

Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner

**Zyklisches AMP kompensiert morphologische und funktionelle
Defekte in isolierten Smn-defizienten Motoneuronen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Christine Rita Mayer
aus Schöllkrippen

Würzburg, Oktober 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sibylle Jablonka

Koreferent: Prof. Dr. med. Michael Sendtner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 9.03.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

1 Einleitung	1
1.1 Motoneuronerkrankungen.....	1
1.2 Die spinale Muskelatrophie	1
1.2.1 Klinische Symptomatik, Verlauf und Prognose.....	1
1.3. Das SMN-Protein	7
1.3.1 Aufbau und Verteilung des SMN-Proteins.....	7
1.3.2 Der SMN-Komplex	10
1.3.3 Beteiligung an der Biogenese der spleißosomalen snRNPs	14
1.4. Mausmodelle für SMA.....	18
1.5 Molekularbiologische Grundlagen.....	22
1.5.1 SMN-Interaktionspartner hnRNP R	22
1.5.2 Zytoskelettprotein β -Aktin	24
1.5.3 Interaktion von Laminin- β 2 mit spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen	27
1.5.4 Stimulation der SMN-Gentranskription durch zyklisches AMP (cAMP)	31
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	34
3 Material	36
3.1 Technische Geräte.....	36
3.2 Mausmodell $Smn^{-/-};SMN2$	36
3.3 Motoneuronzellkultur.....	36
3.3.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Chemikalien	36
3.4 Immunzytochemie	37
3.4.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Chemikalien	37
3.4.2 Antikörper und Farbstoff.....	38
3.5 PCR, RT-PCR und Gelelektrophorese	39
3.5.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Reagenzien	39
3.5.2 Molekulargewichtstandards für doppelsträngige DNA.....	40
3.5.3 Oligonukleotidsequenzen.....	40
3.6 RNA- und DNA-Isolierung.....	41

3.6.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Reagenzien	41
4 Methoden	42
4.1 Motoneuronzellkultur	42
4.2 Immunzytochemie der Motoneurone	43
4.3 DNA-Isolierung	44
4.4 RNA-Isolierung	45
4.5 PCR zur Genotypisierung	45
4.6 RT-PCR	47
4.7 Gelelektrophorese	48
4.8 Datenanalyse	49
5 Ergebnisse	50
5.1 Effekte von 8-CPT-cAMP auf <i>Smn/SMN</i> und <i>SMN2</i>	50
5.1.1 Bestimmung der Transkriptionsrate von <i>Smn</i> und <i>SMN2</i>	50
5.1.2 Verteilung von <i>Smn/SMN</i> -Protein in Motoneuronen	52
5.2 Effekte von 8-CPT-cAMP auf untersuchte Zellkompartimente kultivierter Motoneurone	55
5.2.1 Größenbestimmung von Wachstumskegeln	55
5.2.2 Verteilung von β -Aktin in Motoneuronen	59
5.2.3 Vergleich der Verteilung von N-Typ Kalzium-Kanälen und β -Aktin	64
5.2.4 Bestimmung der Transkriptionsrate von β -Aktin und $Ca_v2.2$	71
5.3 Effekte von 8-CPT-cAMP auf das Axonwachstum	72
5.3.1 Längenmessung von Axonen	72
5.4 Vergleich der Verteilung von hnRNP R und <i>Smn/SMN</i> -Protein	75
6 Diskussion	83
6.1 Erhöhung der <i>Smn/SMN2</i> -Transkription und <i>Smn/SMN</i> -Proteinmenge ...	85
6.1.1 <i>Smn</i> - und <i>SMN2</i> -Transkription	85
6.1.2 <i>Smn/SMN</i> -Proteingehalt	86

6.2 Veränderung von Morphologie und Funktion Smn-defizienter Motoneurone unter Behandlung mit cAMP	87
6.2.1 Vergrößerung der Fläche von Wachstumskegeln und Anreicherung von β -Aktin.....	87
6.2.2 Akkumulation von N-Typ Kalzium-Kanälen	90
6.2.3 Unveränderte Transkription von β -Aktin und $Ca_v2.2$	92
6.2.4 Normalisierung des axonalen Längenwachstums	92
6.2.5 Erhöhte Kolo­kalisierung von hnRNP R und Smn/SMN.....	95
6.2.5 Isolierte Smn-defiziente Motoneurone als <i>in vitro</i> Assay für einen Substanz-Screen	97
7 Zusammenfassung	99
8 Literaturverzeichnis.....	101

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMP	Adenosinmonophosphat
ATF-1	activating transcription factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca _v	Poren-formende Untereinheit der VGCCs
Ca _v 2.1	P/Q-Typ VGCC
Ca _v 2.2	N-Typ VGCC
cDNA	copy deoxyribonucleic acid, copy Desoxyribonukleinsäure
CNTF	ciliary neurotrophic factor
8-CPT-cAMP	8-Chlorophenylthio-cAMP
CRE	cAMP-response element
CREB	CRE-binding protein
CREM	CRE modulator
CTP	Cytidintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxynucleoside triphosphate, Desoxynukleosidtriphosphat
E#	embryonaler Entwicklungstag
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ef	Elongationsfaktor
ESE	exonic splice enhancer
<i>Gemin2</i> ^{+/-}	heterozygoter <i>Gemin2</i> -Knockout
Gems	gemini of coiled bodies/Cajal bodies
GIP1	Gemin3 interacting protein 1
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HeLa	Helene Lange

HDAC	Histondeacetylase
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>Laminin</i> $\beta 2^{-/-}$	homozygoter <i>Laminin</i> $\beta 2$ -Knockout
LRE	Leucin-Arginin-Glutamat
Lsm	Sm like
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NSCs	neurosphärenbildende kortikale Vorläuferzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RGG	Arginin-Glycin-Glycin
PKA	Proteinkinase A
pICln	chloride conductance regulatory protein, Chlorid-Leitfähigkeit regulierendes Protein
PRMT5	protein arginine methyltransferase 5, Protein Arginin Methyltransferase 5
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SIP-1	SMN interacting protein 1
Sm-Proteine	Smith-Antigen Proteine
SMA	spinale Muskelatrophie
SMARD	spinal muscular atrophy with respiratory distress
SMN	survival of motor neuron
<i>Smn</i> ^{+/+}	<i>Smn</i> -Wildtyp
<i>Smn</i> ^{+/+} ;SMN2	<i>Smn</i> -Wildtyp, transgen für humanes SMN2
<i>Smn</i> ^{+/-}	heterozygoter <i>Smn</i> -Knockout
<i>Smn</i> ^{-/-}	homozygoter <i>Smn</i> -Knockout
<i>Smn</i> ^{-/-} ;SMN2	homozygoter <i>Smn</i> -Knockout, transgen für humanes SMN2

snRNA	small nuclear ribonucleic acid
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SYNCRIP	Synaptogamin bindendes Protein
TBS-T	TRIS-buffered Saline with Tween
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
UNR	upstream of N-ras
unrip	UNR interacting protein
U snRNA	uridine-rich small nuclear ribonucleic acid
U snRNP	uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein
UTR	untranslatierte Region
VGCCs	voltage gated calcium channels, spannungsabhängige Kalzium-Kanäle
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Motoneuronerkrankungen

Unter degenerativen Motoneuronerkrankungen versteht man eine heterogene Gruppe von neurologischen Krankheiten, welche durch den Verlust von motorischen Nervenzellen gekennzeichnet ist. Diese Erkrankungen zeigen einen chronischen Verlauf und sind von äußeren Faktoren kaum beeinflussbar (Poeck, Hacke, Neurologie, 2001). Von der Degeneration können das 1. Motoneuron, das 2. Motoneuron oder beide Systeme in Kombination betroffen sein. Die Pyramidenzellen des motorischen Kortex und die Pyramidenbahn bilden das 1. Motoneuron, während sich das 2. Motoneuron aus den motorischen Vorderhornzellen oder den Hirnnervenkernen mit motorischem Nerv und davon versorgten Muskeln zusammensetzt. Ein Beispiel für die Degeneration des 1. Motoneurons stellt die spastische Spinalparalyse dar, in deren Verlauf es zu spastischen Kontrakturen kommt. Weitere Vertreter der Gruppe der motoneuronalen Systemkrankheiten, bei denen das 2. Motoneuron betroffen ist, sind die spinale Muskelatrophie (SMA) und die progressive Bulbärparalyse. Als Beispiel für eine Degeneration beider Motoneuronsysteme wäre die unaufhaltsam zum Tode führende amyotrophische Lateralsklerose (ALS) zu nennen.

