige DNA-Polymerase die Komplementärstränge an die jeweiligen DNA-Einzelstränge. Die erhöhte Temperatur ist notwendig, um unspezifische Hybridisierungen zu verhindern. Ein solcher Reaktionszyklus kann nun mehrfach wiederholt werden und ergibt eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA.

Um den Genotyp der Mäuse bestimmen zu können, wurde eine PCR des *Smn*-Gens durchgeführt. Der *Smn*-PCR-Ansatz von 50 μl enthielt folgende Komponenten und wurde ständig auf Eis gekühlt:

2 μl	DNA
1 μl	dNTPs (10 mM)
1 μl	Primer 1 (GMS 11, Intron 1) (10 pmol/μl)
1 μl	Primer 2 (MSMN 11, Exon 2) (10 pmol/μl)
1 μl	Primer 3 (GNA 3ab, LacZ-Kassette) (10 pmol/μl)
5 μl	10·Puffer
10 μl	Betain (5 M)
0.5 μl	Taq Polymerase
Ad 50 μl	H ₂ O

Der gesamte Ansatz wurde kurz im Vortex geschüttelt. Für die *Smn*-PCR wurden die folgenden Bedingungen gewählt: 1 Zyklus, 94 °C/3 min; 35 Zyklen, bestehend aus (i) 94 °C/0.5 min, (ii) 56 °C/0.5 min, (iii) 72 °C/1.5 min; 1 Zyklus, 72 °C/5 min.

Zur Detektion, ob die Mäuse tatsächlich transgen für das humane *SMN2*-Gen sind, wurde der folgende *SMN2*-PCR-Ansatz verwendet:

2 µl	DNA
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer 1 (541C960-f) (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (541c1120-r) (10 pmol/µl)
5 µl	10-Puffer
10 µl	Betain (5 M)
0.5 µl	Taq Polymerase
Ad 50 µl	H ₂ O

Für die *SMN2*-PCR wurden die folgenden Bedingungen gewählt: 1 Zyklus, 94 °C/3 min; 35 Zyklen, bestehend aus (i) 94 °C/0.5 min, (ii) 58 °C/0.5 min, (iii) 72 °C/0.75 min; 1 Zyklus, 72 °C/5 min.

4.9 Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese konnten DNA-Fragmente anhand ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Die Fragmentgröße des Wildtyp-*Smn*-Gens betrug 840 bp, die des mutierten *Smn*-Gens dagegen lediglich 540 bp. Das *SMN2*-Gen hatte eine Fragmentgröße von 200 bp.

Es wurde ein 1.5% Agarose-Gel gegossen und mit 5–7 µl Ethidiumbromid versetzt. Die Gelkammer wurde mit 1·TAE angefüllt. Die amplifizierten DNA-Ansätze wurden jeweils mit 10 µl 6-Ladepuffer versetzt und jeweils 20 µl des so erhaltenen Ansatzes in die Vertiefungen pipettiert. Als DNA-Marker wurde für die *Smn*-PCR der 100 bp plus Marker, für die *SMN2*-PCR der 100 bp Marker (jeweils 200 ng) verwendet. Die Gelelektrophorese lief bei circa 60 V Spannung und 130 mA Stromstärke ab. Durch Interkalation von Ethidiumbromid konnten die DNA-Fragmente mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Motoneurone

5.1.1 Bestimmung der Überlebensraten von kultivierten Motoneuronen

Zunächst wurde das Überleben von Wildtyp-Motoneuronen in der Zellkultur untersucht. Die aus dem lumbalen Rückenmark 14 Tage alter Mausembryonen isolierten Motoneurone wurden über fünf Tage in Zellkultur beobachtet. Embryonale Motoneurone benötigen für ihr Überleben neurotrophe Faktoren. Einem Teil der Kulturen wurden die neurotrophen Faktoren CNTF und BDNF in einer Endkonzentration von 1 ng/ml zugesetzt, der andere Teil der Kulturen wurde ohne diese Faktoren kultiviert. Die Anzahl der überlebenden Motoneurone wurde jeden Tag bestimmt. Motoneurone mit neurotrophen Faktoren zeigten eine deutlich höhere Überlebensrate als Motoneurone ohne neurotrophe Faktoren. Nach fünf Tagen in Kultur betrug das durchschnittliche Überleben mit neurotrophen Faktoren ($64.2 \pm 3.8\%$) im Vergleich zu ($35.3 \pm 9.4\%$) ohne diese Faktoren (Tabelle 5 und Abbildung 6).

Tabelle 5. Vergleich der Überlebensraten von Wildtyp-Motoneuronen in Anwesenheit der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF in einer Endkonzentration von 1 ng/ml und in deren Abwesenheit. Die Anzahl der überlebenden Zellen am Tag 1 wurde 100% gesetzt. An den folgenden Tagen wurde jeweils der Anteil der überlebenden Zellen relativ zur Anzahl der am Tag 1 überlebenden Zellen in Prozent (mit Angabe der Standardabweichung in Prozentpunkten) angegeben. Es wurden jeweils Kulturen von drei Embryonen ausgewertet.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Motoneurone in Anwesenheit neurotropher Faktoren	100 ± 0	95.8 ± 2.3	87.5 ± 9.9	76.0 ± 7.3	64.2 ± 3.8
Motoneurone in Abwesenheit neurotropher Faktoren	100 ± 0	91.0 ± 2.3	70.6 ± 6.3	51.7 ± 9.3	35.3 ± 9.4

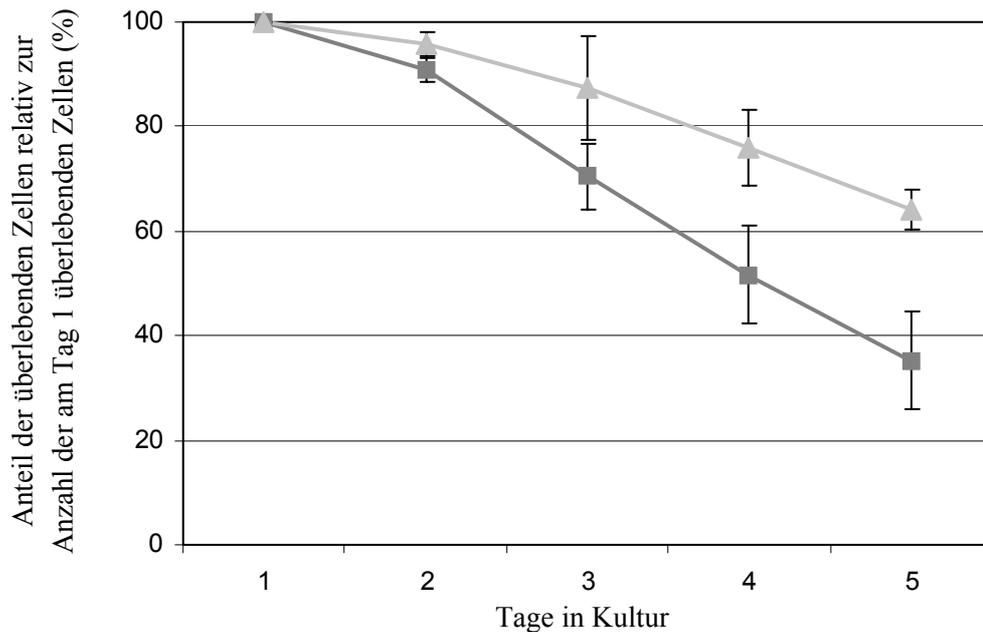


Abbildung 6. Graphische Darstellung der Überlebensraten von Wildtyp-Motoneuronen in Zellkultur in Abhängigkeit von neurotrophen Faktoren: Die hellgrauen Dreiecke repräsentieren den Durchschnittswert unter Zugabe der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF jeweils in einer Endkonzentration von 1 ng/ml. Die dunkelgrauen Vierecke stellen das Überleben in Abwesenheit neurotropher Faktoren dar. Die Messwerte wurden linear interpoliert. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung an.

Das in Abschnitt 1.1.5 beschriebene $Smn^{-/-};SMN2$ -Mausmodell mit niedriger $SMN2$ -Kopienzahl zeigt einen relativ geringen Motoneuronverlust im Vergleich zum Schweregrad des Krankheitsbildes. Um genauer zu analysieren, ob die Smn -Defizienz *per se* das Überleben von Motoneuronen beeinträchtigt, wurden Motoneuronzellkulturen von $Smn^{-/-};SMN2$ - und Kontrollzellen angelegt. Auch hier wurde jeden Tag die Anzahl der überlebenden Zellen ausgezählt. Die Überlebensraten von $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen und $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen zeigten zu keinem Zeitpunkt einen deutlichen Unterschied (am Tag 4 in Kultur $62.0 \pm 11.6\%$ vs. 57.1%) (Tabelle 6 und Abbildung 7).

Tabelle 6. Vergleich der Überlebensraten von $Smn^{+/+};SMN2$ - und $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen. Ausgezählt wurde jeden Tag die Anzahl der überlebenden Zellen. Die Anzahl der überlebenden Zellen am Tag 1 wurde 100% gesetzt und an den folgenden Tagen der Anteil der überlebenden im Verhältnis zu den am Tag 1 überlebenden Zellen in Prozent angegeben. Die Standardabweichung wurde in Prozentpunkten angegeben. Es wurden fünf Kontrollen und eine Mutante ausgewertet. Zu keinem Zeitpunkt zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Smn -defizienten und Kontrollmotoneuronen.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
$Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneurone	100 ± 0	86.7 ± 7.7	72.1 ± 8.8	62.0 ± 11.6	55.8 ± 7.5
$Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone	100	78.6	64.3	57.1	

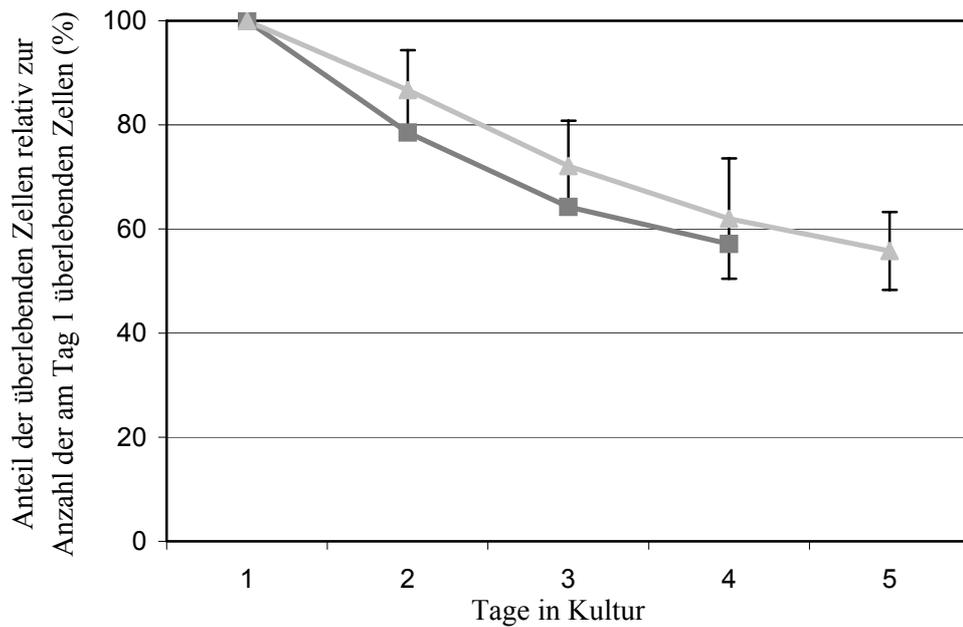


Abbildung 7. Graphische Darstellung der Überlebensraten der Motoneurone in Zellkultur unter Zugabe der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF jeweils in einer Endkonzentration von 1 ng/ml. Die hellgrauen Dreiecke repräsentieren den Durchschnittswert von fünf Kontrollmäusen. Die dunkelgrauen Vierecke stellen den Verlauf bei einer *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Maus dar. Die Messwerte wurden linear interpoliert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

5.1.2 Längenmessungen der Nervenzellfortsätze von Motoneuronen

Da das Überleben der *Smn*-defizienten im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen nicht gestört ist, könnte die primäre zelluläre Störung bei Motoneuronen im SMA-Tiermodell im Neuritenbereich liegen. Um die Morphologie und ganz speziell das Axon- wie das Dendritenwachstum der Motoneurone zu untersuchen, wurden *Smn*^{+/+}; *SMN2*- und *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone mit Antikörpern gegen MAP-2 (microtubule associated protein 2) und phospho-tau (phosphorylated tau protein) angefärbt. Während der MAP-2-Antikörper spezifisch die Dendriten anfärbt, die auf den Bildern in grün dargestellt sind, färbt der phospho-tau-Antikörper spezifisch die Axone, die in rot gezeigt werden. Die Abbildung 8 zeigt jeweils typische Beispiele für Morphologie und Neuritenlänge.

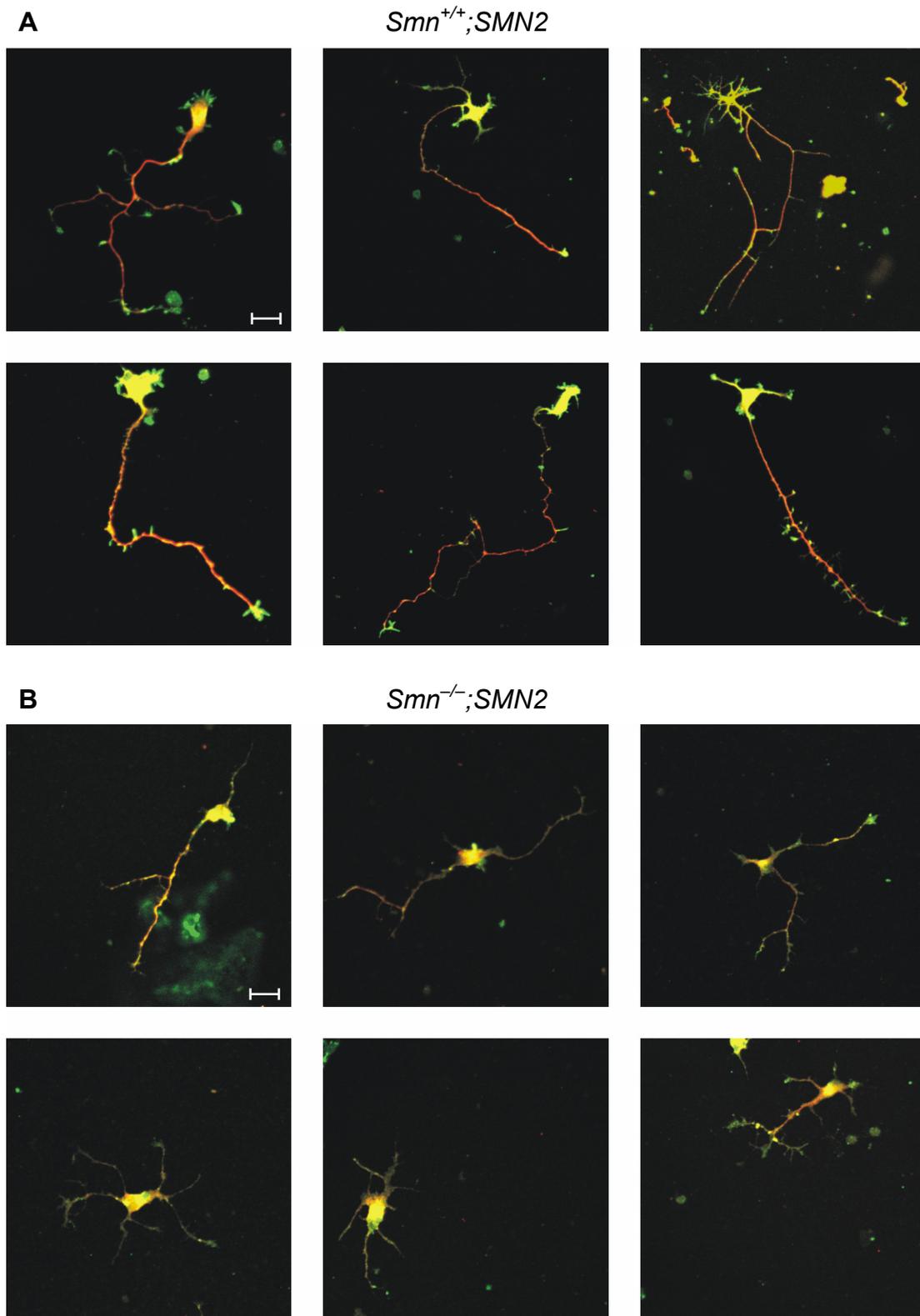


Abbildung 8. Immunfluoreszenzfärbung fixierter Motoneurone mit Antikörpern gegen das MAP-2 Protein (grüne Fortsätze) und gegen das axonspezifische phospho-tau-Protein (rote Fortsätze). Es sind jeweils typische Beispiele für *Smn^{+/+};SMN2*-Motoneurone (A) und für *Smn^{-/-};SMN2*-Motoneurone (B) gezeigt. Die Länge der Maßstab balken beträgt 20 μm .

Der längste axonale Ast war bei $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen gegenüber $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen signifikant verkürzt ($225 \pm 21 \mu\text{m}$ vs. $308 \pm 23 \mu\text{m}$, Verkürzung um 27%). Ebenso war die Summe aller axonalen Astlängen bei $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen gegenüber $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen signifikant geringer ($384 \pm 39 \mu\text{m}$ vs. $501 \pm 33 \mu\text{m}$, Reduktion um 23%). Die Messergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt und in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass in $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen das Auswachsen der Axone gestört ist.

Tabelle 7. Vergleich des längsten axonalen Astes und der Gesamtlänge aller axonalen Äste zwischen $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen und $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen. Die Axone der Smn -defizienten Motoneurone waren signifikant verkürzt. Das Signifikanzniveau betrug jeweils $P < 0.05$. Die Daten wurden in vier unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 35 Einzelmessungen gewonnen.

Motoneurone	$Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneurone	$Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone
längster axonaler Ast	$308 \pm 23 \mu\text{m}$	$225 \pm 21 \mu\text{m}$
Länge aller axonalen Äste	$501 \pm 33 \mu\text{m}$	$384 \pm 39 \mu\text{m}$

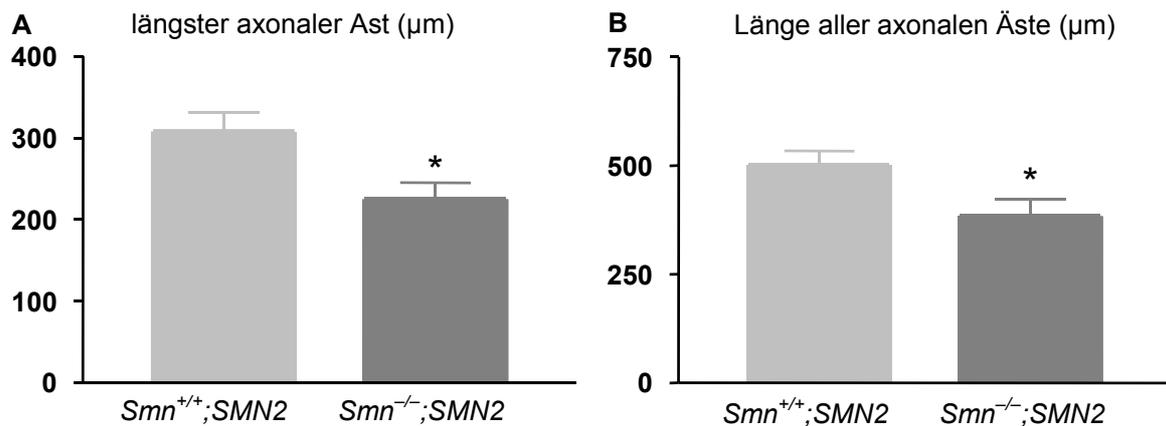


Abbildung 9. (A) mittlere Länge des längsten axonalen Astes und (B) mittlere Länge der Summe aller axonalen Äste der Motoneurone nach fünf Tagen in Kultur. Bei Motoneuronen der $Smn^{-/-};SMN2$ -Mäuse war die Axonlänge jeweils signifikant reduziert. * Das Sternchen zeigt jeweils einen signifikanten Unterschied mit $P < 0.05$ an.

Die Dendritenlängen hingegen zeigten keine Unterschiede zwischen Smn -defizienten und Kontrollmotoneuronen. Der längste Dendrit war bei $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen gegenüber $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen nicht signifikant verschieden ($64.2 \pm 6.6 \mu\text{m}$ vs. $57.5 \pm 4.9 \mu\text{m}$). Ebenso ergab die Messung der Summe der Längen aller Dendritenfortsätze keinen signifikanten Unterschied zwischen $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen und $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen ($117 \pm 13 \mu\text{m}$ vs. $106 \pm 15 \mu\text{m}$). Die Messwerte zeigt Tabelle 8, die graphische Auswertung Abbildung 10.

Table 8. Vergleich der Länge des längsten Dendriten und der Länge aller Dendriten bei *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen und *Smn*^{+/+};*SMN2*-Motoneuronen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Neuronengruppen. Die Daten wurden in vier unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 30 Messungen gewonnen.

Motoneurone	<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i> -Motoneurone	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> -Motoneurone
längster Dendrit	57.5 ± 4.9 µm	64.2 ± 6.6 µm
Länge aller Dendriten	106 ± 15 µm	117 ± 13 µm

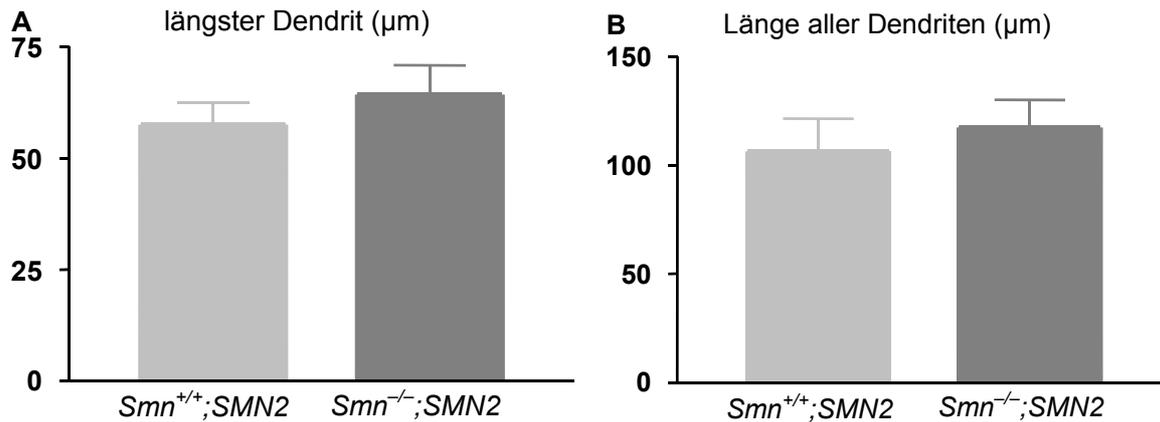


Abbildung 10. (A) mittlere Länge des längsten Dendriten und (B) Länge der Summe aller Dendriten eines Motoneurons nach fünf Tagen in Kultur. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Smn*^{+/+};*SMN2*- und *Smn*^{-/-};*SMN2*- Motoneuronen.

Während die *Smn*-defizienten Motoneurone ein signifikant verkürztes Axonwachstum zeigen, ist das Dendritenwachstum hingegen nicht beeinträchtigt.

5.1.3 Verteilung des Zytoskelettproteins β -Aktin in Motoneuronen

Es stellte sich die Frage, wodurch das in Abschnitt 5.1.2 beschriebene verkürzte Axonwachstum verursacht wird und wie es erklärt werden kann. Eine plausible Erklärung wäre eine Störung im Zytoskelett, das aus den Komponenten Mikrotubuli, Aktinfilamente (Mikrofilamente) und intermediäre Filamente besteht. Das Zytoskelett stellt ein hochstrukturiertes, dynamisches, zytoplasmatisches Netzwerk dar, das sowohl für die Gestalt der Zelle als auch für Bewegungsvorgänge zentrale Bedeutung besitzt. Aus diesem Grund wurden Motoneurone mit Antikörpern zunächst gegen das Zytoskelettprotein β -Aktin angefärbt.

Zelluläres Aktin existiert in drei Isoformen: α -, β - und γ -Aktin. β -Aktin stellt diejenige Isoform dar, die vor allem im Nervensystem exprimiert wird und in besonderer Weise am Auswachsen der Nervenzellfortsätze beteiligt ist. Während eine größere Menge von

β -Aktin in den Nervenzellfortsätzen gefunden werden kann, ist γ -Aktin hingegen hauptsächlich im Zellkörper von Neuronen lokalisiert. Die Färbungen gegen β -Aktin sind in Abbildung 11 dargestellt und zeigten sowohl bei $Smn^{+/+};SMN2-$ als auch bei $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen eine starke Anfärbung des Zellkörpers. Bei $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen war das initiale Axon nur schwach gefärbt, im Verlauf des Axons nahm die Menge an β -Aktin deutlich zu und es zeigte sich eine starke Anfärbung des Wachstumskegels (weiße Pfeile in (A)). Im Gegensatz hierzu stehen die Beobachtungen bei $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen. Im Verlauf des Axons nahm hier die Färbungsintensität stark ab; der Wachstumskegel war nur sehr schwach angefärbt (weiße Pfeile in (B)). Die Experimente zeigten also bei $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen eine Störung der β -Aktin-Verteilung mit geringeren Mengen an β -Aktin im distalen Axon und im Wachstumskegel. Der isoformspezifische β -Aktin-Antikörper, der für die in Abbildung 11 gezeigten Färbungen verwendet wurde, erkennt den NH₂-Terminus (Aminosäuren 2–15). Dieses Epitop könnte durch posttranslationale Modifizierung oder Bindung weiterer Proteine maskiert werden. Deshalb wurden die Färbungen mit einem pan-Aktin-Antikörper wiederholt, der ein COOH-terminales Epitop (Aminosäuren 50–70) erkennt. In der Abbildung 12 zeigte sich wiederum die gleiche gestörte Verteilung für Aktin in $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen im Vergleich zu $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen (weiße Pfeile an den Wachstumskegeln).

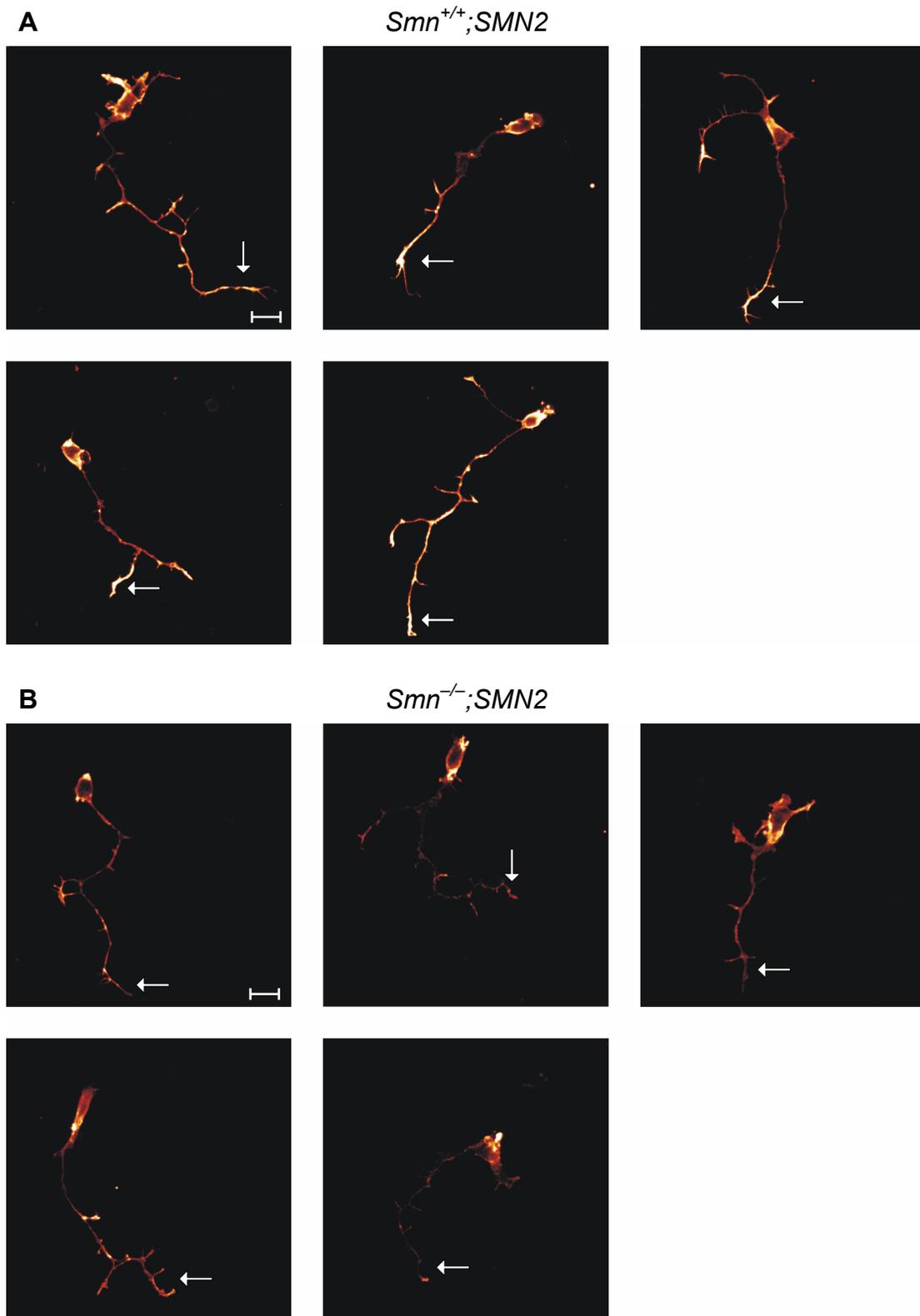


Abbildung 11. β -Aktin-Verteilung in den Axonen primärer Motoneuron-Zellkulturen von *Smn^{+/+};SMN2*- (A) und *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen (B). Motoneurone der *Smn^{+/+};SMN2*-Mäuse zeigten eine Zunahme der β -Aktin-Menge im Verlauf des Axons und eine starke Anreicherung in den Wachstumskegeln (weiße Pfeile). Die Intensität der β -Aktin-Färbung in den Axonen erschien in *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen geringer, weiterhin fehlte die Akkumulation im distalen Teil des Axons in den Motoneuronen (weiße Pfeile). Die Länge der Maßstab Balken beträgt 20 μ m.

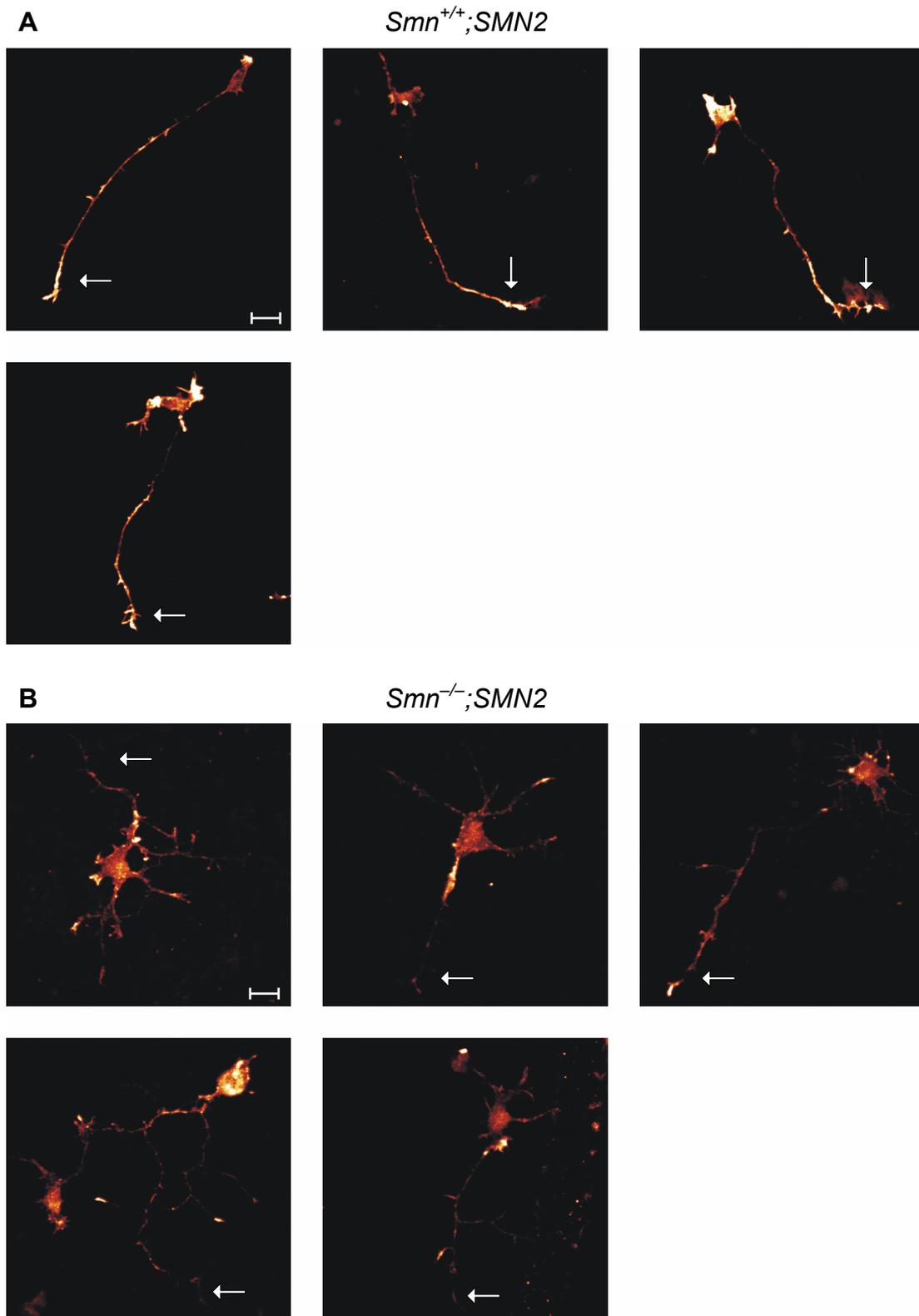


Abbildung 12. Immunfluoreszenzfärbung mit einem pan-Aktin-Antikörper. Die Akkumulation von Aktin im distalen Axon und im Wachstumskegel der Motoneurone, die bei *Smn^{+/+};SMN2*-Mäusen beobachtet werden konnte (*A*), fehlte in den Motoneuronen der *Smn^{-/-};SMN2*-Mäuse (*B*). Das distale Axon und der Wachstumskegel sind jeweils mit einem weißen Pfeil markiert. Die Länge der Maßstab Balken beträgt 20 μm .