1.2 Die spinale Muskelatrophie

1.2.1 Klinische Symptomatik, Verlauf und Prognose

Spinale Muskelatrophien (SMA) stellen eine heterogene Krankheitsgruppe dar, die durch einen fortschreitenden, degenerativen Untergang der motorischen Vorderhornzellen in der grauen Substanz des Rückenmarks gekennzeichnet sind (Hacke, Poeck, Neurologie, 2001; Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994). Durch den Verlust dieser α -Motoneurone kommt es zu einer langsam progredienten proximal betonten Muskelschwäche (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994), die im Gegensatz zu anderen Motoneuronerkrankungen, wie beispielsweise der amyotrophen Lateralsklerose, immer symmetrisch auftritt.

Als Leitsymptome der SMA gelten Muskelfaszikulationen, symmetrische Paresen an Gliedern und Rumpf, Muskelatrophien und der Muskelumbau mit vergrößerten motorischen Einheiten (Kunze, Praxis der Neurologie, 1999). Die Patienten zeigen anfangs abgeschwächte Eigenreflexe, die im weiteren Verlauf der Erkrankung erlöschen (Masuhr, Neumann, Neurologie, 1998). Der Muskeltonus ist schlaff, die Nervenleitgeschwindigkeit verlangsamt (Kunze, Praxis der Neurologie, 1999). Skelettanomalien, wie z. B. eine Skoliose oder Hyperlordose sowie Kontrakturen, können sekundär auftreten (Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 1998). Hingegen wurden keine Störungen von vegetativen Funktionen, die beispielsweise Blase- oder Darmentleerung betreffen, beobachtet. Ebenso findet sich keine Beeinträchtigung der Intelligenz bei Patienten mit SMA (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994; Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 1998).

Je nach Krankheitsbeginn, den erreichten motorischen Fähigkeiten und der Schwere des Verlaufs unterscheidet man drei klinische Typen der proximalen spinalen Muskelatrophie mit autosomal-rezessivem Erbgang:

1. SMA Typ I (Werdnig-Hoffmann)

In circa 30% der Fälle zeigen sich bereits intrauterin verminderte Kindsbewegungen (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994; Kunze, Praxis der Neurologie, 1999). Mäßig ausgeprägte Gelenkkontrakturen und Osteoporose können die Folge sein. Durch vermindertes und schwaches Schreien und eine verlängerte Zyanose bei zum Teil rascher Zwerchfellatmung können betroffene Kinder unmittelbar postnatal auffällig werden (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994). Innerhalb der ersten sechs Monate postpartal treten dann bei allen Patienten mit der akuten SMA Typ I Symptome auf. Die Kinder zeigen eine Trinkschwäche und einen Stillstand in der motorischen Entwicklung. Auffällig ist auch die Bewegungsarmut der Säuglinge; Arme und Beine liegen in Abduktionshaltung (sog. „Froschstellung“) und werden nicht angehoben (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994; Kunze, Praxis der Neurologie, 1999). Faszikulationen der Zunge können beobachtet werden, ebenso wie eine verminderte Mimik, und deuten auf Befall der entsprechen-

den Hirnnerven hin. Typisch ist auch die sog. Schaukelatmung, bei der sich das Abdomen bei Inspiration vorwölbt, während der Thorax einsinkt (Poeck, Hacke, Neurologie, 2001). Die betroffenen Kinder sind nicht in der Lage das Sitzen zu erlernen und sterben bereits innerhalb der ersten zwei Lebensjahre an einer durch generalisierte Muskelschwäche bedingten Atemlähmung oder sie erliegen einer Pneumonie, begünstigt durch Aspiration und Atelektasen (Poeck, Hacke, Neurologie, 2001).

2. SMA Typ II (intermediär-chronische Form)

Die Manifestation der Erkrankung erfolgt bei SMA Typ II später als bei Typ I und liegt im Alter zwischen 6 - 24 Monaten (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994). Typ II Patienten können sich aufrichten und erlernen das Sitzen und häufig auch das Krabbeln, während Gehen nicht möglich ist (Kunze, Praxis der Neurologie, 1999). Insgesamt sind die Verläufe sehr unterschiedlich. Betroffene Kinder der intermediär-chronischen Form werden meist älter als zwei Jahre. Allerdings führen auch bei diesem SMA-Typ Lungenkomplikationen häufig zum Tod (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994; Kunze, Praxis der Neurologie, 1999).

3. SMA Typ III (Kugelberg-Welander)

Die mildeste Form der proximalen spinalen Muskelatrophie stellt der Typ III dar. Das Manifestationsalter liegt zwischen zwei und 17 Jahren (Poeck, Hacke, Neurologie, 2001). Nach zunächst normaler motorischer Entwicklung kommt es bei den betroffenen Kindern zu einer proximalen Schwäche in den Beinen. Dies führt zuerst zu Schwierigkeiten beim Treppensteigen und beim Aufstehen, später kommt es gehäuft zu Stürzen (Kunze, Praxis der Neurologie, 1999; Poeck, Hacke, Neurologie, 2001). Betroffene Patienten können Sitzen und Gehen, sind allerdings im weiteren Verlauf der Erkrankung in der Regel auf den Rollstuhl angewiesen. Im Jugendalter kommt es häufig zu Pseudohypertrophien (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994). Der Krankheitsverlauf gestaltet sich variabel, so dass teilweise eine annähernd normale Lebenserwartung erreicht wird (Munsat und Davies, 1992; Frugier et al., 2002).

1.2.2. Genetik der spinalen Muskelatrophie

Die proximale spinale Muskelatrophie wird autosomal rezessiv vererbt und tritt mit einer geschätzten Inzidenz von etwa 1:6.000 - 1:10.000 auf (Roberts, 1970; Pearn, 1973; Pearn 1978; Czeizel und Hamula, 1989). Damit stellt die spinale Muskelatrophie neben der zystischen Fibrose eine der häufigsten Erbkrankheiten mit Todesfolge bei Kindern dar (Pearn 1978; Crawford, 1996). Seltener ist der autosomal dominante Erbgang mit circa 2 - 3% unter Einschluss der fazio-skapulohumeralen und skapuloperonealen Formen (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994). Der X-chromosomal rezessive Erbgang macht weniger als 1% aus. Daneben finden sich noch die distalen spinalen Muskelatrophien (Mortier, Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter, 1994) und die spinale Muskelatrophie mit respiratorischen Problemen (SMARD), die sich klinisch und genetisch von der klassischen proximalen SMA unterscheidet (Grohmann et al., 2001).

Lefebvre und Kollegen identifizierten 1995 das sogenannte *survival motor neuron gene* (SMN-Gen) auf Chromosom 5q13 als krankheitsverursachendes Gen der autosomal-rezessiven spinalen Muskelatrophie. Das SMN-Gen liegt beim Menschen mit drei weiteren Genen – dem H4F5-Gen und den Genen kodierend für NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) und p44 – im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen innerhalb einer 500 kb großen, invertiert-duplizierten Region (Lefebvre et al., 1995; Roy et al., 1995; Bürglen et al., 1997; Scharf et al., 1998). Durch die Duplikation des chromosomalen Abschnitts existiert das SMN-Gen im menschlichen Genom in zwei Kopien: das telomer gelegene SMN1-Gen und das zentromer lokalisierte SMN2-Gen (Lefebvre et al., 1995). Beide SMN-Gene bestehen aus neun Exonen (Exon 1, 2a, 2b und 3-8) und acht Intronen, umfassen 20 kb und unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz lediglich in fünf Nukleotiden (Bürglen et al., 1996).

Für die Entstehung der spinalen Muskelatrophie ist der Einzelbasenpaar-austausch von Cytosin zu Thymin im kodierenden Bereich von Exon 7 des SMN2-Gens relevant, welcher durch Unterbrechung eines so genannten *exonic splicing enhancers* (ESE) ein verändertes Spleiß-Verhalten bewirkt und bei 90% der SMN2-Transkripte zu einem Verlust der Exon 7-kodierten Regionen führt

(Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999). Somit wird durch alternatives Spleißen von *SMN2* ein verkürztes Genprodukt (*SMN Δ Ex7*) gebildet, wohingegen von *SMN1* fast ausschließlich ein Transkript voller Länge entsteht (Lefebvre et al., 1995). Während das *SMN1*-Transkript zu nahezu 100% in intaktes volllängiges SMN-Protein übersetzt wird, beträgt der Anteil an funktionsfähigem SMN-Protein, welches vom *SMN2*-Transkript produziert wird, nur etwa 10%. Das von *SMN2* also hauptsächlich translatierte Protein ist im Vergleich zum volllängigen Protein am C-Terminus verkürzt, instabiler und weist eine reduzierte Selbst-Oligomerisierungsaktivität auf (Lorson et al., 1999; Lorson und Androphy, 2000). Abbildung 1 zeigt die molekulare Grundlage der spinalen Muskelatrophie: Transkription und Translation des *SMN1*- und *SMN2*-Gens, sowie resultierende Proteinmengen.