5.1.4 Vergleich der Wachstumskegelflächen von Motoneuronen

Als Endpunkte der Axone stellen die Wachstumskegel diejenige Struktur dar, in der das gerichtete Längenwachstum stattfindet und die später als präsynaptischer Bereich die Verbindung zum Zielgewebe herstellt. Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, kommt es zur Anreicherung von β -Aktin in den Wachstumskegeln. Zur genaueren Untersuchung der Morphologie der Wachstumskegel wurden wieder β -Aktin-Antikörper-Färbungen durchgeführt. Wie bereits in geringerer Vergrößerung gesehen, so zeigten auch die herausvergrößerten Wachstumskegel von *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen gegenüber Kontrollmotoneuronen eine deutlich geringere Anreicherung von β -Aktin (weiße Pfeile in der Abbildung 13).

Die Vermessung der Flächen der Wachstumskegel ergab bei *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen eine hochsignifikante Verminderung der Fläche gegenüber *Smn*^{+/+};SMN2-Motoneuronen ($14.4 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$ vs. $46.7 \pm 7.0 \mu\text{m}^2$). Die Ergebnisse der Messungen zeigt Tabelle 9, eine graphische Darstellung Abbildung 14.

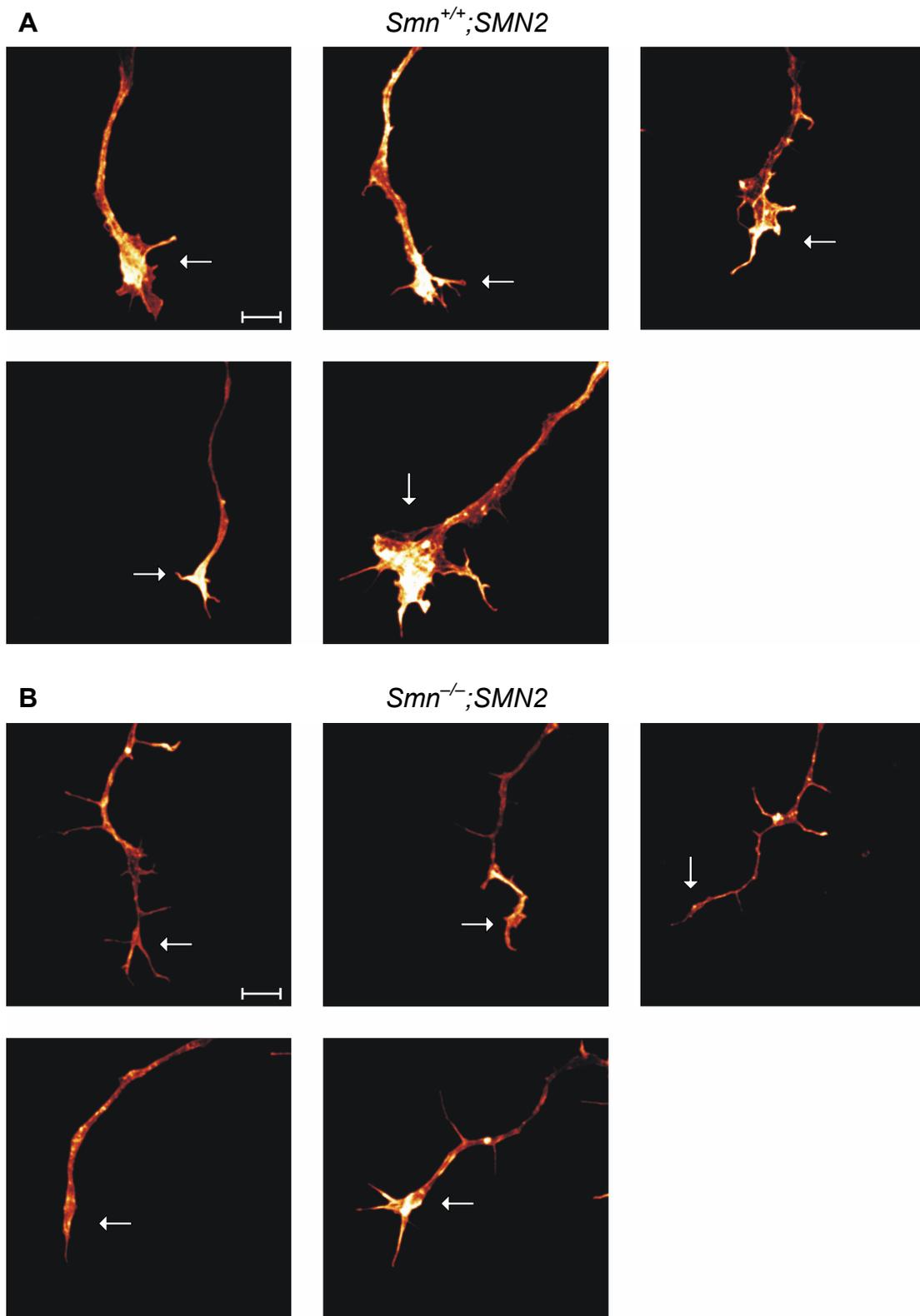


Abbildung 13. Morphologie der Wachstumskegel primärer Motoneuron-Zellkulturen. Anti- β -Aktin-Färbung der axonalen Wachstumskegel von *Smn^{+/+};SMN2*- (A) und *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen (B). Die Anreicherung mit β -Aktin war in den Wachstumskegeln mutierter Motoneurone deutlich schwächer ausgeprägt als bei Kontrollneuronen (weiße Pfeile). Außerdem erschienen die Wachstumskegel verkleinert. Die Länge der Maßstab Balken beträgt 5 μ m.

Tabelle 9. Die Flächen der Wachstumskegel waren bei $Smn^{-/-};SMN2-$ gegenüber $Smn^{+/+};SMN2-$ Motoneuronen signifikant verringert. Die Ergebnisse aus jeweils mindestens 30 Einzelmessungen waren hochsignifikant mit $P < 0.0001$.

Motoneurone	$Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneurone	$Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone
Fläche der Wachstumskegel	$46.7 \pm 7.0 \mu\text{m}^2$	$14.4 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$

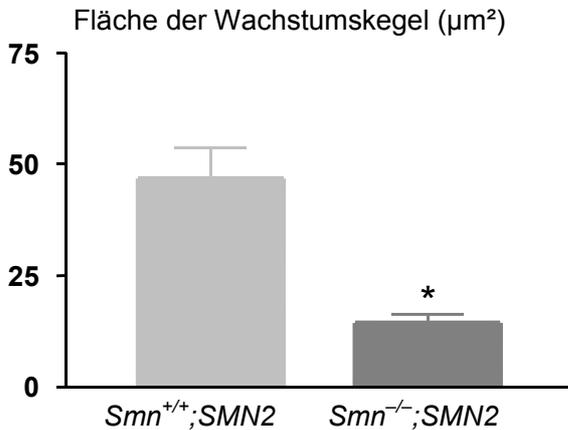


Abbildung 14. Motoneurone von $Smn^{+/+};SMN2$ - und von $Smn^{-/-};SMN2$ -Mäusen wurden fünf Tage kultiviert, gegen β -Aktin angefärbt und die Fläche der axonalen Wachstumskegel ausgemessen. $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone zeigten eine hochsignifikante Reduktion der mittleren Fläche der Wachstumskegel. * Das Sternchen zeigt das Signifikanzniveau $P < 0.0001$.

5.1.5 Verteilung von hnRNP R in Motoneuronen

Von Rossoll und Mitarbeitern konnte 2002 ein neuer Smn-Interaktionspartner identifiziert werden, der hauptsächlich in Axonen motorischer Nervenfasern lokalisiert ist, das sogenannte hnRNP R-Protein (siehe Abschnitt 1.1.4). hnRNP R ist ein RNA-bindendes Protein, für das eine spezifische Bindung an die 3' UTR der β -Aktin-mRNA nachgewiesen werden konnte (Rossoll et al., 2003a). Zur Untersuchung einer möglichen Verteilungsstörung von hnRNP R in Smn-defizienten Motoneuronen wurden immunzytochemische Färbungen gegen hnRNP R angefertigt. hnRNP R war in $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen in punktartigen Anreicherungen entlang des Axons verteilt und akkumulierte in den Wachstumskegeln. In den $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen war die Färbung im Axon insgesamt schwächer, außerdem fehlte die Anreicherung im Wachstumskegel (weiße Pfeile in der Abbildung 15). Die korrekte Lokalisation von hnRNP R entlang des Axons scheint folglich von der Anwesenheit einer ausreichenden Menge an intaktem Smn-Protein abzuhängen.

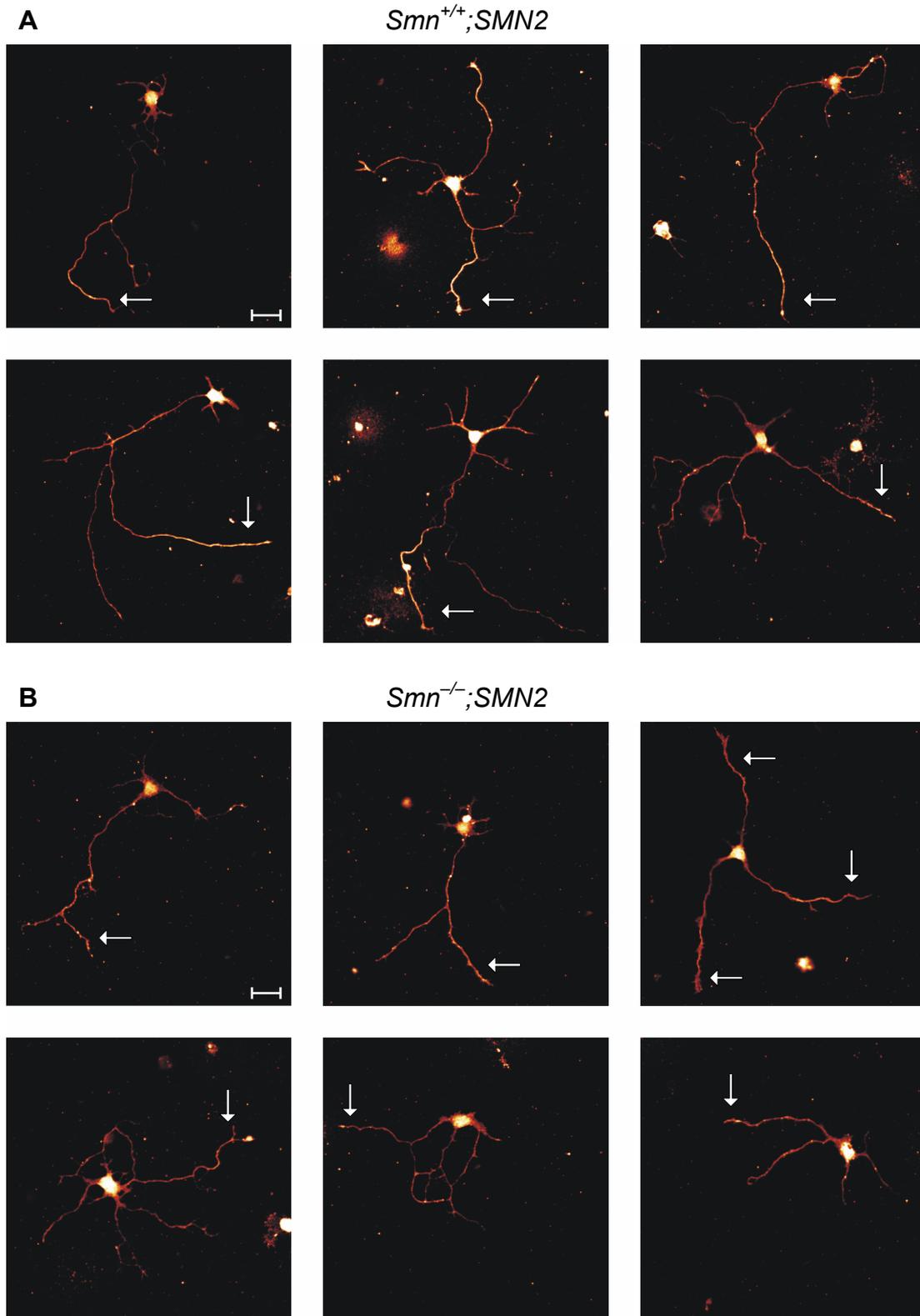


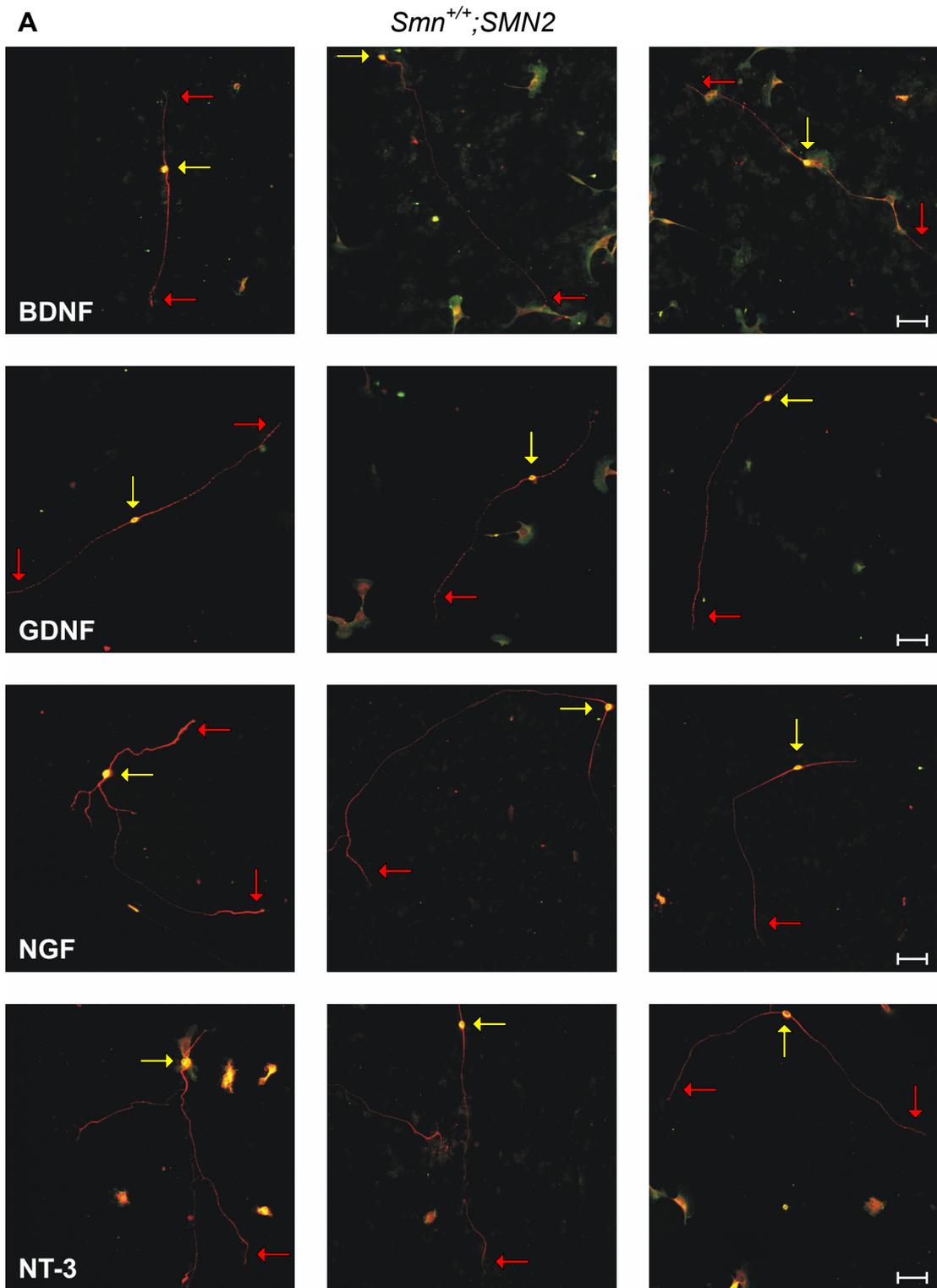
Abbildung 15. Immunfluoreszenzfärbung mit anti-hnRNP R-Antiserum. Die Kontrollmotoneurone zeigten vom initialen Axonsegment zum Wachstumskegel hin eine Zunahme der Menge an hnRNP R (A). Dieser Gradient war in Motoneuronen an *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt (B). Die weißen Pfeile zeigen jeweils auf das distale Axon und den Wachstumskegel. Die Länge der Maßstab balken beträgt 20 μ m.

5.2 Untersuchung sensorischer Neurone der Hinterwurzelganglien (DRGs)

5.2.1 Längenmessungen der Zellfortsätze der sensorischen Neurone

Da Patienten mit der schwersten Form der SMA neben der führenden motorischen Symptomatik auch sensible Defizite zeigen (Omran et al., 1998; Rudnik-Schöneborn et al., 2003; Anagnostou et al., 2005), sollten mögliche Veränderungen im sensorischen Nervensystem untersucht werden. Hierfür wurden die Hinterwurzelganglien 14 Tage alter Mausembryonen entnommen, die sensorischen Neurone 24 Stunden kultiviert und analog zum Vorgehen bei den Motoneuronen auf Veränderungen untersucht. Um das Neuritenwachstum zu messen, wurden diese fixiert und mit Antikörpern gegen phosphoryliertes tau-Protein (rote Zellfortsätze) und MAP-2 (grüne Färbung) angefärbt. Typische Vertreter für die verschiedenen sensorischen Subpopulationen, denen je einer der neurotrophen Faktoren BDNF, GDNF, NGF oder NT-3 in der Endkonzentration von 1 ng/ml zugesetzt war, sind in Abbildung 16 gezeigt. Die Zellkörper sind jeweils mit einem gelben Pfeil, die Neuriten mit einem roten Pfeil markiert.

Die Vermessung der Neuritenlänge zeigte in allen Subpopulationen eine geringe, jedoch signifikante Reduktion bei *Smn*-defizienten sensorischen Neuronen im Vergleich zu den sensorischen Kontrollneuronen. Bei Zugabe des Faktors BDNF, der vor allem Nervenzellen für die schnelle Mechanozeption stimuliert, betrug die Länge des längsten Neuritenfortsatzes bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen $314 \pm 8.1 \mu\text{m}$ gegenüber $341 \pm 9.3 \mu\text{m}$ bei *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Mäusen. GDNF wirkt auf verschiedene Qualitäten des sensorischen Systems. Der längste Neuritenast betrug bei *Smn*-defizienten Nervenzellen $317 \pm 8.8 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $341 \pm 8.0 \mu\text{m}$ bei Kontrollen. Die schmerzleitenden Neurone werden hauptsächlich durch NGF stimuliert. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Tieren ($327 \pm 8.5 \mu\text{m}$) gegenüber *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Tieren ($359 \pm 9.8 \mu\text{m}$). Eine gleichartige Veränderung der mutierten im Vergleich zu den Kontrollneuronen zeigte sich bei den durch NT-3 stimulierten propriozeptiven Nervenzellen, die die Muskelspindeln innervieren ($316 \pm 11.2 \mu\text{m}$ vs. $354 \pm 10.0 \mu\text{m}$). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 10 aufgelistet, die graphische Auswertung zeigt Abbildung 17.



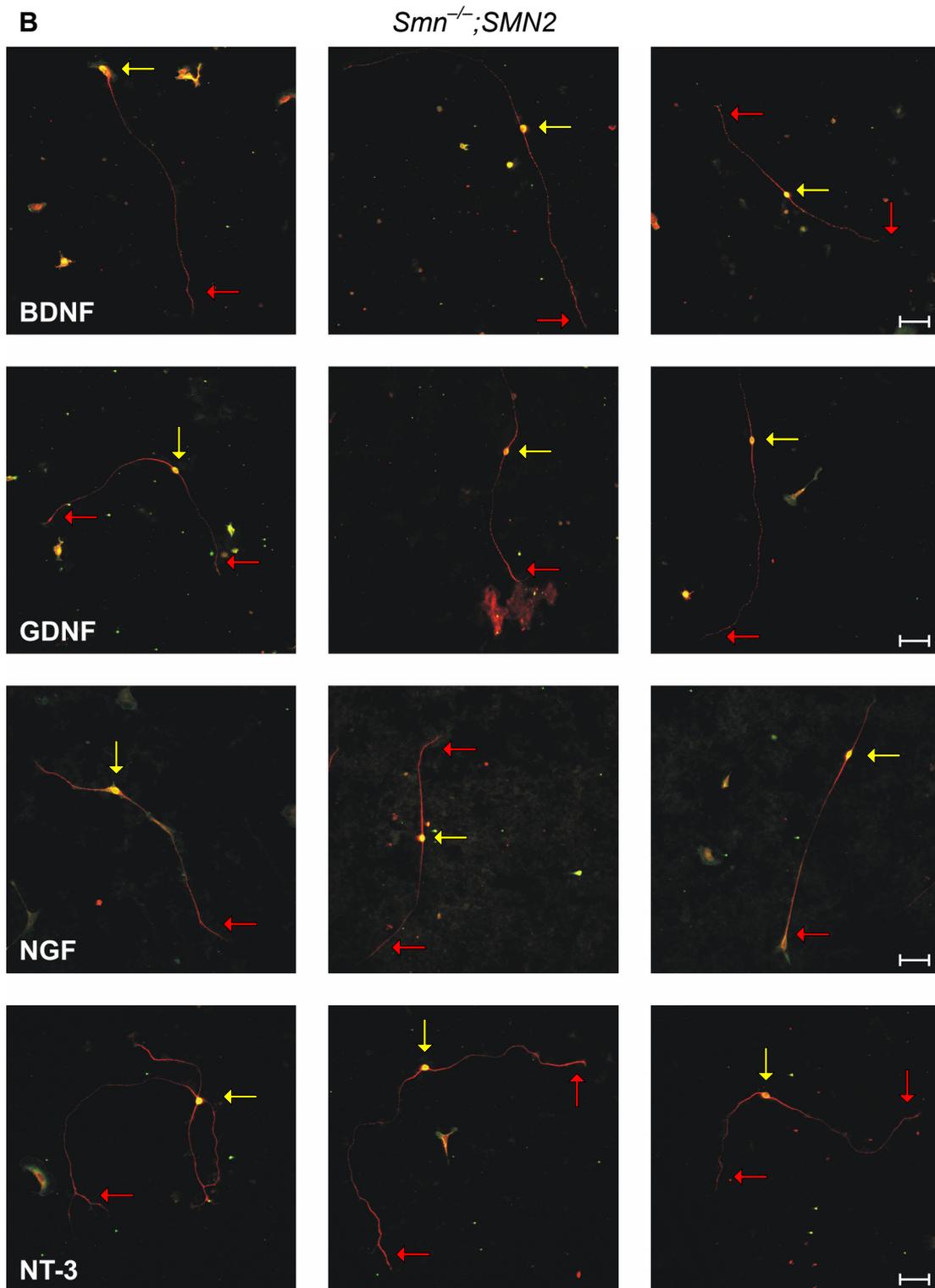


Abbildung 16. Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen MAP-2 (grüne Färbung) und phospho-tau (rote Zellfortsätze). Die gelben Pfeile deuten jeweils auf den Zellkörper, die roten Pfeile auf die Neuriten der sensorischen Neurone. Die sensorischen Neurone der Hinterwurzelganglien wurden mit jeweils einem der folgenden Faktoren behandelt: BDNF, GDNF, NGF oder NT-3. Gezeigt sind jeweils typische Beispiele sensorischer Neurone von *Smn^{+/+};SMN2*-Mäusen (A) und *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen (B). Die Länge der Maßstab Balken beträgt 40 μ m.

Tabelle 10. Längenmessungen der Neuriten sensorischer Neurone mit jeweils einem neurotrophen Faktor BDNF, GDNF, NGF oder NT-3. Es zeigte sich in allen Subpopulationen eine signifikante Verkürzung der Neuritenlänge bei *Smn*^{-/-};*SMN2*- gegenüber *Smn*^{+/+};*SMN2*-Mäusen. Das Signifikanzniveau betrug jeweils $P < 0.05$. Die Messungen mit BDNF und NGF stammen aus jeweils drei, die Messungen mit GDNF und NT-3 aus jeweils vier unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 50 Messungen.

Neurotropher Faktor	Neuritenlänge <i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	Neuritenlänge <i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	Reduktion
BDNF	341 ± 9.3 µm	314 ± 8.1 µm	8%
GDNF	341 ± 8.0 µm	317 ± 8.8 µm	7%
NGF	359 ± 9.8 µm	327 ± 8.5 µm	9%
NT-3	354 ± 10.0 µm	316 ± 11.2 µm	11%

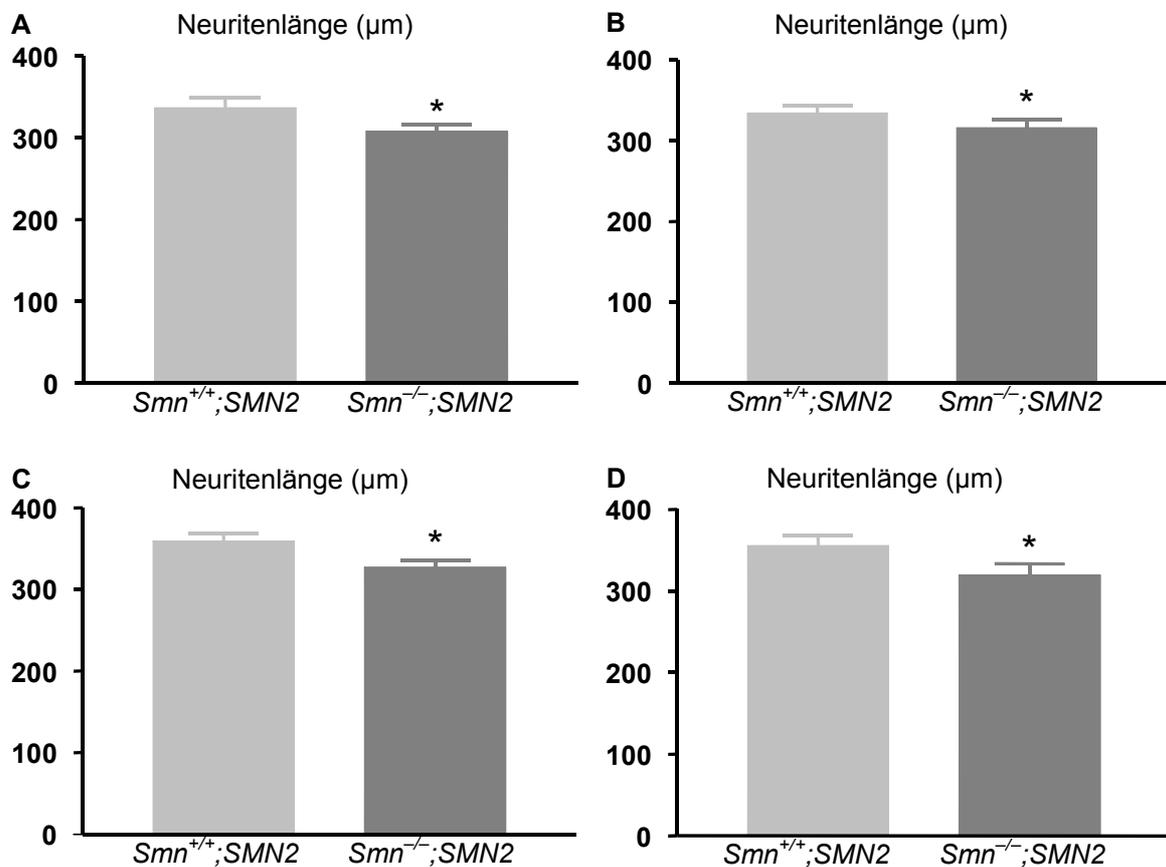
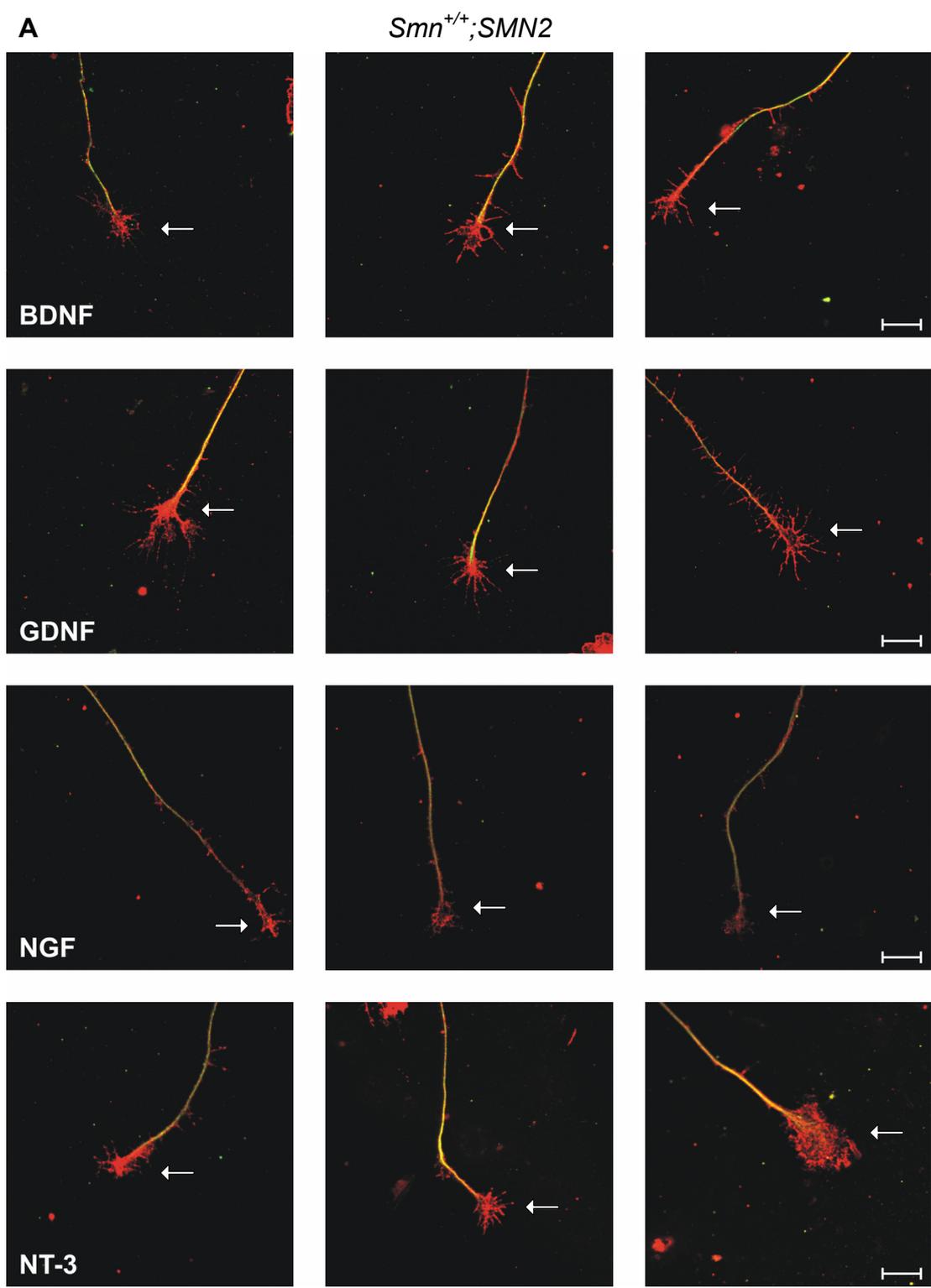


Abbildung 17. Die sensorischen Neurone der Hinterwurzelganglien wurden 24 Stunden mit jeweils einem der folgenden neurotrophen Faktoren kultiviert: BDNF (A), GDNF (B), NGF (C), NT-3 (D). Bei allen Subpopulationen waren die Neuriten *Smn*-defizienter sensorischer Neurone (*Smn*^{-/-};*SMN2*) kürzer als die Neuriten in Kontrollneuronen (*Smn*^{+/+};*SMN2*). * Das Signifikanzniveau betrug jeweils $P < 0.05$.

5.2.2 Vergleich der Flächen der Wachstumskegel von sensorischen Neuronen

Da auch das Auswachsen der sensorischen Neurone im Mausmodell der SMA gestört ist, wurde die Morphologie der Wachstumskegel genauer untersucht. Die Wachstumskegel der sensorischen Neurone wurden mit Antikörpern gegen β -Aktin (rot) gefärbt. hnRNP R (grün) wurde als schwache Gegenfärbung verwendet, um die Neuriten besser erkennen zu können. Die Anreicherung von β -Aktin erscheint in den Wachstumskegeln der sensorischen *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Nervenzellen schwächer als in denen der *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Neurone. Die typische Morphologie der Wachstumskegel für mutierte Tiere und Kontrolltiere zeigt Abbildung 18 (weiße Pfeile).

Die Vermessung der Flächen der Wachstumskegel ergab in allen untersuchten Subpopulationen der sensorischen Neurone eine hochsignifikante Reduktion bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Zellen im Vergleich zu *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Zellen. Im Einzelnen zeigten die BDNF-abhängigen Neurone für die Mechanozeption eine Reduktion der Wachstumskegelfläche auf $22.4 \pm 1.4 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zu $35.3 \pm 1.9 \mu\text{m}^2$ bei Kontrollen. Bei Neuronen, die mit GDNF am Leben gehalten wurden, war die Verminderung der Wachstumskegelfläche $21.5 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zu $33.9 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$. Bei den propriozeptiven Zellen, die mit NT-3 behandelt waren, betrug die Fläche der Wachstumskegel bei mutierten Zellen $23.3 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$ gegenüber $34.0 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ bei Kontrollzellen. Die Messergebnisse stehen in Tabelle 11, die graphischen Darstellungen zeigt die Abbildung 19. Wie Jablonka et al. (2006) zeigen konnten, waren die Flächen der NGF-behandelten sensorischen Neurone bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Nervenzellen im Vergleich zu *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Zellen in gleicher Weise vermindert. Das Signifikanzniveau betrug auch hier $P < 0.0001$.