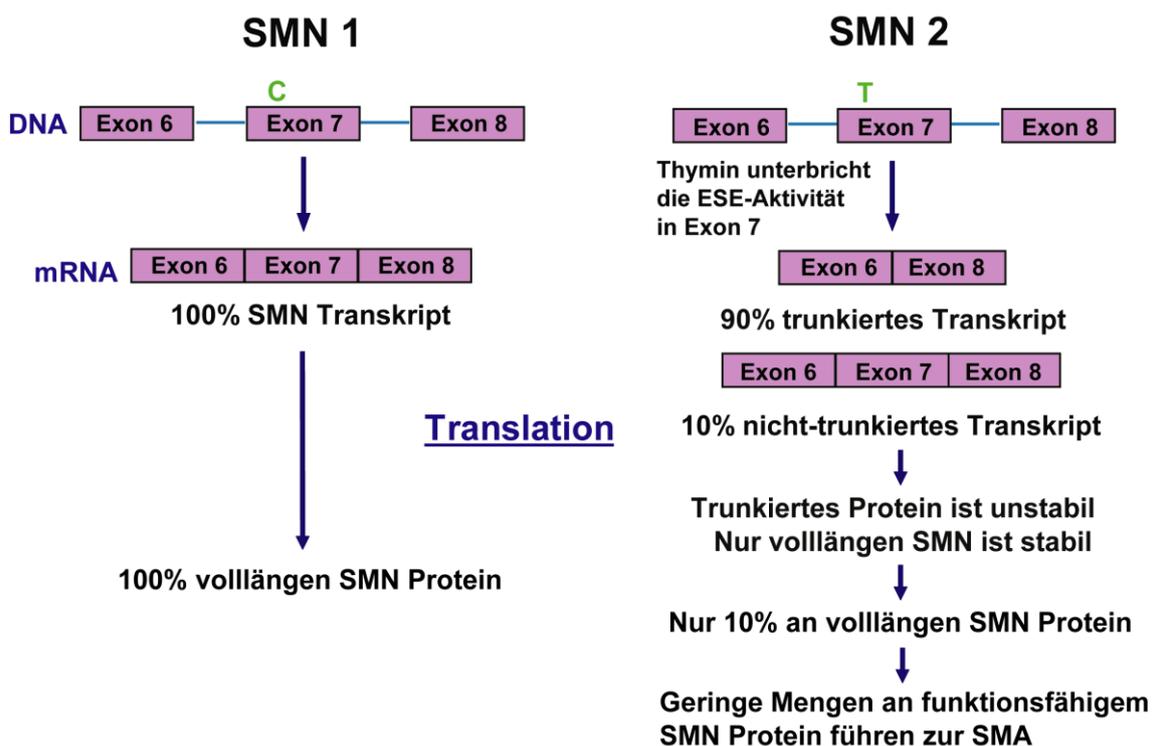


Abbildung 1. *SMN1* wird hauptsächlich in die intakte Form (6-7-8) übersetzt. Bei *SMN2* wird aufgrund einer Punktmutation (Cytosin wird zu Thymin) vor allem eine verkürzte Form, der das Exon 7 fehlt (6-8), gebildet. Die Instabilität des truntierten Proteins und die geringen Mengen an intaktem Protein führen zu einer verminderten Menge an SMN bei Patienten mit SMA (nach Monani et al., 2000b).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass bei etwa 94% der SMA-Patienten eine homozygote Deletion von Exon 7 oder der Exone 7 und 8 des *SMN1*-Gens

vorliegt (Lefebvre et al., 1995; Hahnen et al., 1995; Wirth et al., 1999), wohingegen der homozygote Verlust des *SMN2*-Gens in 3 - 5% der Kontrollpersonen zu keinem klinischen Phänotyp führt (Lefebvre et al., 1995). Andere Mutationen des *SMN1*-Gens, wie Mikrodeletionen und -insertionen oder Punktmutationen, wurden nur bei wenigen Patienten beobachtet (Brahe et al., 1996; Wirth et al., 1999; Wirth et al., 2000). Neben Mutationen als Ursache für die spinale Muskelatrophie wurde die Genkonversion von *SMN1* in *SMN2* als ein weiterer Mechanismus für die Abwesenheit des *SMN1*-Gens verantwortlich gemacht, der vor allem Typ II und Typ III SMA-Patienten betrifft (Wirth et al., 1997; Wirth et al., 1999). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die proximale spinale Muskelatrophie in der Mehrzahl der Fälle durch den Verlust des *SMN1*-Gens verursacht wird, welcher nicht durch das vorhandene intakte *SMN2*-Gen ausgeglichen werden kann (Lefebvre et al., 1995).

Die *SMN2*-Kopienzahl variiert in der Bevölkerung. Bei Patienten mit spinaler Muskelatrophie modifiziert diese Variation den klinischen Schweregrad der Erkrankung (Parsons et al., 1998). So zeigen Patienten mit hoher *SMN2*-Kopienzahl einen schwächer ausgeprägten Phänotyp als Patienten mit nur ein oder zwei Kopien (Feldkötter et al., 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in isolierten Zellen von Patienten mit spinaler Muskelatrophie und im Gewebe von SMA-Mäusen nachweisen, dass eine gesteigerte *SMN2*-Kopienzahl zu einer vermehrten Produktion von volllängen SMN-Transkript und -Protein führt (Lefebvre et al., 1997; Coover et al., 1997; Gavrillov et al., 1998). Die direkte Korrelation zwischen der Höhe der SMN-Expression und der Schwere des Phänotyps beweist, dass die spinale Muskelatrophie durch einen klassischen Gendosis-Effekt bedingt ist (Campbell et al., 1997; Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; Monani et al., 2000a). Denn je weniger SMN-Protein gebildet wird, desto früher setzt die Krankheit ein und desto stärker ist die phänotypische Ausprägung.

1.3. Das SMN-Protein

1.3.1 Aufbau und Verteilung des SMN-Proteins

Das SMN-Protein, bestehend aus 294 Aminosäureeinheiten und einem Molekulargewicht von 38 Kilodalton (kDa), wird ubiquitär exprimiert und zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen (Liu und Dreyfuss, 1996; Nicole et al., 2002). SMN ist essentiell für die Lebensfähigkeit aller eukaryontischer Organismen und getesteter Zelltypen, einschließlich Mensch, Maus, Hühnchen DT40 Zellen, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Schizosaccharomyces pompe* (Schrank et al., 1997; Miguel-Aliaga et al., 1999; Hannus et al., 2000; Miguel-Aliaga et al., 2000; Owen et al., 2000; Paushkin et al., 2000; Wang und Dreyfuss 2001).

Im C-terminalen Bereich des SMN-Proteins befindet sich die vom Exon 6 kodierte Selbst-Oligomerisations-Zone, die zahlreiche Tyrosin-Glycin(Y-G)-Paare beinhaltet (Lorson et al., 1998). Daneben enthält SMN eine zentrale, im Exon 3 gelegene, evolutionär hochkonservierte Tudor-Domäne, die 53 Aminosäuren umfasst und für die Interaktion von SMN mit den Sm-Proteinen von Bedeutung ist (Bühler et al., 1999). Außerdem enthält das SMN-Protein eine vom Exon 2 kodierte, lysinreiche Region und eine Polyprolin-Region, die durch Exon 4 und 5 kodiert wird (zusammengefasst in Sumner, 2007). Weitere Bindungsstellen und eine schematische Darstellung des SMN-Proteins zeigt Abbildung 2.