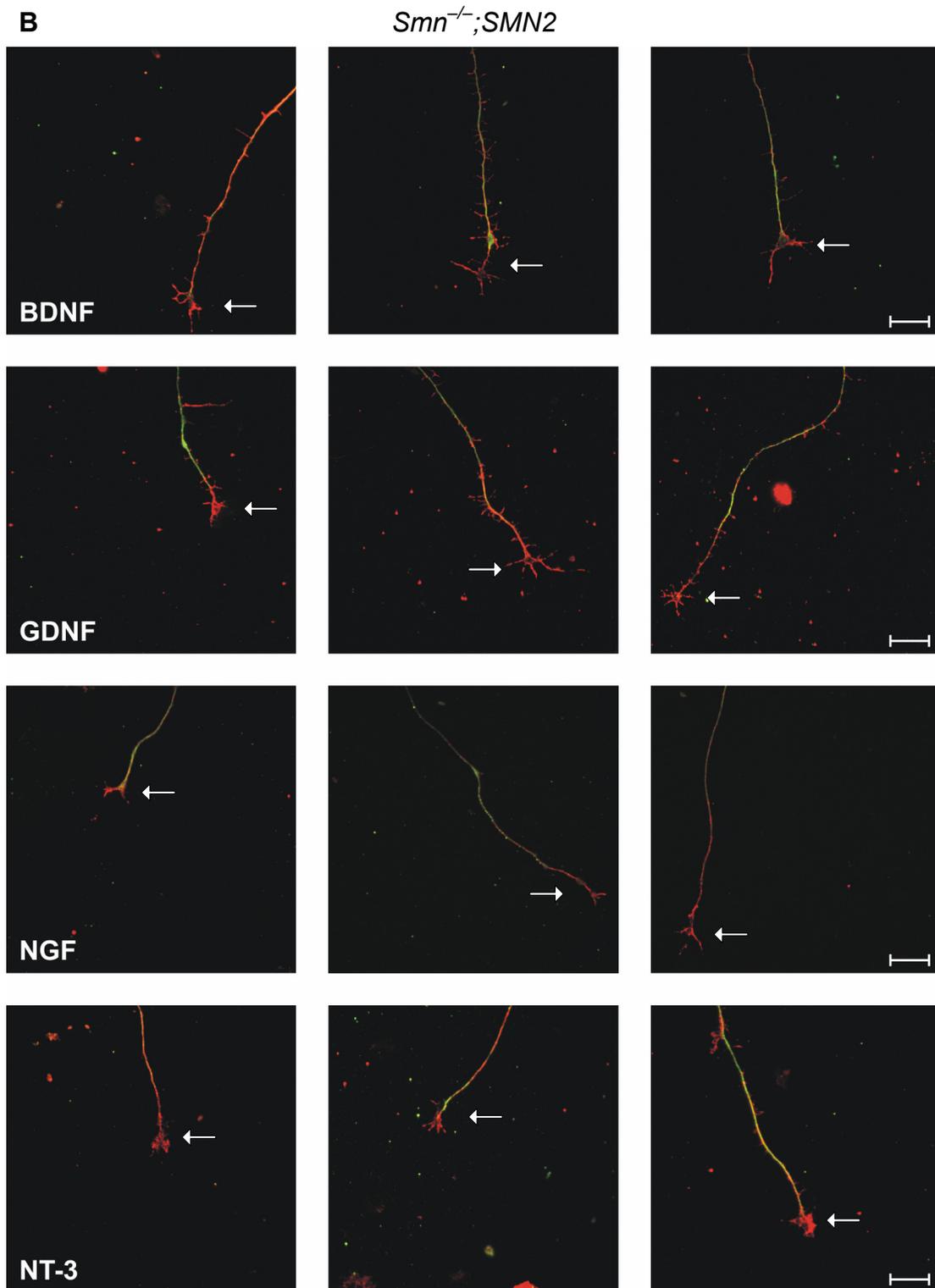


Abbildung 18. Wachstumskegel der verschiedenen Subpopulationen der sensorischen Neurone aus den Hinterwurzelganglien. Dargestellt sind jeweils typische Beispiele für die Morphologie der Wachstumskegel. Immunfluoreszenzfärbung gegen hnRNP R (grün) und β -Aktin (rot). Die Färbung gegen β -Aktin war in den Wachstumskegeln der $Smn^{-/-};SMN2$ -Tiere (B) schwächer ausgeprägt als bei den Kontrolltieren (A). Die weißen Pfeile deuten jeweils auf die Wachstumskegel. Die Länge der Maßstab Balken beträgt 5 μ m.

Tabelle 11. Vermessung der Flächen der Wachstumskegel bei sensorischen Neuronen mit jeweils einem neurotrophen Faktor BDNF, GDNF oder NT-3. Bei *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen war in allen Subpopulationen die Fläche gegenüber Kontrolltieren hochsignifikant verringert. Das Signifikanzniveau betrug jeweils $P < 0.0001$. Die Ergebnisse stammen für BDNF aus zwei, für GDNF und NT-3 aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 40 einzelnen Messungen.

Neurotropher Faktor	Fläche der Wachstumskegel <i>Smn^{+/+};SMN2</i>	Fläche der Wachstumskegel <i>Smn^{-/-};SMN2</i>
BDNF	$35.3 \pm 1.9 \mu\text{m}^2$	$22.4 \pm 1.4 \mu\text{m}^2$
GDNF	$33.9 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$	$21.5 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$
NT-3	$34.0 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$	$23.3 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$

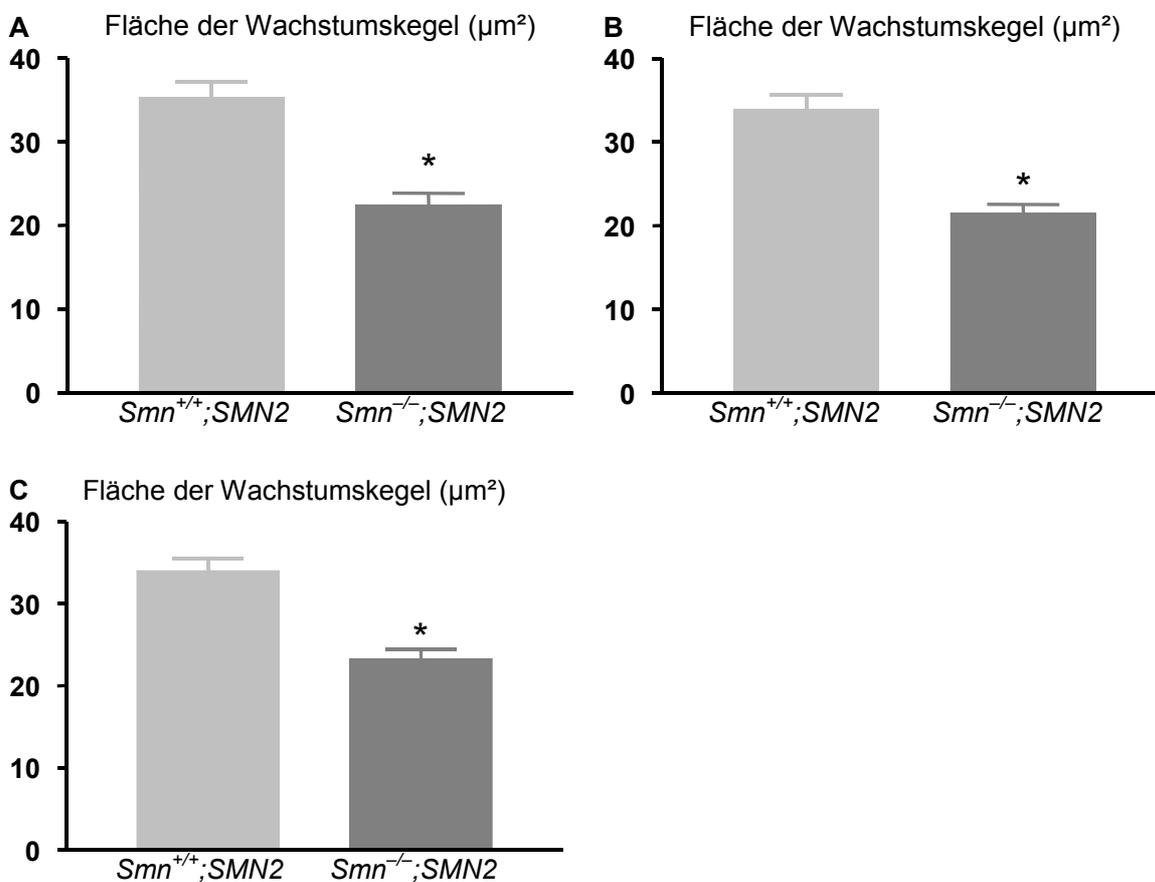


Abbildung 19. Die sensorischen Neurone von *Smn^{+/+};SMN2*- und von *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen wurden 24 Stunden mit jeweils einem neurotrophen Faktor BDNF (A), GDNF (B) oder NT-3 (C) kultiviert und gegen β -Aktin angefärbt. Die Ausmessung der Flächen der Wachstumskegel zeigte für alle Subpopulationen aus *Smn^{-/-};SMN2*-Mäusen eine hochsignifikante Reduktion gegenüber Kontrollmäusen. * Das Signifikanzniveau betrug in allen Versuchen $P < 0.0001$.

6 Diskussion

6.1 Morphologische Veränderungen in kultivierten Motoneuronen

Der spinalen Muskelatrophie liegt ein Defekt im *SMN1*-Gen zugrunde. Das SMN-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Assemblierung von RNA/Protein-Komplexen, vor allem von Spleißosomen, und ist so für essentielle zelluläre Funktionen in allen Zellen notwendig („housekeeping Funktionen“). Die homozygote Ausschaltung des *Smn*-Gens im Mausmodell ist bereits in der frühen Embryonalentwicklung, im Morulastadium, letal (Schrank et al., 1997). Mutationen im SMN-Protein führen zu einer Störung der Assemblierung des Spleißosoms (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997; Pellizzoni et al., 2002b; Feng et al., 2005; Shpargel und Matera, 2005; Wan et al., 2005; Renvoisé et al., 2006). *In vitro* kann bei Fehlen von SMN auch eine Störung des mRNA-Spleißens nachgewiesen werden (Pellizzoni et al., 1998); diese wird im Tiermodell der SMA dagegen nicht beobachtet (Jablonka et al., 2000a; Jablonka et al., 2004). Dadurch wird die Relevanz der beobachteten Störung für die Pathophysiologie dieser Motoneuronenerkrankung in Frage gestellt. Auch entspricht die Annahme einer Störung in einer essentiellen zellulären Funktion in allen Zelltypen nicht dem beobachteten Krankheitsbild, denn dieses zeigt hauptsächlich eine schwere Dysfunktion bei Motoneuronen. Möglicherweise erfüllt das SMN-Protein in verschiedenen Geweben auch unterschiedliche zusätzliche Funktionen, eventuell mit jeweils speziellen Bindungspartnern (Übersichtsartikel: Jablonka et al., 2000b; Briese et al., 2005; Monani, 2005; Eggert et al., 2006). So stellt sich die Frage, welche weiteren Funktionen das SMN-Protein erfüllt und welche davon für die Pathophysiologie der spinalen Muskelatrophie verantwortlich sind.

Der Phänotyp des *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausmodells mit niedriger *SMN2*-Kopienzahl ähnelt dem Krankheitsbild bei Patienten mit SMA Typ I. Die betroffenen Mäuse sterben zum Teil bereits *in utero* oder kurz nach der Geburt. Der zu diesem Zeitpunkt beobachtete geringe Motoneuronverlust im Rückenmark kann diese schwere Symptomatik nicht erklären (Monani et al., 2000a). Daher wurde ein Pathomechanismus postuliert, der distal vom Zellkörper, nämlich im präsynaptischen Bereich der Motorendplatte, beginnt und sich dann als sogenannte „dying back disease“ bis zum Zellkörper fortsetzt.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die motoneuronspezifischen Ereignisse hinsichtlich Überleben, Morphologie, axonalem Längenwachstum, Wachstumskegelentwicklung, Verteilung von Zytoskelettproteinen und motoneuronspezifischen Interaktionspartnern bei kultivierten Motoneuronen aus dem Mausmodell genauer zu untersuchen, um den pathomechanistischen Ereignissen auf den Grund zu gehen.

Um zu klären, ob ein vermindertes Zellüberleben *per se* der Pathomechanismus der Motoneuronenerkrankung ist, wurde das Überleben wildtypischer und *Smn*-defizienter Motoneurone *in vitro* untersucht. Wildtypische und *Smn*-defiziente embryonale Motoneurone wurden über fünf Tage kultiviert und jeden Tag die Überlebensraten bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *Smn*^{+/+}; *SMN2*- und *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen (Tabelle 6 und Abbildung 7; Publikation: Rossoll et al., 2003a). Daher ist davon auszugehen, dass das Absterben der Motoneurone nicht die primäre Störung der Erkrankung darstellt, sondern erst sekundär durch andere Störungen ausgelöst wird und im späteren Verlauf der Erkrankung als Folge einer anderen Störung auftritt. Die Ergebnisse passen gut zu den phänotypischen Beobachtungen des *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausmodells, in dem sich früh ein schweres Krankheitsbild entwickelt, während die Verminderung der Motoneurone im Rückenmark (17%) vergleichsweise mild ist (Monani et al., 2000a). Um Störungen im Axon- und Dendritenwachstum zu analysieren, wurden in dieser Arbeit kultivierte primäre Motoneurone anhand von Antikörperfärbungen gegen Zytoskelettproteine (MAP-2, phospho-tau, β -Aktin) untersucht. Bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen fanden sich morphologische Veränderungen der Neuriten. Gegenüber Kontrollen war bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen das axonale Wachstum signifikant beeinträchtigt. Es war sowohl der längste axonale Ast verkürzt als auch die Gesamtlänge aller axonalen Äste vermindert (Tabelle 7 und Abbildung 9). Das Auswachsen der Dendriten verlief normal (Tabelle 8 und Abbildung 10). In den Wachstumskegeln findet das gerichtete Auswachsen der Axone statt. Im Vergleich zu *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Motoneuronen zeigten die *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone eine signifikante Verringerung der Wachstumskegelfläche (Tabelle 9 und Abbildung 14). Es liegen also verschiedene Hinweise dafür vor, dass die primäre Störung im Bereich der Neuriten und des präsynaptischen Bereiches zu finden ist und dass diese Störung später zum Absterben der Motoneurone führt (dying back disease). In weiteren Tiermodellen der spinalen Muskelatrophie mit gewebespezifischem Knockout des Exon 7 im *Smn*-Gen der Maus

(Cifuentes-Diaz et al., 2002) bzw. Morpholin-induziertem Knockdown im Zebrafisch (McWhorter et al., 2003) zeigten sich ebenfalls motoneuronspezifische Wachstumsstörungen der Axone. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit Mutationen im *DmSMN*-Gen fanden sich Strukturstörungen der neuromuskulären Endplatten (Chan et al., 2003). Somit bestärken weitere Tiermodelle diese frühen Störungen der Axonmorphologie.

Die beobachteten Störungen können zum Verlust des Kontaktes der Nervenzelle zum Muskel und damit zur Verminderung der Versorgung z. B. mit neurotrophen Faktoren führen, was sekundär zum Absterben der Zellen führt. Erste Hinweise darauf gaben Beobachtungen an *Smn*-defizienten Mäusen, die mit dem neurotrophen Faktor Cardiotrophin-1 (CT-1) behandelt wurden und daraufhin eine Milderung des Phänotyps zeigten (Lesbordes et al., 2003). Somit könnte also eine mangelnde Versorgung mit neurotrophen Faktoren, die normalerweise vom Muskel bereitgestellt werden, die Motoneurondegeneration fördern.

Aufgrund der beobachteten axonalen Wachstumsstörung und den Strukturstörungen der neuromuskulären Endplatte haben wir die Hypothese postuliert, dass bei *Smn*-defizienten Motoneuronaxonen ein Defekt im Zytoskelett und ganz speziell im Mikrofilamentskelett vorliegt. Allgemein ist das Zytoskelett für die Gestalt einer Zelle notwendig. Die Mikrofilamente sind beteiligt am Sprossen, Auswachsen und Verzweigen der Axone und an der Bildung und Aufrechterhaltung der Synapsen, aber auch an der Vesikelausschüttung und demnach der Transmitterfreisetzung im präsynaptischen Bereich (Doussau und Augustine, 2000; Morales et al., 2000; Zhang et al., 2001; Zhang und Benson, 2001; Luo, 2002; Shupliakov et al., 2002; Bloom et al., 2003; Sankaranarayanan et al., 2003; Chen et al., 2004). Sowohl das β -Aktin-Protein, das hauptsächlich in Neuronen zu finden ist, als auch die β -Aktin-mRNA reichern sich stark im distalen Axon und im Wachstumskegel von kultivierten primären Motoneuronen an. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Färbungen des β -Aktin-Proteins in Motoneuronen von *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Mäusen neben einer perinukleären Anreicherung eine im Verlauf des Axons zunehmende Färbungsintensität und eine starke Anreicherung im Wachstumskegel. Dagegen war in den Axonen der *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäuse die Färbung schwach, und es fehlte eine Anreicherung im distalen Axon und im Wachstumskegelbereich (Abbildung 11). Somit konnte bei

Smn^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen ein eindeutiges β -Aktin-Protein-Defizit im präsynaptischen Bereich, dem Wachstumskegel, nachgewiesen werden.

Andere Experimente zeigten, dass auch die β -Aktin-mRNA in *Smn*-defizienten Wachstumskegeln fehlt. β -Aktin-mRNA bindet spezifisch über ihre 3' UTR an den *Smn*-Interaktionspartner hnRNP R (Rossoll et al., 2003a). hnRNP R findet sich hauptsächlich in den Axonen von Motoneuronen (Rossoll et al., 2002). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass hnRNP R in *Smn*-defizienten kultivierten Motoneuronen fehlverteilt ist mit deutlich geringeren Mengen im distalen Axon und im Wachstumskegel (Abbildung 15). Daher kann man die Hypothese ableiten, dass hier ein axonales Transportproblem für das hnRNP R-Protein und die daran gebundene β -Aktin-mRNA vorliegt. Weiterhin konnten Rossoll und Mitarbeiter zeigen, dass in differenzierenden PC12-Zellen die Überexpression des *Smn*- oder des hnRNP R-Proteins zu einem verlängerten Neuritenwachstum führt. Dahingegen bewirkt die Überexpression eines mutierten *Smn*- oder hnRNP R-Proteins keine signifikante Änderung der Neuritenlänge (Rossoll et al., 2003a). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die weiteren gewonnen Erkenntnisse können in folgendem Modell des Pathomechanismus der spinalen Muskelatrophie in Abbildung 20 zusammengefasst werden: Das hnRNP R-Protein lagert sich mit der gebundenen β -Aktin-mRNA an das SMN-Protein an. Dieser Komplex wird dann entlang des Zytoskeletts der Axone transportiert.

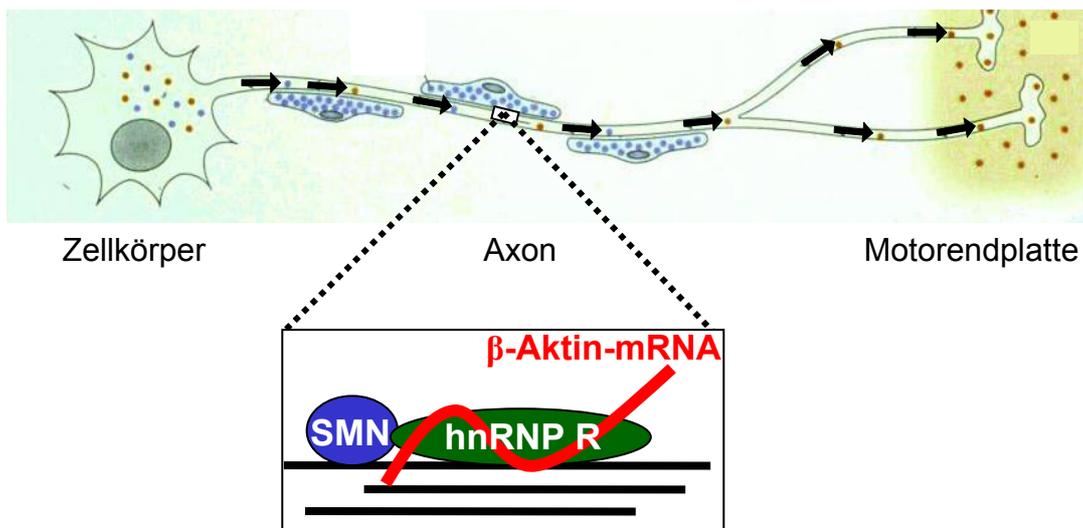


Abbildung 20. Modell der möglichen Pathophysiologie der SMA. Das SMN-Protein bindet an hnRNP R und so indirekt auch an spezifische mRNAs, z. B. an β -Aktin-mRNA. Dieser Komplex wird entlang des Zytoskeletts in Axonen transportiert. In den Nervenfortsätzen erfolgt die Translation zum β -Aktin-Protein, das vielfältige Funktionen für das Auswachsen der Axone, die Aufrechterhaltung und Funktion der Synapsen sowie den Transport weiterer Komponenten wahrnehmen kann (nach Rossoll et al., 2003b).

Die Anreicherung von β -Aktin-mRNA und die Translation zum β -Aktin-Protein in distalen Bereichen der langen Zytoplasmafortsätze der Motoneurone ist wichtig für das Auswachsen und die Aufrechterhaltung der Zellfortsätze. Neben der reinen propulsiven Funktion wird das β -Aktin-Zytoskelett zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von Synapsen sowie zur Modulation der Synapsenstärke benötigt (Zhang und Benson, 2001). β -Aktin findet sich angereichert im präsynaptischen Bereich und fungiert hier als Stützgerüst für weitere Proteine und Vesikel (Sankaranarayanan et al., 2003). Die synaptischen Vesikel, die den Neurotransmitter enthalten, sind zum einen als aktiver Pool direkt an der Plasmamembran der neuromuskulären Endplatte lokalisiert. Zum anderen existiert im Zentrum der Endplatte ein Reserve-Pool an Vesikeln, der bei hochfrequenten Entladungen zur Auffüllung des aktiven Pools beiträgt (Kuromi und Kidokoro, 1998). Die Vesikel aus dem Reserve-Pool sind über Synapsin an das β -Aktin-Zytoskelett gebunden. Es gibt Hinweise, dass die Freisetzung der Vesikel in den aktiven Pool durch aktiven Transport mittels Myosin entlang des β -Aktin-Zytoskeletts oder durch Depolymerisation des Zytoskeletts erfolgt (Doussau und Augustine, 2000). Weiterhin scheint β -Aktin zusammen mit Synapsin an der Endozytose der Vesikel und Wiederauffüllung des Vesikel-Reserve-Pools beteiligt zu sein (Shupliakov et al., 2002; Bloom et al., 2003). Damit übernimmt das Aktin-Zytoskelett wichtige Aufgaben bei der Bereitstellung und dem Recycling synaptischer Vesikel für die Neurotransmitterausschüttung. Daneben findet auch die Integration von Transmembranproteinen, wie z. B. Ionenkanälen und Rezeptoren, entlang des β -Aktin-Zytoskeletts statt. Das Nervenaktionspotential löst in der präsynaptischen Membran das Öffnen spannungsabhängiger Calcium-Kanäle aus. Das einströmende Calcium führt zur Exozytose der synaptischen Vesikel. Die korrekte Lokalisation von Rezeptoren, z. B. für neurotrophe Faktoren in die Plasmamembran, ist für die Aufrechterhaltung einer Zelle unerlässlich. Durch eine Störung der Smn-Funktion wird die korrekte Lokalisation und damit Funktion von β -Aktin im distalen Axon gestört. Hierdurch kann es zu einer Störung im strukturellen Aufbau der Synapse kommen. Die Störung der Bereitstellung und Wiederherstellung synaptischer Vesikel könnte die Neurotransmitterausschüttung beeinträchtigen. Der defekte Einbau von Ionenkanälen, wie z. B. von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen, könnte zu einer verminderten Erregbarkeit der Zellen führen. In ähnlicher Weise könnte der gestörte Einbau von Rezeptoren für z. B. neurotrophe Faktoren eine reduzierte Wirkung neurotropher Faktoren

auf Differenzierung und Überleben der Motoneurone bewirken. Diese Mechanismen können zur Pathophysiologie der spinalen Muskelatrophie beitragen.

Allerdings sind verschiedene Details noch unklar. Die Funktion von hnRNP R-SMN kann über den reinen Transport von β -Aktin-mRNA und weiteren mRNAs hinausgehen. Die Familie der hnRNP-Proteine erfüllt vielfältige Aufgaben im mRNA-Metabolismus, wie Regulation der mRNA-Stabilität, des mRNA-Editing, -Spleißens und möglicherweise auch Kontrolle der Translation (Kiebler und DesGroseillers, 2000; Shyu und Wilkinson, 2000; Mourelatos et al., 2001). Ein sinnvoller Ansatzpunkt für zukünftige Versuche ist somit die Untersuchung der Funktionen von hnRNP R mit seinem Bindungspartner SMN in Motoneuronen. Neben seiner Lokalisation in Motoneuronen wird hnRNP R auch in zahlreichen weiteren Geweben exprimiert (Rossoll et al., 2002). Ob oder welche Funktionen von hnRNP R für diese Gewebe mit Zellen ohne lange Fortsätze essentiell sind, müssen weitere Versuche klären. Zur Klärung der Rolle von hnRNP R in Motoneuronen und anderen Geweben wären detaillierte Untersuchungen der Veränderungen in *hnRNP R*-KO-Mäusen oder Mäusen mit Morpholin-induziertem Knockdown von hnRNP R interessant.

Weiterhin muss eine mögliche Involvierung weiterer Komponenten im hnRNP R-SMN-Komplex bedacht werden. Die Rollen von ZBP-1 und ZBP-2 bei diesem Transport sind bislang noch nicht geklärt. An die 3' UTR der β -Aktin-mRNA bindet ZBP-1, das für den Transport ebenfalls essentiell ist (Kislauskis et al., 1994; Übersichtsartikel: Kiebler und DesGroseillers, 2000). In gleicher Weise bindet auch ZBP-2 an den Zipcode der β -Aktin-mRNA und kann eine Aufgabe für die mRNA-Lokalisierung wahrnehmen (Gu et al., 2002). Die Profiline sind eine weitere Gruppe von Proteinen, die an SMN binden und in die Regulation der Aktin-Dynamik einbezogen sind. Die Profiline sind ebenfalls in den Wachstumskegeln angereichert; die Bindung an mutierte Formen des SMN-Proteins ist gestört (Giesemann et al., 1999; Sharma et al., 2005). Ob die Profiline eine gemeinsame Funktion mit SMN beim Auswachsen der Zytoplasmafortsätze erfüllen, ist bislang jedoch weitgehend unklar.

Das Zytoskelett der Zellen besteht neben Aktin vor allem aus Mikrotubuli, die aus Tubulin-Heterodimeren aufgebaut sind, und Intermediärfilamenten, die als Hauptbestandteil Neurofilament enthalten. Sowohl für Tubulin als auch für Neurofilament wurden in *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen im Vergleich zu *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Motoneuronen

keine Verteilungsstörungen gesehen (Rossoll et al., 2003a). Dagegen fanden Cifuentes-Diaz et al. (2002) eine massive Akkumulation von Neurofilament in den terminalen Axonen des neuronalen *Smn*-Knockout-Mausmodells. Nach diesen widersprüchlichen Ergebnissen bleibt bislang ungeklärt, ob auch Mikrotubuli und Intermediärfilamente einen Beitrag zum Pathomechanismus der SMA leisten.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit bei den Motoneuronen des *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausmodells der SMA Typ I eine Verminderung der Axonlänge und Wachstumskegelfläche und einen Mikrofilament-Defekt im präsynaptischen Bereich. Diese Veränderungen könnten zu einer nicht voll funktionsfähigen Präsynapse führen. Denkbar wären Störungen der Integration von Transmembranproteinen, der Endo- und Exozytose oder der Transmitterfreisetzung. Dies kann sekundär die beobachtete Degeneration der Motoneurone zur Folge haben. Um weitere Erkenntnisse zum genauen Pathomechanismus der SMA zu erhalten, wären Untersuchungen zur Funktion solcher zellulärer Prozesse *in vivo* hilfreich.

6.2 Morphologische Veränderungen in kultivierten sensorischen Nervenzellen der Hinterwurzelganglien (DRGs)

Bei der spinalen Muskelatrophie wird hauptsächlich die Dysfunktion der α -Motoneurone beobachtet (Bromberg und Swoboda, 2002; Swoboda et al., 2005), jedoch finden sich bei schweren Formen der SMA zusätzlich sensorische Störungen, die als Sensibilitätsstörungen und verminderte sensible Nervenleitgeschwindigkeiten in Erscheinung treten (Omran et al., 1998; Anagnostou et al., 2005), und zumindest in schweren Fällen mit einer axonalen Degeneration im Nervus suralis einhergehen (Rudnik-Schöneborn et al., 2003).

Um wie bei den Motoneuronen die morphologischen Defekte bei den sensorischen Neuronen zu untersuchen, wurden Hinterwurzelganglien von *Smn*-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert und 24 Stunden in Gegenwart von BDNF, NGF, NT-3 bzw. GDNF in einer Endkonzentration von 1 ng/ml kultiviert. Die durch BDNF stimulierten Nervenzellen vermitteln die Mechanozeption, die durch NGF stimulierten die Nozizeption und die durch NT-3 stimulierten Zellen die Propriozeption. GDNF stimuliert verschiedene Subpopulationen sensorischer Nerven. Die Untersuchung der Überlebensraten ergab in keiner Subpopulationen eine signifikante Veränderung bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Tieren gegenüber

den *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Tieren. In diesem frühen embryonalen Stadium kommt es also weder bei den motorischen noch in den sensorischen Neuronen zu einer Einschränkung des Überlebens der Zellen (Jablonka et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die Neuritenlängen der *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäuse ausgemessen. Es zeigte sich in jeder Subpopulation eine geringe, jedoch signifikante Verkürzung gegenüber den Kontrollneuronen (Tabelle 10 und Abbildung 17). Außerdem war die Fläche der Wachstumskegel in allen Subpopulationen hochsignifikant geringer (Tabelle 11 und Abbildung 19). Diese Ergebnisse sind grundsätzlich ähnlich wie bei den Motoneuronen: Es zeigt sich eine frühe Störung des Auswachsens der Nervenzellfortsätze mit einer Verkleinerung der Wachstumskegel. Weitere Untersuchungen der sensorischen Nervenzellen an den postnatalen Tagen 3–5 erbrachten jedoch keinen vermehrten Zelluntergang (Jablonka et al., 2006), wie dies bei den Motoneuronen beobachtet wurde (Jablonka et al., 2000a; Monani et al., 2000a).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen spezifische Veränderungen der sensorischen Nervenzellen, die jedoch weniger ausgeprägt sind als bei Motoneuronen. Die deutliche Reduktion des Smn-Proteins führt bei sensorischen Nervenzellen zu einer geringen, jedoch signifikanten Verkürzung der Neuriten und zu einer deutlich signifikanten Verkleinerung der Wachstumskegel.

Korrespondierend zur mildereren Ausprägung der Störungen in der Zellkultur findet man bei Patienten mit SMA allenfalls eine diskrete Beteiligung des sensorischen Systems bei schweren Krankheitsverläufen (Typ I). Das Smn-bindende Protein hnRNP R ist im Nervensystem nur in Motoneuronen hoch exprimiert, nicht dagegen in sensorischen Nervenzellen. Dies gibt Hinweise darauf, dass das Smn-Protein zusammen mit hnRNP R eine motoneuronspezifische Funktion erfüllt. Möglicherweise existieren in sensorischen Zellen andere gewebespezifische Faktoren oder Smn-Bindungspartner für die Aufrechterhaltung der Neuriten, so dass auch die sensorischen Nervenzellen anfällig für ein Defizit an Smn-Protein sind.

Die beobachteten Differenzen in der Ausprägung der Störung können neben möglicher Unterschiede in der Ausstattung mit Smn-bindenden Proteinen auch durch strukturelle und funktionelle Unterschiede der Nervenendigungen verursacht sein. Die Wachstumskegel der Motoneurone sind größer als diejenigen der sensorischen Neurone und bilden eine spezielle Verbindung mit dem Zielgewebe aus, die neuromuskuläre Endplatte, an der ein

hohes Endplattenpotential erzeugt wird und die eine synaptische Funktion mit Freisetzung von Neurotransmittern erfüllt. Dagegen werden im sensorischen System die Reize über spezialisierte Sensoren registriert, in den kleineren sensorischen Nervenendigungen durch Öffnen von Ionenkanälen ein kleines Aktionspotential ausgelöst und dieses weitergeleitet. Insgesamt scheint die synaptische Funktion der Motorendplatte der Motoneurone stärker an ein intaktes β -Aktin-Zytoskelett gebunden sein als die Reizumwandlung und -weiterleitung in den sensorischen Zellen.

In der Zellkultur sowohl motorischer als auch sensorischer Neurone waren bei *Smn*^{-/-};SMN2-Mäusen im Vergleich zu *Smn*^{+/+};SMN2-Mäusen die Überlebensraten unverändert, das Axon- und Wachstumskegelwachstum jedoch gestört. Die Gleichartigkeit der Störungen im motorischen und sensorischen System deutet auf einen gemeinsamen Mechanismus hin. Die entscheidende Gemeinsamkeit der beiden Zelltypen könnten ihre langen Zytoplasmafortsätze sein. Die Notwendigkeit des Transports wichtiger Stoffe über lange Strecken für Überleben und Aufrechterhaltung der Funktion könnte diese beiden Zelltypen besonders anfällig gegenüber Transportstörungen machen. Die unterschiedlichen Anforderungen an die beiden Systeme sowie Unterschiede in der speziellen Ausstattung dieser Zellen zur Bewältigung der Transportleistung könnten die beobachteten Differenzen mit hauptsächlicher Beteiligung des motorischen Systems erklären.

7 Zusammenfassung

Die proximale spinale Muskelatrophie (SMA) stellt eine der häufigsten erblichen Ursachen für den Tod im Kindesalter dar. Die Patienten leiden unter symmetrischen, langsam progredienten motorischen Lähmungen und in schweren Fällen auch an sensiblen Ausfällen. Die neurodegenerative Erkrankung wird autosomal-rezessiv durch Deletion bzw. Mutationen des *SMN1*-Gens auf Chromosom 5q13 vererbt. Das SMN-Protein wird ubiquitär exprimiert und findet sich in allen untersuchten Geweben im sogenannten SMN-Komplex, der die Zusammenlagerung von spleißosomalen Komplexen koordiniert. Die Funktion solcher Komplexe ist für alle Zelltypen essentiell. Deshalb stellt sich die Frage, welcher Pathomechanismus für die Erkrankung SMA verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Überlebensraten der *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone 14 Tage alter Mausembryonen gegenüber *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Motoneuronen nicht reduziert waren. Die morphologische Untersuchung der Zellen zum gleichen Entwicklungszeitpunkt ergab jedoch deutliche Veränderungen. Die Axonlängen der *Smn*-defizienten Motoneurone waren gegenüber Kontrollen signifikant verringert. Das Dendritenwachstum war nicht beeinträchtigt. Die Untersuchung der Wachstumskegel ergab bei den Mutanten eine signifikante Verminderung der Fläche gegenüber Kontrollen. Weiterhin zeigten sich Defekte im Mikrofilamentskelett. In den Motoneuronen von Kontrolltieren fand sich neben einer perinukleären Anreicherung eine im Verlauf des Axons zunehmende Anfärbung mit β -Aktin sowie eine starke Ansammlung in den Wachstumskegeln. In *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen fehlte die Anreicherung im distalen Axon und in den Wachstumskegeln. Eine gleichartige Verteilungsstörung fand sich für das SMN-Interaktionsprotein hnRNP R und, wie andere Arbeiten zeigen konnten, auch für die β -Aktin-mRNA, die spezifisch an hnRNP R bindet. Parallel zu den Motoneuronen wurden auch Veränderungen in den sensorischen Neuronen untersucht. Die Überlebensraten sensorischer Nervenzellen aus den Hinterwurzelganglien 14 Tage alter Mausembryonen waren bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nicht signifikant verschieden. Die vorliegende Arbeit zeigt morphologische Auffälligkeiten der sensorischen Nervenzellen. Bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen war die Neuritenlänge gering, jedoch signifikant verkürzt und die Fläche der Wachstumskegel hochsignifikant verringert. In anderen Arbeiten zeigte sich jedoch auch im postnatalen Verlauf keine Reduktion der Anzahl der sensorischen Nervenzellen in den Hinterwurzelganglien. Im

Mausmodell für eine schwere Form der SMA fanden sich in den sensorischen Nervenzellen im Vergleich zu den Motoneuronen geringer ausgeprägte, jedoch gleichartige Veränderungen.