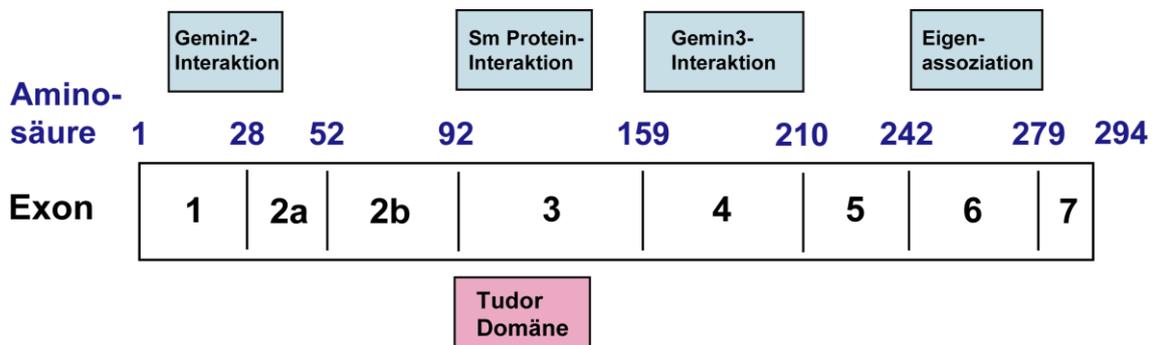


Abbildung 2. Schematische Darstellung des aus 294 Aminosäuren bestehenden SMN-Proteins mit den kodierenden Exonen und der relativen Lage ausgesuchter Domänen, in denen das SMN-Protein eine Interaktion eingeht (nach Briese et al., 2005).

Innerhalb einer Zelle findet sich SMN sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Liu und Dreyfuss, 1996; Jablonka et al., 2000b). Die Verteilung von SMN im Zytoplasma erscheint in allen untersuchten Zellen, ausgenommen den Muskelzellen – in denen große zytoplasmatische Aggregate beschrieben wurden – eher diffus (Liu und Dreyfuss, 1996; Burlet et al., 1998). Im Zellkern hingegen konzentriert sich das SMN-Protein in punktförmigen Strukturen, den so genannten Gems, für „Gemini of coiled bodies“ (Liu und Dreyfuss, 1996). Gems sind etwa 0,1 - 1 µm groß und den Cajal Bodies (coiled bodies) benachbart oder überlappen mit ihnen (Liu und Dreyfuss, 1996; Liu et al., 1997). Coiled bodies wurden 1903 als akzessorische Strukturen des Nucleolus von Ramón y Cajal beschrieben. Die Bezeichnung coiled bodies wurde in jüngster Zeit durch den Begriff Cajal Bodies ersetzt (Gall et al., 1999). Cajal Bodies enthalten verschiedene Komponenten der Transkriptions- und RNA-Prozessierungsmaschinerie, inklusive hohe Konzentrationen von U snRNPs (uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins), und scheinen eine Rolle in deren Assemblierung oder Reifung zu spielen (Gall, 2003; Matera, 2003). Da Gems direkt mit den Cajal Bodies zu interagieren scheinen, ist es möglich, dass diese Strukturen ebenfalls an der RNA-Prozessierung beteiligt sind (Liu und Dreyfuss, 1996). Covert und Kollegen konnten 1997 nachweisen, dass die Anzahl von Gems im Zellkern eng mit dem Phänotyp der SMA-Patienten korreliert: Typ I Patienten zeigen 3 - 8 Gems/100 Zellkerne, Typ II Patienten 15 - 29 Gems/100 Zellkerne und bei Typ III Patienten finden sich 30 Gems/100 Zellkerne. Im Vergleich dazu besitzen gesunde Kontrollpersonen etwa 113 Gems/100 Zellkerne. Außer in den Gems findet sich SMN auch direkt in den Cajal Bodies von kultivierten Zellen und primären Neuronen (Carvalho et al., 1999). Durch Depletion von SMN in HeLa-Zellen wird der Aufbau der Cajal Bodies gestört (Girard et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Carvalho konnte zudem beobachten, dass SMN in Cajal Bodies mit snRNPs kolokalisiert und Gems nur in einem geringen (< 15%) Anteil kultivierter Zellen zu finden sind. In der Mehrzahl der untersuchten Zellen, inklusive direkt aus dem Organismus entnommener Neurone, präsentierte sich das SMN-Protein nur in den Cajal Bodies, während keine Gems identifiziert werden konnten (Carvalho et al., 1999).

Je nach Gewebe erfolgt die SMN-Expression in unterschiedlichen Mengen (Coover et al., 1997; Burlet et al., 1998), wobei man den höchsten Gehalt an SMN im embryonalen Rückenmark findet (Jablonka et al., 2000a). Zudem ergab die Untersuchung der SMN-Expression in verschiedenen humanen Geweben (Skelettmuskel, Herz, Niere und Gehirn) während der normalen fetalen und postnatalen Entwicklung einen deutlichen Rückgang der SMN-Proteinmenge nach der Geburt (Burlet et al., 1998). Interessant ist auch, dass sich die intrazelluläre Verteilung des SMN-Proteins im Laufe der ZNS-Entwicklung verändert. In frühen Entwicklungsstadien enthält vor allem der Zellkern reichlich SMN. Dieser Befund verschiebt sich im Laufe der Zeit zugunsten starker Anreicherung im Zytoplasma und in Axonen von Motoneuronen (Giavazzi et al., 2006).

Die Menge an SMN ist in allen untersuchten Geweben von Patienten mit SMA reduziert (Burlet et al., 1998; Wirth et al., 2000), wobei Patienten mit spinaler Muskelatrophie vom Typ I geringere Proteinmengen zeigen, als Typ II oder Typ III SMA-Patienten (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; Burlet et al., 1998). Hervorzuheben ist außerdem, dass das Rückenmark mit einer 100-fachen Reduktion bei Typ I SMA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen besonders betroffen ist, während die SMN-Menge in Lymphoblasten und Muskelgewebe nur moderat vermindert ist (Coover et al., 1997).

Die verschiedenen Studien zeigen somit, dass der Verlust des SMN-Proteins in allen untersuchten Geweben von Patienten mit spinaler Muskelatrophie nachweisbar ist. Dennoch entwickeln erkrankte Personen neben der Motoneurondegeneration und den bei Typ I SMA-Patienten beschriebenen sensorischen Defekten (Rudnick-Schöneborn et al., 2003; Jablonka et al., 2006) keine weiteren Organdefekte. Um die Motoneuronspezifität der Erkrankung zu klären, wurde daher die Verteilung von SMN in Motoneuronen genauer untersucht. Der Verlust von SMN im Rückenmark scheint besonders Motoneurone zu betreffen, die im Normalfall größere Mengen an SMN enthalten (Battaglia et al., 1997; Coover et al., 1997). Béchade und Kollegen (1999) konnten durch die Untersuchung der intrazellulären Verteilung des SMN-Proteins im ZNS der Ratte erstmals nachweisen, dass SMN im proximalen Abschnitt von Dendriten lokalisiert

ist und dort mit Mikrotubuli assoziiert. Ein Jahr später ergaben auch die Experimente einer anderen Arbeitsgruppe eine Assoziation des SMN-Proteins mit Elementen des Zytoskeletts in spinalen Dendriten und Axonen, besonders während der frühen postnatalen Entwicklung (Pagliardini et al., 2000). Die Entdeckung von SMN im axonalen Kompartiment führte zu der Annahme, dass das Protein aktiv transportiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine neuere Studie, die granuläre Ansammlungen von SMN in den Axonen von Motoneuronen zeigt, und zudem nachweisen konnte, dass der Transport des SMN-Proteins über längere Strecken Mikrotubuli-abhängig ist, während für kurze Strecken intaktes Mikrofilament benötigt wird (Zhang et al., 2003). SMN wird außerdem auch in den Wachstumskegeln von Motoneuronen gefunden (Rossoll et al., 2003a). Die in den Axonen und Dendriten kultivierter Motoneurone entdeckten SMN-Granula kolokalisieren teilweise mit Gemin-Proteinen, aber nicht mit spleißosomalen Sm-Proteinen (Zhang et al., 2006).

In den beiden folgenden Kapiteln werden die Bindungspartner des SMN-Proteins und seine Beteiligung an der Biogenese der spleißosomalen snRNPs dargestellt.

1.3.2 Der SMN-Komplex

Das SMN-Protein ist die zentrale Komponente eines großen Multiproteinkomplexes, dem sogenannten SMN-Komplex (Meister et al., 2002; Gubitzi et al., 2004). Durch Studien von mehreren Arbeitsgruppen konnten diesem Komplex in den letzten Jahren verschiedene Proteine zugeordnet werden, die direkt oder indirekt mit SMN interagieren. Einige wichtige Mitglieder dieses Komplexes werden im Folgenden dargestellt.

Bereits 1996 konnten Liu und Dreyfuss zeigen, dass SMN unter anderem mit sich selbst, mit der RGG-reichen Region von hnRNP U, mit Fibrillarin und einigen neuen Proteinen Bindungen eingeht. Ein Jahr später gelang es dieser Arbeitsgruppe das SMN Interacting Protein 1 (SIP-1) als ersten Interaktionspartner des SMN-Komplexes *in vitro* und *in vivo* zu identifizieren (Liu et al., 1997). Als sich später herausstellte, dass der Komplex weitere assoziierte Proteine umfasst, wurde SIP-1 in Gemin2 umbenannt. Es folgte die Identifizierung von

Gemin3, alias putative DEAD box helicase/dp103 (Charroux et al., 1999; Campbell et al., 2000) und Gemin4, alias GIP1 (Charroux et al., 2000; Meister et al., 2000). Weitere Mitglieder des SMN-Komplexes sind Gemin5/p175 (Gubitza et al., 2002), Gemin6 (Pellizzoni et al., 2002a) und Gemin7 (Baccon et al., 2002). Zuletzt wurde Gemin8 (Carissimi et al., 2006) charakterisiert.

Gemin2 bindet an das aminoternale Ende des SMN-Proteins und ist in den verschiedenen Geweben ähnlich verteilt wie SMN (Liu et al., 1997; Young et al., 2000b; Jablonka et al., 2001). Interessant ist die Beobachtung, dass bei heterozygoten Mäusen, denen ein *Smn*-Allel fehlt, das Rückenmark etwa 50% weniger Gemin2 enthält als das von Kontrolltieren (Jablonka et al., 2001). Dieser Befund deckt sich mit dem für *Smn* und impliziert eine Koregulation der beiden Proteine. Im Zellkörper von kultivierten Mausmotoneuronen findet sich eine strikte Kolo-kalisation von SMN und Gemin2 in den Nucleoli des Zellkerns und im Zytoplasma, während die beiden Proteine in den Axonen der kultivierten Nervenzellen nicht kolo-kalisieren (Jablonka et al., 2001). Hingegen fanden Sharma und Kollegen (2005) eine stetige Kolo-kalisation von SMN und Gemin-Proteinen (Gemin2/SIP-1, Gemin6 und Gemin7) in den Axonen von Nervenzellen. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine Studie von Zhang et al. (2006), die in Nervenzellfortsätzen eine Kolo-kalisation von SMN und Gemin2 in granulären Anreicherungen zeigt. Daneben entdeckte die Arbeitsgruppe aber auch größere Mengen der beiden Proteine, die im Axon unabhängig voneinander verteilt vorkommen. Die Assoziation von Gemin2 mit SMN scheint Gemin2 zu stabilisieren (Zhang et al., 2006). Eine neuere Studie zeigt außerdem, dass SMN mit Gemin2 einen Komplex bildet, der keine anderen Gemin-Proteine enthält (Battle et al., 2007). Dies führt zu der Vermutung, dass die Verbindung SMN-Gemin2 die kleinstmögliche Untereinheit des SMN-Komplexes darstellt und so den stabilen Kern des Komplexes bildet.

Gemin3, eine putative RNA-Helikase, interagiert direkt mit SMN, indem es einen stabilen Komplex mit dem Protein *in vivo* und *in vitro* bildet (Charroux et al., 1999; Campbell et al., 2000). Interessanterweise ist diese Interaktion bei mutiertem SMN Δ Ex7, wie es in SMA-Patienten vorkommt, schwer gestört. Zudem kolo-kalisiert Gemin3 mit SMN in den Nucleoli von HeLa-Zellen und interagiert au-

ßerdem mit den Sm-Proteinen SmB/B' und SmD₂₋₃ (Charroux et al., 1999). Gemin4 kolokalisiert mit SMN in den Gems und im Zytoplasma und findet sich außerdem auch in den Nucleoli des Zellkerns, wo es an der Biogenese von Ribosomen beteiligt sein könnte (Charroux et al., 2000). Die Assoziation dieses Gemin-Proteins an den SMN-Komplex ist nicht direkt, sondern erfolgt *in vivo* über die Bindung an Gemin3. Zudem interagiert Gemin4, wie auch Gemin5, mit SmB/B', SmD₁₋₃ und SmE (Charroux et al., 2000; Gubitzi et al., 2002). Daneben scheint Gemin4 eine funktionelle Rolle im nukleären Import der U snRNPs zu übernehmen (Lorson et al., 2008). Ein Teil von Gemin5 befindet sich im Zytoplasma von Zellen unabhängig vom SMN-Komplex und bindet snRNAs in sehr frühen Stadien der snRNP-Assemblierung (Battle et al., 2007; Hao et al., 2007). Gemin6 interagiert vor allem mit SmD₂ und SmE, aber auch mit SmD₁ und SmD₃ (Pellizzoni et al., 2002a). Gemin7 assoziiert mit dem SMN-Komplex *in vivo* und kolokalisiert mit SMN in den Gems (Baccon et al., 2002). Es interagiert direkt mit Gemin6 und SMN *in vitro* und stellt so die Brücke zur Interaktion von Gemin6 mit SMN dar, die ohne Gemin7 nicht stattfinden kann (Baccon et al., 2002). Außerdem interagiert Gemin7 stark mit SmE und in geringerem Ausmaß mit SmB/B', SmD₂ und SmD₃ (Baccon et al., 2002). Das zuletzt charakterisierte Gemin8 wird ubiquitär exprimiert, assoziiert ebenfalls mit dem SMN-Komplex und ist im Zytoplasma und in hoher Konzentration in den Gems des Zellkerns lokalisiert (Carissimi et al., 2006). Es interagiert direkt mit dem Gemin6-Gemin7 Heterodimer und mit Sm-Proteinen. Unrip (für UNR interacting protein), ein Protein welches den cap-unabhängigen Translationsfaktor UNR bindet, assoziiert nur im Zytoplasma mit dem SMN-Komplex über die Bindung an Gemin6-Gemin7 (Carissimi et al., 2005; Grimmer et al., 2005; Carissimi et al., 2006). Hao und Kollegen (2007) konnten allerdings einen geringen Anteil an unrip in den Gems/Cajal Bodies von SMN-überexprimierenden HeLa-Zellen nachweisen. In Abbildung 3 sind die beschriebenen Komponenten des SMN-Komplexes zusammenfassend dargestellt.

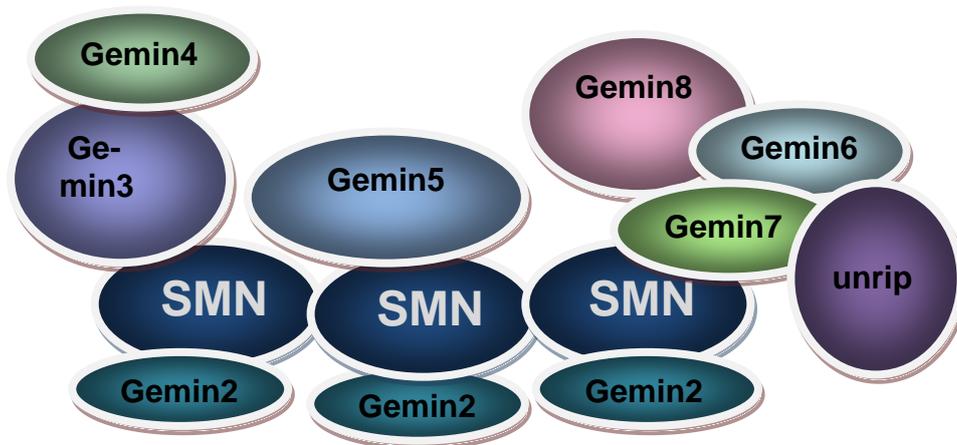


Abbildung 3. Schematische Darstellung des SMN-Komplexes mit den bekannten Komponenten (nach Carissimi et al., 2006). SMN interagiert direkt mit Gemin2, Gemin3, Gemin5 und Gemin7 (Liu et al., 1997; Charroux et al., 1999; Gubitzi et al., 2002), während Gemin4 über Gemin3 an den Komplex bindet (Charroux et al., 2000). Ebenso wird für die Interaktion von Gemin6 mit dem SMN-Komplex Gemin7 benötigt (Baccon et al., 2002). Gemin8 bindet über Gemin6-Gemin7 an den Multiproteinkomplex (Carissimi et al., 2006).