8 Literaturverzeichnis

Agerman, K.; Hjerling-Leffler, J.; Blanchard, M. P.; Scarfone, E.; Canlon, B.; Nosrat, C.; Ernfors, P. BDNF gene replacement reveals multiple mechanisms for establishing neurotrophin specificity during sensory nervous system development. *Development* **2003**, *130*, 1479–1491.

Anagnostou, E.; Miller, S. P.; Guiot, M. C.; Karpati, G.; Simard, L.; Dilenge, M. E.; Shevell, M. I. Type I spinal muscular atrophy can mimic sensory-motor axonal neuropathy. *J. Child Neurol.* **2005**, *20*, 147–150.

Baccon, J.; Pellizzoni, L.; Rappsilber, J.; Mann, M.; Dreyfuss, G. Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31957–31962.

Bassell, G. J.; Singer, R. H.; Kosik, K. S. Association of poly(A) mRNA with microtubules in cultured neurons. *Neuron* **1994a**, *12*, 571–582.

Bassell, G. J.; Powers, C. M.; Taneja, K. L.; Singer, R. H. Single mRNAs visualized by ultrastructural in situ hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **1994b**, *126*, 863–876.

Bassell, G. J.; Zhang, H.; Byrd, A. L.; Femino, A. M.; Singer, R. H.; Taneja, K. L.; Lifshitz, L. M.; Herman, I. M.; Kosik, K. S. Sorting of β -Actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 251–265.

Bassell, G. J.; Oleynikov, Y.; Singer, R. H. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* **1999**, *13*, 447–454.

Bassell, G. J.; Kelic, S. Binding proteins for mRNA localization and local translation, and their dysfunction in genetic neurological disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 574–581.

Battaglia, G.; Princivalle, A.; Forti, F.; Lizier, C.; Zeviani, M. Expression of the *SMN* gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6*, 1961–1971.

Baudet, C.; Mikaels, A.; Westphal, H.; Johansen, J.; Johansen, T. E.; Ernfors, P. Positive and negative interactions of GDNF, NTN and ART in developing sensory neuron

subpopulations, and their collaboration with neurotrophins. *Development* **2000**, *127*, 4335–4344.

Béchade, C.; Rostaing, P.; Cisterni, C.; Kalisch, R.; La Bella, V.; Pettmann, B.; Triller, A. Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur. J. Neurosci.* **1999**, *11*, 293–304.

Bloom, O.; Evergren, E.; Tomilin, N.; Kjaerulff, O.; Löw, P.; Brodin, L.; Pieribone, V. A.; Greengard, P.; Shupliakov, O. Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 737–747.

Brahe, C.; Clermont, O.; Zappata, S.; Tiziano, F.; Melki, J.; Neri, G. Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1971–1976.

Briese, M.; Esmaceli, B.; Sattelle, D. B. Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *BioEssays* **2005**, *27*, 946–957.

Bromberg, M. B.; Swoboda, K. J. Motor unit number estimation in infants and children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* **2002**, *25*, 445–447.

Brzustowicz, L. M.; Lehner, T.; Castilla, L. H.; Penchaszadeh, G. K.; Wilhelmsen, K. C.; Daniels, R.; Davies, K. E.; Leppert, M.; Ziter, F.; Wood, D.; Dubowitz, V.; Zerres, K.; Hausmanowa-Petrusewicz, I.; Ott, J.; Munsat, T. L.; Gilliam, T. C. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* **1990**, *344*, 540–541.

Bühler, D.; Raker, V.; Lührmann, R.; Fischer, U. Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 2351–2357.

Bürglen, L.; Lefebvre, S.; Clermont, O.; Burlet, P.; Viollet, L.; Cruaud, C.; Munnich, A.; Melki, J. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* **1996**, *32*, 479–482.

Bürglen, L.; Seroz, T.; Miniou, P.; Lefebvre, S.; Burlet, P.; Munnich, A.; Pequignot, E. V.; Egly, J. M.; Melki, J. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor

TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *60*, 72–79.

Buj-Bello, A.; Buchman, V. L.; Horton, A.; Rosenthal, A.; Davies, A. M. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* **1995**, *15*, 821–828.

Burghes, A. H. M. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *61*, 9–15.

Burlet, P.; Huber, C.; Bertrand, S.; Ludosky, M. A.; Zwaenepoel, I.; Clermont, O.; Roume, J.; Delezoide, A. L.; Cartaud, J.; Munnich, A.; Lefebvre, S. The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **1998**, *7*, 1927–1933.

Campbell, L.; Potter, A.; Ignatius, J.; Dubowitz, V.; Davies, K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *61*, 40–50.

Carissimi, C.; Saieva, L.; Baccon, J.; Chiarella, P.; Maiolica, A.; Sawyer, A.; Rappsilber, J.; Pellizzoni, L. Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8126–8134.

Carroll, P.; Lerwin, G. R.; Koltzenburg, M.; Toyka, K. V.; Thoenen, H. A role for BDNF in mechanosensation. *Nat. Neurosci.* **1998**, *1*, 42–46.

Cartegni, L.; Krainer, A. R. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in *SMN2* causes spinal muscular atrophy in the absence of *SMN1*. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 377–384.

Carter, T. A.; Bönnemann, C. G.; Wang, C. H.; Obici, S.; Parano, E.; De Fatima Bonaldo, M.; Ross, B. M.; Penchaszadeh, G. K.; Mackenzie, A.; Soares, M. B.; Kunkel, L. M.; Gilliam, T. C. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6*, 229–236.

Carvalho, T.; Almeida, F.; Calapez, A.; Lafarga, M.; Berciano, M. T.; Carmo-Fonseca, M. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 715–727.

Chan, Y. B.; Miguel-Aliaga, I.; Franks, C.; Thomas, N.; Trülzsch, B.; Sattelle, D. B.; Davies, K. E.; van den Heuvel, M. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 1367–1376.

Charroux, B.; Pellizzoni, L.; Perkinson, R. A.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Dreyfuss, G. Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 1181–1193.

Charroux, B.; Pellizzoni, L.; Perkinson, R. A.; Yong, J.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Dreyfuss, G. Gemin4: A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 1177–1186.

Chen, Y.; Bourne, J.; Pieribone, V. A.; Fitzsimonds, R. M. The role of actin in the regulation of dendritic spine morphology and bidirectional synaptic plasticity. *Neuroreport* **2004**, *15*, 829–832.

Cifuentes-Diaz, C.; Nicole, S.; Velasco M. E.; Borra-Cebrian, C.; Panozzo, C.; Frugier, T.; Millet, G.; Roblot, N.; Joshi, V.; Melki, J. Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 1439–1447.

Covert, D. D.; Le, T. T.; McAndrew, P. E.; Strasswimmer, J.; Crawford, T. O.; Mendell, J. R.; Coulson, S. E.; Androphy, E. J.; Prior, T. W.; Burghes, A. H. M. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6*, 1205–1214.

Crino, P. B.; Eberwine, J. Molecular Characterization of the dendritic growth cone: Regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* **1996**, *17*, 1173–1187.

Crowley, C.; Spencer, S. D.; Nishimura, M. C.; Chen K. S.; Pitts-Meek, S.; Armanini, M. P.; Ling, L. H.; McMahon, S. B.; Shelton, D. L.; Levinson, A. D; Phillips, H. S. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **1994**, *76*, 1001–1011.

- Cuscó, I.; Barceló, M. J.; Rojas-García, R.; Illa, I.; Gamez, J.; Cervera, C.; Pou, A.; Izquierdo, G.; Baiget, M.; Tizzano, E. F. SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings. *J. Neurol.* **2006**, *253*, 21–25.
- Da Silva, J. S.; Medina, M.; Zuliani, C.; Di Nardo, A.; Witke, W.; Dotti, C. G. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 1267–1279.
- DiDonato, C. J.; Ingraham, S. E.; Mendell, J. R.; Prior, T. W.; Lenard, S.; Moxley, R. T. 3rd; Florence, J.; Burghes, A. H. Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Ann. Neurol.* **1997a**, *41*, 230–237.
- DiDonato, C. J.; Chen, X. N.; Noya, D.; Korenberg, J. R.; Nadeau, J. H.; Simard, L. R. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* **1997b**, *7*, 339–352.
- DiDonato, C. J.; Lorson, C. L.; De Repentigny, Y.; Simard, L.; Chartrand, C.; Androphy, E. J.; Kothary, R. Regulation of murine survival motor neuron (Smn) protein levels by modifying *Smn* exon 7 splicing. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2727–2736.
- Doussau, F.; Augustine, G. J. The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: An overview. *Biochimie* **2000**, *82*, 353–363.
- Echaniz-Laguna, A.; Miniou, P.; Bartholdi, D.; Melki, J. The promoters of the survival motor neuron gene (*SMN*) and its copy (*SMNc*) share common regulatory elements. *Am. J. Hum. Genet.* **1999**, *64*, 1365–1370.
- Eggert, C.; Chari, A.; Laggerbauer, B.; Fischer, U. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 113–121.
- Eom, T.; Antar, L. N.; Singer, R. H.; Bassell, G. J. Localization of a β -actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 10433–10444.
- Ernfors, P.; Lee, K. F.; Jaenisch, R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* **1994**, *3687*, 147–150.

- Fan, L.; Simard, L. R. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 1605–1614.
- Farinas, I.; Jones, K. R.; Backus, C.; Wang, X. Y.; Reichardt, L. F. Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* **1994**, *369*, 658–661.
- Feng, W.; Gubitz, A. K.; Wan, L.; Battle, D. J.; Dostie, J.; Golembe, T. J.; Dreyfuss, G. Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1605–1611.
- Fischer, U.; Liu, Q.; Dreyfuss, G. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **1997**, *90*, 1023–1029.
- Friesen, W. J.; Dreyfuss, G. 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.* **2000**, *275*, 26370–26375.
- Frugier, T.; Tiziano, F. D.; Cifuentes-Diaz, C.; Miniou, P.; Roblot, N.; Dierich, A.; Le Meur, M.; Melki, J. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 849–858.
- Frugier, T.; Nicole, S.; Cifuentes-Diaz, C.; Melki, J. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 294–298.
- Gall, J. G. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 273–300.
- Gavazzi, I.; Kumar, R. D. C.; McMahon, S. B.; Cohen, J. Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.*, **1999**, *11*, 3405–3414.
- Giavazzi, A.; Setola, V.; Simonati, A.; Battaglia, G. Neuronal-specific roles of the survival motor neuron protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 267–277.
- Giesemann, T.; Rathke-Hartlieb, S.; Rothkegel, M.; Bartsch, J. W.; Buchmeier, S.; Jockusch, B. M.; Jockusch, H. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy

protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37908–37914.

Gilliam, T. C.; Brzustowicz, L. M.; Castilla, L. H.; Lehner, T.; Penchaszadeh, G. K.; Daniels, R. J.; Byth, B. C.; Knowles, J.; Hislop, J. E.; Shapira, Y.; Dubowitz, V.; Munsat, T. L.; Ott, J.; Davies K. E. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* **1990**, *345*, 823–825.

Girard, C.; Neel, H.; Bertrand, E.; Bordonné, R. Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2925–2932.

Grohmann, K.; Schuelke, M.; Diers, A.; Hoffmann, K.; Lucke, B.; Adams, C.; Bertini, E.; Leonhardt-Horti, H.; Muntoni, F.; Ouvrier, R.; Pfeufer, A.; Rossi, R.; Van Maldergem, L.; Wilmschurst, J. M.; Wienker, T. F.; Sendtner, M.; Rudnik-Schöneborn, S.; Zerres, K.; Hübner, C. Mutations in the gene encoding immunoglobulin μ -binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 75–77.

Gu, W.; Pan, F.; Zhang, H.; Bassell, G. J.; Singer, R. H. A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of β -actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 41–51.

Gubitz, A. K.; Mourelatos, Z.; Abel, L.; Rappsilber, J.; Mann, M.; Dreyfuss, G. Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5631–5636.

Gubitz, A. K.; Feng, W.; Dreyfuss, G. The SMN complex. *Exp. Cell Res.* **2004**, *296*, 51–56.

Hahnen, E.; Forkert, R.; Marke, C.; Rudnik-Schöneborn, S.; Schonling, J.; Zerres, K.; Wirth, B. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 1927–1933.

Hannus, S.; Bühler, D.; Romano, M.; Seraphin, B.; Fischer, U. The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 663–674.

- Hill, M. A.; Gunning, P. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J. Cell Biol.* **1993**, *122*, 825–832.
- Hill, M. A.; Schedlich, L.; Gunning, P. Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of β -actin mRNA within the cell. *J. Cell Biol.* **1994**, *126*, 1221–1230.
- Hsieh-Li, H. M.; Chang, J. G.; Jong, Y. J.; Wu, M. H.; Wang, N. M.; Tsai, C. H.; Li, H. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 66–70.
- Hüttelmaier, S.; Zenklusen, D.; Lederer, M.; Dichtenberg, J.; Lorenz, M.; Meng, X.; Bassell, G. J.; Condeelis, J.; Singer, R. H. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **2005**, *438*, 512–515.
- Jablonka, S.; Schrank, B.; Kralewski, M.; Rossoll, W.; Sendtner, M. 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.* **2000a**, *9*, 341–346.
- Jablonka, S.; Rossoll, W.; Schrank, B.; Sendtner, M. The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J. Neurol.* **2000b**, *247* (Suppl. 1), I/37–I/42.
- Jablonka, S.; Bandilla, M.; Wiese, S.; Bühler, D.; Wirth, B.; Sendtner, M.; Fischer, U. Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 497–505.
- Jablonka, S.; Holtmann, B.; Meister, G.; Bandilla, M.; Rossoll, W.; Fischer, U.; Sendtner, M. Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10126–10131.
- Jablonka, S.; Sendtner, M. Molecular and cellular basis of spinal muscular atrophy. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2003**, *4*, 144–149.
- Jablonka, S.; Wiese, S.; Sendtner, M. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J. Neurobiol.* **2004**, *58*, 272–286.
- Jablonka, S.; Karle, K.; Sandner, B.; Andreassi, C.; von Au, K.; Sendtner, M. Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 511–518.

Jones K. W.; Gorzynski, K.; Hales, C. M.; Fischer, U.; Badbanchi, F.; Terns, R. M.; Terns, M. P. Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38645–38651.

Josephson, A.; Widenfalk, J.; Trifunovski, A.; Widmer, H.-R.; Olson, L.; Spenger, C. GDNF and NGF family members and receptors in human fetal and adult spinal cord and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *440*, 204–217.

Kashiba, H.; Uchida, Y.; Senba, E. Distribution and colocalization of NGF and GDNF family ligand receptor mRNAs in dorsal root and nodose ganglion neurons of adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2003**, *110*, 52–62.

Kiebler, M. A.; DesGroseillers, L. Molecular insights in to mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **2000**, *25*, 19–28.

Kislauskis, E. H.; Li, Z.; Singer, R. H.; Taneja, K. L. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort α -cardiac and β -cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 165–172.

Kislauskis, E. H.; Zhu, X.; Singer, R. H. Sequences responsible for intracellular localization of β -actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 441–451.

Kislauskis, E. H.; Zhu, X.; Singer, R. H. β -actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 1263–1270.

Knowles, R. B.; Sabry, J. H.; Martone, M. E.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Bassell, G. J.; Kosik, K. S. Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 7812–7820.

Knowles, R. B.; Kosik, K. S. Neurotrophin-3 signals redistribute RNA in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14804–14808.

Kuromi, H.; Kidokoro, Y. Two distinct pools of synaptic vesicles in single presynaptic boutons in a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron* **1998**, *20*, 917–925.