Die endgültige Zusammensetzung des SMN-Komplexes scheint allerdings noch nicht vollständig geklärt. Ein Jahr nach der Studie von der Arbeitsgruppe um Carissimi vermuten Otter und Kollegen (2007), dass SMN direkt nur mit Gemin2, Gemin3 und Gemin8 interagiert, während der Subkomplex Gemin6-Gemin7 über Gemin8, unrip über Gemin7, Gemin5 über Gemin2 und Gemin4 über Gemin3 und Gemin8 an den SMN-Komplex bindet. Ogawa und Mitarbeiter konnten 2009 zeigen, dass Gemin2 und Gemin7 direkt interagieren und dieses Zusammenspiel die Verbindung von SMN und Gemin7 stabilisiert. Zudem konnte die Arbeitsgruppe beobachten, dass unrip das Gemin6-Gemin7-Heterodimer vom SMN-Komplex abtrennen kann.

Daneben wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die direkt mit SMN und/oder den Geminis interagieren, aber nicht integrale Komponente des SMN-Komplexes sind. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die Sm- und Lsm-Proteine der spleißosomalen snRNPs (Liu et al., 1997; Bühler et al., 1999; Pellizzoni et al., 1999; Friesen und Dreyfuss, 2000), die small nucleolar RNP Proteine Fibrillarin und GAR1 (Jones et al., 2001; Pellizzoni et al., 2001a), die RNA Helikase A (Pellizzoni et al., 2001b) und hnRNP Q (Mourelatos et al.,

2001; Rossoll et al., 2002), hnRNP U (Liu und Dreyfuss, 1996) und hnRNP R (Rossoll et al., 2002).

1.3.3 Beteiligung an der Biogenese der spleißosomalen snRNPs

Die posttranskriptionale Prozessierung der prä-mRNA zur reifen mRNA ist ein wichtiger Schritt bei der Genexpression. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt der ausschließlich im Zellkern stattfindende Spleißvorgang, welcher durch einen komplexen Apparat, dem sogenannten Spleißosom, geregelt wird. Durch das Spleißen werden die nicht-kodierenden Introns aus der prä-mRNA entfernt und die aus Protein-kodierenden Abschnitten bestehenden Exons miteinander verbunden. Hauptbestandteile des Spleißosoms sind die U snRNPs (uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins) (Will und Lührmann, 2001; Nilsen, 2003). Neben ein oder zwei small nuclear RNAs (snRNA U1, U2, U4/U6 und U5) enthält jedes snRNP sieben Sm-Proteine (B/B', D₁₋₃, E, F und G). Die Sm-Proteine sind als heptamerer Ring an die snRNAs gebunden (Raker et al., 1996). Zusammen mit der jeweiligen snRNA bilden sie den so genannten Sm-core aus und stellen so das strukturelle Grundgerüst der spleißosomalen snRNPs dar.

Eine im Detail untersuchte Funktion von SMN ist die direkte Beteiligung an der Assemblierung der spleißosomalen U snRNPs U1, U2, U4/U6 und U5 im Zytoplasma (Fischer et al., 1997; Selenko et al., 2001; Jablonka et al., 2002; Winkler et al., 2005; Kolb et al., 2007). Der vom SMN-Protein gebildete Multiproteinkomplex enthält die spleißosomalen Sm-core-Proteine B/B', D₁₋₃, E, F und G (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997; Pellizzoni et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999) und stellt so die Verbindung zwischen SMN und der zellulären Spleißingmaschinerie dar. Für die Interaktion von SMN mit den Sm-Proteinen ist die Tudor-Domäne des Proteins von Bedeutung (Bühler et al., 1999). Diese Domäne wird für die korrekte Assemblierung der U snRNP benötigt und erleichtert die Bindung der Sm-Proteine (Bühler et al., 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass SMN und die Tudor-Domäne effizient an das arginin- und glycinreiche C-terminale Ende der SmD₁- und SmD₃-Proteine binden (Friesen und Dreyfuss, 2000; Selenko et al., 2001). Neben SMN werden auch Gemin2, Gemin3 und Gemin4 für die Sm-core-Assemblierung benötigt (Shpargel und Matera, 2005). Über Gemin5 bindet der SMN-Komplex unabhängig von seiner Interaktion mit

den Sm-Proteinen auch direkt und spezifisch an snRNAs (Battle et al., 2006; Battle et al., 2007).

Die Biogenese der spleißosomalen U snRNPs ist ein komplizierter Prozess, der sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma stattfindet. Zunächst werden die U snRNAs (uridine-rich small nuclear ribonucleic acids) aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo sie auf die Sm-Proteine (B/B', D₁₋₃, E, F und G) treffen, welche mit den U snRNAs assoziieren und einen ringartigen Sm-core mit einer mittigen Bindungsstelle für die U snRNAs bilden (Raker et al., 1996). Die bei diesem Vorgang entstandenen Komplexe aus Sm-Proteinen und U snRNAs bezeichnet man als U snRNPs. Nun werden die kompletten Partikel in den Zellkern zurück importiert, wo sie am Aufbau des Spleißosoms beteiligt sind und U snRNP-spezifische Proteine an den Komplex binden (Will und Lührmann, 2001).

Obwohl die Formierung der Sm-Proteine mit den U snRNAs *in vitro* spontan verläuft (Raker et al., 1996), haben verschiedenen Studien zeigen können, dass unter *in vivo* Bedingungen die Anwesenheit von SMN für die korrekte U snRNPs-Assemblierung nötig ist (Meister et al., 2001; Meister et al., 2002; Pellizzoni et al., 2002b; Winkler et al., 2005). Der SMN-Komplex scheint als ATP-abhängige makromolekulare Maschine („Assemblyosom“) die Bildung der U snRNPs zu koordinieren und unspezifische Bindungen zu verhindern (Pellizzoni et al., 2002b). Die Sm-core-Formierung im Zytoplasma umfasst vor der Zusammenlagerung mit SMN mehrere Schritte, einschließlich der Assoziation der Sm-Proteine mit pICln (Chlorid-Leitfähigkeit regulierendes Protein) und PRMT5 (Protein Arginin Methyltransferase 5) (Pellizzoni, 2007). Durch symmetrische Dimethylierung einer Teilmenge der Sm-Proteine durch den PRMT5-Komplex wird deren Affinität zu SMN erhöht (Meister et al., 2002; Paushkin et al., 2002). Zusammenfassend zeigt Abbildung 4 schematisch die Funktion des SMN-Komplexes bei der Bildung des Spleißosoms.

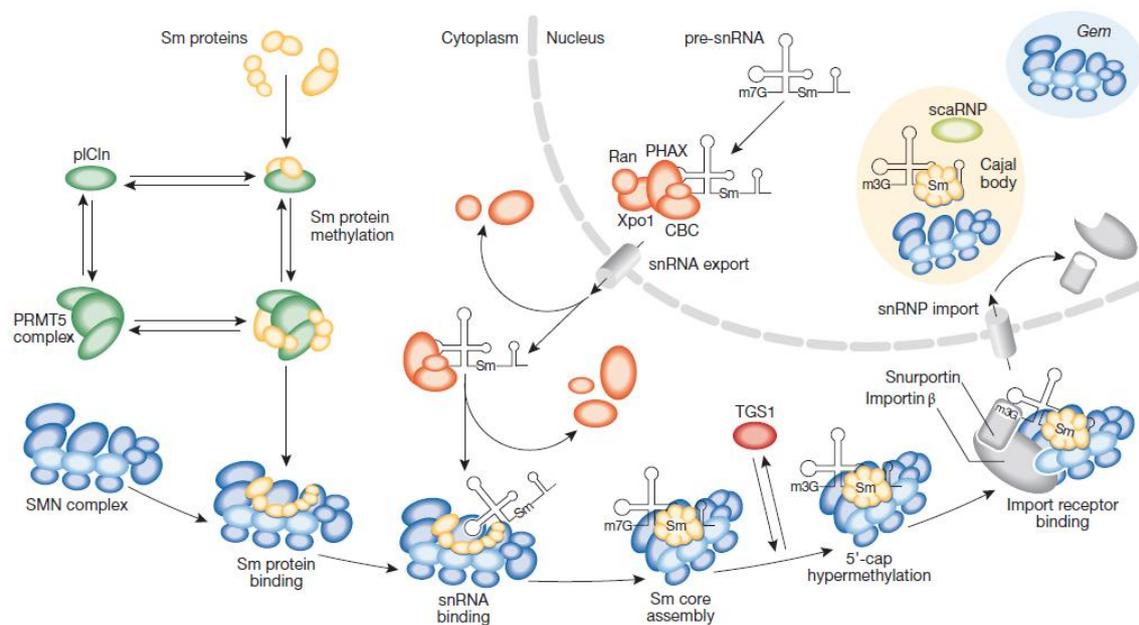


Abbildung 4. Im Zytoplasma binden die sieben Sm-Proteine zuerst an pICln und den PRMT5-Komplex – welcher SmB, SmD₁ und SmD₃ symmetrisch dimethyliert – und anschließend an den SMN-Komplex. Der SMN-Komplex interagiert mit snRNAs und vermittelt die Assemblierung des Sm-cores. Anschließend folgt die Hypermethylierung der 5' cap der snRNAs und der Import der snRNPs in den Zellkern. Der SMN-Komplex lokalisiert zusammen mit den snRNPs für kurze Zeit in den Cajal Bodies, in denen die snRNPs weitere Reifungsschritte durchlaufen, bevor sie ihre Funktion beim prä-mRNA-Spleißen einnehmen. Abhängig vom Zelltyp und dem Entwicklungsstadium lokalisiert der SMN-Komplex auch in den Gems des Zellkerns (Abbildung aus Pellizzoni, 2007).