Lefebvre, S.; Bürglen, L.; Reboullet, S.; Clermont, O.; Burlet, P.; Viollet, L.; Benichou, B.; Cruaud, C.; Millasseau, P.; Zeviani, M.; Le Paslier, D.; Frézal, J.; Cohen, D.;

- Weissenbach, J.; Munnich, A.; Melki, J. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **1995**, *80*, 155–165.
- Lefebvre, S.; Bulet, P.; Liu, Q.; Bertrand, S.; Clermont, O.; Munnich, A.; Dreyfuss, G.; Melki, J. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 265–269.
- Lesbordes, J. C.; Cifuentes-Diaz, C.; Miroglio, A.; Joshi, V.; Bordet, T.; Kahn, A.; Melki, J. Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 1233–1239.
- Lewin, G. R.; Ritter, A. M.; Mendell, L. M. On the role of nerve growth factor in the development of myelinated nociceptors. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 1896–1905.
- Liu, Q.; Dreyfuss, G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* **1996**, *15*, 3555–3565.
- Liu, Q.; Fischer, U.; Wang, F.; Dreyfuss, G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **1997**, *90*, 1013–1021.
- Lorson, C. L.; Strasswimmer, J.; Yao, J. M.; Baleja, J. D.; Hahnen, E.; Wirth, B.; Le, T.; Burghes, A. H.; Androphy, E. J. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* **1998a**, *19*, 63–66.
- Lorson, C. L.; Androphy, E. J. The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum. Mol. Genet.* **1998b**, *7*, 1269–1275.
- Lorson, C. L.; Hahnen, E.; Androphy, E. J.; Wirth, B. A single nucleotide in the *SMN* gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6307–6311.
- Lorson, C. L.; Androphy, E. J. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene *SMN*. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 259–265.
- Luo, L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 601–635.
- Malatesta, M.; Scassellati, C.; Meister, G.; Plöttner, O.; Bühler, D.; Sowa, G.; Martin, T. E.; Keidel, E.; Fischer, U.; Fakan, S. Ultrastructural characterisation of a nuclear domain

highly enriched in survival motor neuron (SMN) protein. *Exp. Cell Res.* **2004**, *292*, 312–321.

Matheson, C. R.; Carnahan, J.; Ulrich, J. L.; Bocangel, D.; Zhang, T. J.; Yan, Q. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J. Neurobiol.* **1997**, *32*, 22–32.

McWhorter, M. L.; Monani, U. R.; Burghes, A. H. M.; Beattie, C. E. Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 919–931.

Meister, G.; Bühler, D.; Pillai, R.; Lottspeich, F.; Fischer, U. A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 945–949.

Meister, G.; Eggert, C.; Fischer, U. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 472–478.

Melki, J.; Sheth, P.; Abdelhak, S.; Burlet, P.; Bachelot, M. F.; Lathrop, M. G.; Frezal, J.; Munnich, A. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* **1990**, *336*, 271–273.

Miguel-Aliaga, I.; Culetto, E.; Walker, D. S.; Baylis, H. A.; Sattelle, D. B.; Davies, K. E. The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 2133–2143.

Miguel-Aliaga, I.; Chan, Y. B.; Davies, K. E.; van den Heuvel, M. Disruption of SMN function by ectopic expression of the human *SMN* gene in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 99–102.

Mohr, E.; Richter, D. Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 669–679.

Monani, U. R.; McPherson, J. D.; Burghes, A. H. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim. Biophys. Acta* **1999a**, *1445*, 330–336.

- Monani, U. R.; Lorson, C. L.; Parsons D. W.; Prior, T. W.; Androphy, E. J.; Burghes, A. H. M.; McPherson, J. D. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Hum. Mol. Genet.* **1999b**, *8*, 1177–1183.
- Monani, U. R.; Sendtner, M.; Covert, D. D.; Parsons, D. W.; Andreassi, C.; Le, T. T.; Jablonka, S.; Schrank, B.; Rossol, W.; Prior, T. W.; Morris, G. E.; Burghes, A. H. M. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2000a**, *9*, 333–339.
- Monani, U. R.; Covert, D. D.; Burghes, A. H. M. Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2000b**, *9*, 2451–2457.
- Monani, U. R.; Pastore, M. T.; Gavrilina, T. O.; Jablonka, S.; Le, T. T.; Andreassi, C.; DiCocco, J. M.; Lorson, C.; Androphy, E. J.; Sendtner, M.; Podell, M.; Burghes, A. H. M. A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 41–52.
- Monani, U. R. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* **2005**, *48*, 885–896.
- Morales, M.; Colicos, M. A.; Goda, Y. Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* **2000**, *27*, 539–550.
- Mourelatos, Z.; Abel, L.; Yong, J.; Kataoka, N.; Dreyfuss, G. SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5443–5452.
- Mu, X.; Silos-Santiago, I.; Carroll, S. L.; Snider, W. D. Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 4029–4041.
- Munsat, T. L.; Davies, K. E. International SMA consortium meeting. (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul. Disord.* **1992**, *2*, 423–428.
- Nicole, S.; Cifuentes-Diaz, C.; Frugier, T.; Melki, J. Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* **2002**, *26*, 4–13.

- Omran, H.; Ketelsen, U. P.; Heinen, F.; Sauer, M.; Rudnik-Schöneborn, S.; Wirth, B.; Zerres, K.; Kratzer, W.; Korinthenberg, R. Axonal neuropathy and predominance of type II myofibers in infantile spinal muscular atrophy. *J. Child Neurol.* **1998**, *13*, 327–331.
- Owen, N.; Doe, C. L.; Mellor, J.; Davies, K. E. Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 675–684.
- Pagliardini, S.; Giavazzi, A.; Setola, V.; Lizier, C.; Di Luca, M.; DeBiasi, S.; Battaglia, G. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 47–56.
- Parsons, D. W.; McAndrew, P. E.; Iannaccone, S. T.; Mendell, J. R.; Burghes, A. H. M.; Prior, T. W. Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 1712–1723.
- Paushkin, S.; Charroux, B.; Abel, L.; Parkinson, R. A.; Pellizzoni, L.; Dreyfuss, G. The survival motor neuron protein of *Schizosaccharomyces pombe*. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23841–23846.
- Paushkin, S.; Gubitz, A. K.; Massenet, S.; Dreyfuss, G. The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 305–312.
- Pearn, J. H. The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type I). A total population survey in North-East England. *J. Med. Genet.* **1973**, *10*, 260–265.
- Pearn, J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.* **1978a**, *15*, 409–413.
- Pearn, J. Genetic studies of acute infantile spinal muscular atrophy (SMA type I). An analysis of sex ratios, segregation ratios, and sex influence. *J. Med. Genet.* **1978b**, *15*, 414–417.
- Pellizzoni, L.; Kataoka, N.; Charroux, B.; Dreyfuss, G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* **1998**, *95*, 615–624.

Pellizzoni, L.; Charroux, B.; Dreyfuss, G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11167–11172.

Pellizzoni, L.; Charroux, B.; Rappsilber, J.; Mann, M.; Dreyfuss, G. A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J. Cell Biol.* **2001a**, *152*, 75–85.

Pellizzoni, L.; Baccon, J.; Charroux, B.; Dreyfuss, G. The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr. Biol.* **2001b**, *11*, 1079–1088.

Pellizzoni, L.; Baccon, J.; Rappsilber, J.; Mann, M.; Dreyfuss, G. Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J. Biol. Chem.* **2002a**, *277*, 7540–7545.

Pellizzoni, L.; Yong, J.; Dreyfuss, G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* **2002b**, *298*, 1775–1779.

Prior, T. W.; Swoboda, K. J.; Scott, D.; Hejmanowski, A. Q. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am. J. Med. Genet. A.* **2004**, *130*, 307–310.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch; de Gruyter: Berlin, Germany, 259. Auflage, **2002**, S. 1104–1105.

Renvoisé, B.; Khoobarry, K.; Gendron, M. C.; Cibert, C.; Viollet, L.; Lefebvre, S. Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 680–692.

Rochette, C. F.; Gilbert, N.; Simard, L. R. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum. Genet.* **2001**, *108*, 255–266.

Ross, A. F.; Oleynikov, Y.; Kislauskis, E. H.; Taneja, K. L.; Singer, R. H. Characterization of a β -actin mRNA zipcode-binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 2158–2165.

Rossoll, W.; Kröning, A. K.; Ohndorf, U. M.; Steegborn, C.; Jablonka, S.; Sendtner, M. Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 93–105.

Rossoll, W.; Jablonka, S.; Andreassi, C.; Kröning, A. K.; Karle, K.; Monani, U. R.; Sendtner, M. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* **2003a**, *163*, 801–812.

Rossoll, W.; Jablonka, S.; Andreassi, C.; Kröning, A. K.; Karle, K.; Monani, U. R.; Sendtner, M. A new role for Smn in axonal transport of β -actin mRNA and axon growth. *33. Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, New Orleans, USA, November 08–12, **2003b**.

Roy, N.; Mahadevan, M. S.; McLean, M.; Shutler, G.; Yaraghi, Z.; Farahani, R.; Baird, S.; Besner-Johnston, A.; Levebvre, C.; Kang, X.; Salih, M.; Aubry, H.; Tamai, K.; Guan, X.; Ioannou, P.; Crawford, T. O.; de Jong, P. J.; Surh, L.; Ikeda, J. E. Korneluk, R. G.; MacKenzie, A. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **1995**, *80*, 167–178.

Rudnik-Schöneborn, S.; Goebel, H. H.; Schlote, W.; Molaian, S.; Omran, H.; Ketelsen, U.; Korinthenberg, R.; Wenzel, D.; Lauffer, H.; Kreiss-Nachtsheim, M.; Wirth, B.; Zerres, K. Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy. *Neurology* **2003**, *60*, 983–987.

Sankaranarayanan, S.; Atluri, P. P.; Ryan, T. A. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat. Neurosci.* **2003**, *6*, 127–135.

Scharf, J. M.; Endrizzi, M. G.; Wetter, A.; Huang, S.; Thompson T. G.; Zerres, K.; Dietrich, W. F.; Wirth, B.; Kunkel, L. M. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat. Genet.* **1998**, *20*, 83–86.

Schechterson, L. C.; Bothwell, M. Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron* **1992**, *9*, 449–463.

Schmidt, R. F.; Thews, G.; Lang, F. (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, *28. Auflage*, **2000**, S. 216.

Schrank, B.; Götz, R.; Gunnensen, J. M.; Ure, J. M.; Toyka, K. V.; Smith, A. G.; Sendtner, M. 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. USA* **1997**, *94*, 9920–9925.

Selenko, P.; Sprangers, R.; Stier, G.; Bühler, D.; Fischer, U.; Sattler, M. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 27–31.

Sharma, A.; Lambrechts, A.; Hao, le T.; Le, T. T.; Sewry, C. A.; Ampe, C.; Burghes, A. H.; Morris, G. E. A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp. Cell Res.* **2005**, *309*, 185–197.

Shpargel, K. B.; Matera, A. G. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17372–17377.

Shupliakov, O.; Bloom, O.; Gustafsson, J. S.; Kjaerulff, O.; Low, P.; Tomilin, N.; Pieribone, V. A.; Greengard, P.; Brodin, L. Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14476–14481.

Shyu, A. B.; Wilkinson, M. F. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* **2000**, *102*, 135–138.

Singh, N. K.; Singh, N. N.; Androphy, E. J.; Singh, R. N. Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1333–1346.

Singh, N. N.; Androphy, E. J.; Singh, R. N. An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004a**, *315*, 381–388.

Singh N. N.; Androphy, E. J.; Singh, R. N. *In vivo* selection reveals combinatorial controls that define a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *RNA* **2004b**, *10*, 1291–1305.

- Skordis, L. A.; Dunckley, M. G.; Bürglen, L.; Campbell, L.; Talbot, K.; Patel, S.; Melki, J.; Davies, K. E.; Dubowitz, V.; Muntoni, F. Characterization of novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA. *Hum. Genet.* **2001**, *108*, 356–357.
- Smeyne, R. J.; Klein, R.; Schnapp, A.; Long, L. K.; Bryant, S.; Lewin, A.; Lira, S. A.; Barbacid, M. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **1994**, *368*, 246–249.
- Snee, M.; Kidd, G. J.; Munro, T. P.; Smith, R. RNA trafficking and stabilization elements associate with multiple brain proteins. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 4661–4669.
- Snider, W. D.; Wright, D. E. Neurotrophins cause a new sensation. *Neuron* **1996**, *16*, 229–232.
- Strasswimmer, J.; Lorson, C. L.; Breiding, D. E.; Chen, J. J.; Le, T.; Burghes, A. H. M.; Androphy, E. J. Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 1219–1226.
- Sundell, C. L.; Singer, R. H. Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* **1991**, *253*, 1275–1277.
- Swoboda, K. J.; Prior, T. W.; Scott, C. B.; McNaught, T. P.; Wride, M. C.; Reyna, S. P.; Bromberg, M. B. Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann. Neurol.* **2005**, *57*, 704–712.
- Tiruchinapalli, D. M.; Oleynikov, Y.; Kelič, S.; Shenoy, S. M.; Hartley, A.; Stanton, P. K.; Singer, R. H.; Bassell, G. J. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and β -actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 3251–3261.
- Viollet, L.; Bertrand, S.; Bueno Brunialti A. L.; Lefebvre, S.; Burlet, P.; Clermont, O.; Cruaud, C.; Guenet, J. L.; Munnich, A.; Melki, J. cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (*Smn*). *Genomics* **1997**, *40*, 185–188.
- Vitali, T.; Sossi, V.; Tiziano, F.; Zappata, S.; Giuli, A.; Paravatou-Petsotas, M.; Neri, G.; Brahe, C. Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence

for a role for *SMN2* in the modulation of disease severity in SMA patients. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 2525–2532.

Wan, L.; Battle, D. J.; Yong, J.; Gubitz, A. K.; Kolb, S. J.; Wang, J.; Dreyfuss, G. The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 5543–5551.

Wang, J.; Dreyfuss, G. Characterization of functional domains of the SMN protein *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45387–45393.

Will, C. L.; Lührmann, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 290–301.

Winkler, C.; Eggert, C.; Gradl, D.; Meister, G.; Giegerich, M.; Wedlich, D.; Laggerbauer, B.; Fischer, U. Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2320–2330.

Wirth, B.; Herz, M.; Wetter, A.; Moskau, S.; Hahnen, E.; Rudnik-Schöneborn, S.; Wienker, T.; Zerres, K. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle *SMN1* mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.* **1999**, *64*, 1340–1356.

Wirth, B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (*SMN1*) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* **2000**, *15*, 228–237.

Wirth, B.; Brichta, L.; Schrank, B.; Lochmüller, H.; Blick, S.; Baasner, A.; Heller, R. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased *SMN2* copy number. *Hum. Genet.* **2006**, *119*, 422–428.

Wright, D. E.; Zhou, L.; Kucera, J.; Snider, W. D. Introduction of a neurotrophin-3 transgene into muscle selectively rescues proprioceptive neurons in mice lacking endogenous neurotrophin-3. *Neuron* **1997**, *19*, 503–517.

Yamashita, M.; Nishio, H.; Harada, Y.; Matsuo, M.; Yamamoto, T. Significant increase in the number of the *SMN2* gene copies in an adult-onset Type III spinal muscular atrophy patient with homozygous deletion of the *NAIP* gene. *Eur. Neurol.* **2004**, *52*, 101–106.

Yong, J.; Golembe, T. J.; Battle, D. J.; Pellizzoni, L.; Dreyfuss, G. snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 2747–2756.

Young, P. J.; Le, T. T.; thi Man, N.; Burghes, A. H. M.; Morris, G. E. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp. Cell Res.* **2000a**, *256*, 365–374.

Young, P. J.; thi Man, N.; Lorson, C. L.; Le, T. T.; Androphy, E. J.; Burghes, A. H. M.; Morris, G. E. The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum. Mol. Genet.* **2000b**, *9*, 2869–2877.

Zhang, H.; Xing, L.; Rossoll, W.; Wichterle, H.; Singer, R. H.; Bassell, G. J. Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 8622–8632.

Zhang, H. L.; Singer, R. H.; Bassell, G. J. Neurotrophin regulation of β -actin mRNA and protein localization within growth cones. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 59–70.

Zhang, H. L.; Eom, T.; Oleynikov, Y.; Shenoy, S. M.; Liebelt, D. A.; Dichtenberg, J. B.; Singer, R. H.; Bassell, G. J. Neurotrophin-induced transport of a β -actin mRNP complex increases β -actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **2001**, *31*, 261–275.

Zhang, H. L.; Pan, F.; Hong, D.; Shenoy, S. M.; Singer, R. H.; Bassell, G. J. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 6627–6637.

Zhang, W.; Benson, D. L. Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 5169–5181.

Danksagung

Diese Arbeit hätte nicht ohne die wissenschaftliche sowie persönliche Unterstützung zahlreicher Personen gelingen können.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. med. Michael Sendtner für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Förderung.

Im Labor hatte ich die Möglichkeit, eine Vielzahl an Techniken kennen zu lernen und in meinem Projekt die Arbeitsschritte von der Präparation der Maus, über die Motoneuronzellkultur bis zur Anfertigung der Färbungen und Auswertungen zu erlernen und eigenständig durchzuführen.

In besonderem Maße möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sibylle Jablonka danken, die diese Arbeit mit viel Engagement und Interesse betreut hat. Sie hatte stets ein offenes Ohr und nahm sich Zeit für Fragen und Diskussionen. Herzlichen Dank für ihre Unterstützung.

Für die Betreuung der Mauslinie danke ich Frau Dr. med. vet. Bettina Holtmann.

Für die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Gespräche sowie für die harmonische Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen des Instituts bedanken, vor allem bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Stefan Wiese, Herrn Dr. rer. nat. Wilfried Rossoll, Frau Dr. med. Katja von Au und Frau Ph.D. Catia Andreassi. Durch die Hilfsbereitschaft und das gute Zusammenwirken aller Labormitglieder war die Arbeitsatmosphäre im Labor stets sehr angenehm.

Ein großes, herzliches Dankeschön geht an Christine Schneider. Von ihr lernte ich alle Handgriffe im Labor, vor allem die Motoneuronzellkultur mit allem, was dazugehört.

Abschließend möchte ich den Menschen herzlich danken, die mich auf meinem Weg stets unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie Friedrich Köth und Jürgen Daif.