Durch verschiedene Studien in den letzten Jahren erhärtete sich der Verdacht, dass der bei SMA vorliegende Defekt des SMN-Proteins zu einer gestörten Spleißosom-Assemblierung führt. Diese Unterbrechung der Spleiß-Maschinerie könnte zu fehlerhaft gespleißten mRNAs führen, die für vitale, motoneuron-spezifische Proteine kodieren und deren Verlust zu der bei SMA beobachteten Degeneration von Motoneuronen führt (Briese et al., 2005). So konnten Pellizzoni und Mitarbeiter (1998) nachweisen, dass Wildtyp-SMN, aber nicht mutierte SMN-Formen wie sie bei SMA gefunden werden, einen stark stimulierenden Effekt auf das prä-mRNA Spleißen *in vitro* haben. Ferner konnte durch Generierung einer *Smn*^{+/-}; *Gemin2*^{+/-}-Maus gezeigt werden, dass der nukleäre Pool an Sm-Proteinen im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert ist, was für einen Defekt der spleißosomalen U snRNP-Assemblierung spricht (Jablonka et al., 2002). Weitere Unterstützung für die Hypothese des gestörten Spleißens bei SMA erfolgte durch die Beobachtung, dass SMA-verursachende Mutationen die Fähig-

keit von SMN mit Sm- und Gemin-Proteinen zu interagieren vernichten, und die Tendenz des Proteins zur Oligomerisierung beeinflussen (Bühler et al., 1999; Pellizzoni et al., 1999). Außerdem bedingt die Ausschaltung einzelner Komponenten des SMN-Komplexes (SMN, Gemin2, Gemin6, Gemin8) eine Beeinträchtigung der snRNP-Assemblierung in HeLa-Zellen (Feng et al., 2005; Shpargel und Matera, 2005; Carissimi et al., 2006). Die Injektion von snRNPs in Zebrafisch- oder *Xenopus*-Embryonen kann den Verlust von SMN und Gemin2 kompensieren und unterstützt die Hypothese einer Korrelation zwischen Motoneurondegeneration und gestörter snRNP-Assemblierung (Winkler et al., 2005). Zudem konnte eine neuere Studie erstmals zeigen, dass der Schweregrad der spinalen Muskelatrophie mit der Expression des SMN-Komplexes und dessen snRNP-Assemblierungsaktivität im Rückenmark von SMA-Mäusen korreliert (Gabanella et al., 2007).

Es gibt allerdings auch Anzeichen, dass bei der spinalen Muskelatrophie nicht generell das Spleißen von mRNAs betroffen ist. Denn im Mausmodell für SMA konnten bei den untersuchten prä-mRNA (Ich-1) keine Spleißdefekte gefunden werden (Jablonka et al., 2000a; Jablonka et al., 2004). Überraschenderweise fand die Arbeitsgruppe um Gabanella (2007) *in vivo* keine Beeinträchtigung der snRNP-Synthese in Typ I SMA-Fibroblasten. Außerdem bewirken SMN-Mutanten, denen der N-Terminus oder Exon7 fehlt und die somit nicht an Sm-Proteine oder Gemins binden können, eine Überwindung der Zell-Letalität von SMN-depletierten Hühnchen prä-B Zell-Linien DT40 (Wang und Dreyfuss, 2001). Ebenso können die in einem *Drosophila* SMA-Modell beobachteten Motoneuronabnormalitäten durch Expression eines trunkierten *Drosophila-Smn*, welches nicht mit Gemin2 interagieren kann, reduziert werden (Liu et al., 1997; Chan et al., 2003). Zhang und Kollegen konnten 2008 zeigen, dass der Verlust von SMN zelltypspezifische Effekte auf das Repertoire an snRNAs und mRNAs hat. Diese Daten weisen dem SMN-Komplex eine Schlüsselrolle beim RNA-Metabolismus und bei der Regulation des Spleißens zu. Die Beobachtung, dass Spleißdefekte in verschiedenen Geweben gefunden wurden, indiziert, dass bei SMA das Spleißen generell betroffen ist. Allerdings bleibt weiterhin die Frage offen, warum der bei SMA beobachtete Defekt des prä-mRNA-Spleißens, welcher

eigentlich alle Zellen des Organismus betreffen sollte, zu einer Motoneurondegeneration führt.

1.4. Mausmodelle für SMA

Durch Generierung verschiedener Mausmodelle konnte die Pathogenese der spinalen Muskelatrophie genauer untersucht werden. Eine genetische Besonderheit von Menschen und Primaten stellt die Duplikation des *SMN*-Gens dar. Andere Spezies, wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder Nagetiere tragen keine Duplikation des *SMN*-Gens (Rochette et al., 2001). Da die Maus auf Chromosom 13 nur eine Kopie des murinen *Smn*-Gens besitzt, kann die Inaktivierung dieses Gens nicht durch ein zusätzliches *Smn*-Gen kompensiert werden (DiDonato et al. 1997; Violett et al., 1997). Der homozygote Knock-out des *Smn*-Gens (*Smn*^{-/-}) bei der Maus führt zu einem embryonal letalen Phänotyp (Schrank et al., 1997). Bis zum frühen Blastozystenstadium kann die Zelle noch auf maternale *Smn*-Transkripte aus der befruchteten Eizelle zurückgreifen. Ist diese Menge allerdings ausgeschöpft, geht die Zelle zugrunde. Diese Beobachtungen und der Befund, dass *SMN* in allen Geweben exprimiert wird, zeigen, dass *SMN* als sogenanntes „Housekeeping-Gen“ eine wesentliche Funktion für die Überlebensfähigkeit aller Zellen erfüllt (Lefebvre et al., 1997; Schrank et al., 1997).

Um ein Modell der spinalen Muskelatrophie bei der Maus zu erschaffen, war es notwendig das humane *SMN2*-Gen in das Mausgenom einzuführen. Da der Schweregrad der SMA unter anderem von der *SMN2*-Kopienzahl im Genom abhängt (Burghes et al., 1997), wurde ein Mausmodell generiert, bei dem das *Smn*-Gen homozygot ausgeschaltet ist und das humane *SMN2*-Gen (in zwei bzw. acht Kopien) überexprimiert wird (vgl. Abbildung 5). Die Expression des humanen *SMN2*-Gen auf dem *Smn*^{-/-}-Hintergrund (*Smn*^{-/-};*SMN2*) bewirkt dabei die Überwindung der embryonalen Letalität (Monani et al., 2000a).

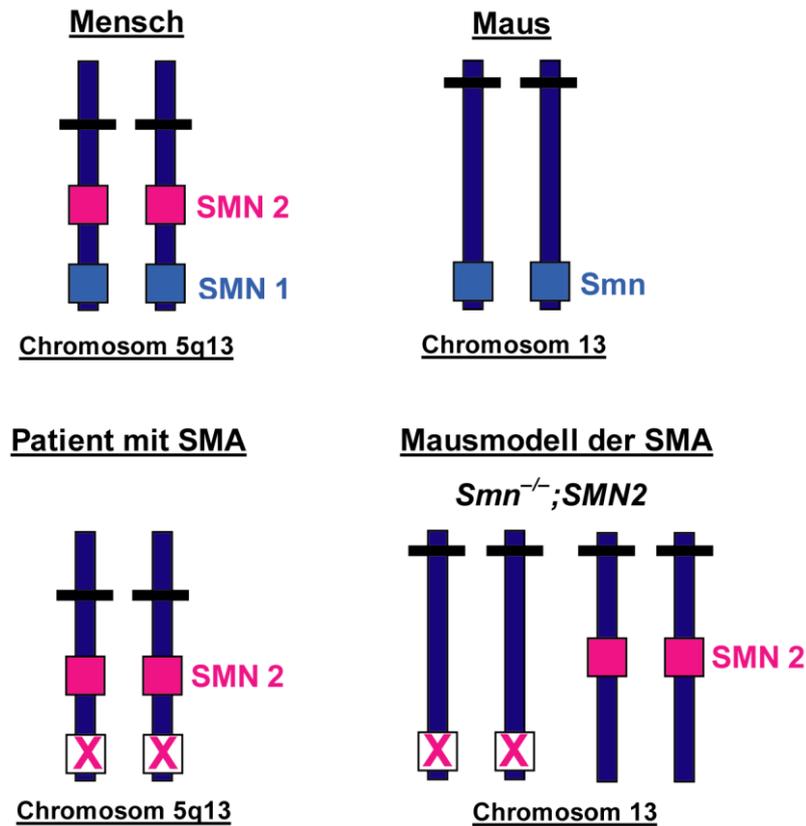


Abbildung 5. Die obere Reihe zeigt die genomische Organisation des *Smn*-Gens bei Mensch und Maus. Im Genom des Menschen sind *SMN1*- und *SMN2*-Gen auf dem langen Arm (q) von Chromosom 5 lokalisiert. Bei der Maus findet sich keine Duplikation des auf Chromosom 13 lokalisierten *Smn*-Gens. In der unteren Reihe ist die genomische Situation bei Patienten mit SMA und die des beschriebenen $Smn^{-/-};SMN2$ -Mausmodells dargestellt.

$Smn^{-/-};SMN2$ -Mäuse, die ein bis zwei Kopien („low-copy“) des Transgens tragen, haben bei Geburt eine normale Anzahl von Motoneuronen, am ersten postnatalen Tag findet sich ein Verlust von circa 17%. Am dritten bis fünften postnatalen Tag zeigt sich bei diesen Tieren allerdings ein etwa 35%iger Verlust an Motoneuronen im Rückenmark. Zudem finden sich im Vergleich zu „high-copy“ $Smn^{-/-};SMN2$ -Mäusen und Kontrolltieren fast keine Gems in spinalen Motoneuronen und Hautfibroblasten. Totgeborene Mäuse oder jene, die kurz nach der Geburt verstarben, waren oft zyanotisch. Hingegen ließen sich $Smn^{-/-};SMN2$ -Mäuse, die vier bis sechs Tage überlebten, in den ersten 48 Stunden postnatal nicht von den Geschwistertieren unterscheiden. Im Zeitraum von 48 - 72 Stunden nach der Geburt folgte die rapide Verschlechterung bis hin zum Tod. Acht *SMN2*-Kopien („high-copy“) führten zu phänotypisch unauffälli-

gen Mäusen. Somit liegt ein klassischer Gen-Dosis-Effekt vor. Denn die erhöhte *SMN2*-Kopienzahl mildert den Schweregrad des Phänotyps. Zudem konnte beobachtet werden, dass das *SMN2*-Transgen in allen Geweben exprimiert wird. „Low-copy“ *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mäuse exprimieren 10- bis 20-fach geringere Mengen SMN-Protein, während *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mäuse mit einer hohen *SMN2*-Kopienzahl vergleichbare SMN-Proteinmengen wie Kontrolltiere produzieren (Monani et al., 2000a).

Die transgene SMA-Maus einer Arbeitsgruppe aus Taiwan, die humanes *SMN2* inklusive Anteile des *NAIP*- und *H4F5*-Gens enthält, zeigt einen variablen Phänotyp, der von sehr mild ausgeprägten Symptomen bis hin zum frühen Tod reicht, und ermöglicht so die Einteilung in drei Gruppen: Typ I umfasst die Mäuse mit der schwersten Form. Diese Tiere entwickelten kein volles Fell und starben vor dem zehnten postnatalen Tag. Mäuse mit dem intermediären Typ II zeigten geringe Aktivität, variable Symptome und starben etwa nach zwei bis vier Wochen. Dem Typ III wurden die Tiere zugeordnet, die normale Überlebenszeiten, aber kürzere und breitere Schwänze hatten. Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe zum ersten Mal alle SMA-Typen in einem Wurf beobachten (Hsieh-Li et al., 2000).

Um die Rolle von *SMNΔ7* bei der spinalen Muskelatrophie zu untersuchen, wurden von Le und Kollegen (2005) transgene Mäuse, die *SMNΔ7* exprimierten, auf einem *Smn*^{-/-}-Hintergrund geschaffen. Dieses intermediäre Mausmodell (*SMNΔ7*^{+/+};*SMN2*^{+/+};*Smn*^{-/-}) führte zu einer Verlängerung der Überlebenszeit der SMA-Mäuse von 5,2 auf 13,3 Tage. Vom fünften postnatalen Tag an waren alle Mutanten kleiner, wogen weniger als ihre gesunden Geschwister-tiere und hatten Schwierigkeiten beim Bewegen. Die Anzahl der Motoneuronen im Rückenmark war am dritten postnatalen Tag normal, am neunten Tag postnatal allerdings signifikant reduziert (Le et al., 2005). Da die *SMNΔ7*-Maus eine verlängerte Überlebensrate zeigt, kann dieses Mausmodell für die *in vivo* Prüfung von therapeutisch wirksamen Substanzen für SMA genutzt werden.

Um den Krankheitsverlauf einer später einsetzenden Form der spinalen Muskelatrophie zu studieren, bieten sich weitere Mausmodelle an. So zeigen sechs Monate alte Mäuse mit einer heterozygoten Inaktivierung des *Smn*-Gens

(*Smn*^{+/-}) eine etwa 46%ige Reduktion der Smn-Proteinmenge im Rückenmark und eine Verminderung der Anzahl der Motoneurone um 40%. Interessanterweise ist die Anzahl der Gems nicht vermindert. Die Krankheitsentwicklung ähnelt der menschlichen SMA Typ III (Jablonka et al., 2000a). Von Monani und Kollegen wurde 2003 ein neues Mausmodell generiert, das neben dem humanen *SMN2*-Gen eine zusätzliche punktmutierte cDNA des murinen *Smn*-Gens (Mutation in Exon1, A2G Missense Mutation) auf dem *Smn*^{-/-}-Hintergrund trägt. Bereits bei der Geburt waren die für A2G heterozygoten Mäuse mit einer einzelnen *SMN2*-Kopie zwischen 20% und 40% kleiner als ihre Geschwistertiere und behielten diesen Unterschied während der Entwicklung bei. Im Alter von etwa drei Wochen begann die phänotypische Ausprägung. Die Tiere waren weniger aktiv und zeigten erste Anzeichen von Muskelschwäche. Am Ende ihres Lebens (mittlere Überlebensdauer 227 Tage) bewegten sich die Mäuse nur noch wenig, verloren stark an Gewicht und hatten Atemprobleme. Anhand des Phänotyps wurden diese Mäuse dem Schweregrad SMA Typ III zugeordnet. Untersuchungen des Rückenmarks zeigten einen Verlust von 29% der spinalen Motoneuronen im Vergleich zu gesunden Geschwistertieren. Die Anzahl der Gems war um etwa die Hälfte reduziert (Monani et al., 2003). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht ausgewählter Mausmodelle (Frugier et al., 2000; Hsieh-Li et al., 2000; Jablonka et al., 2000a; Monani et al., 2000a).

Tabelle 1. Vergleich von Mausmodellen für SMA im Hinblick auf Gene, Alter bei Krankheitsbeginn, wichtige Merkmale und Überlebenszeit (nach Monani et al., 2000b).

	Typ I SMA Maus	Typ II SMA Maus	Typ III SMA Maus
Gene	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> und <i>SMN</i> ^{Δ7/Δ7}	<i>Smn</i> ^{+/-}
Alter bei Krankheitsbeginn	3 Tage	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> : 1 Woche <i>SMN</i> ^{Δ7/Δ7} : 2 Wochen	keine offenkundige Schwäche
Wichtige Merkmale	schwere Muskelschwäche; 40% Verlust an spinalen Motoneuronen im Alter von 6 Tagen	neurogene Atrophie der Muskeln; Paralyse; Chromatolyse von spinalen Motoneuronen; kein Verlust von Motoneuronen bei <i>SMN</i> ^{Δ7/Δ7} -Mäusen	etwa 50%iger Verlust von Motoneuronen im Alter von 6 Monaten; normale Muskelpathologie
Überlebenszeit	1 Woche	Typ II: 4 Wochen	Typ III: 2 Jahre

1.5 Molekularbiologische Grundlagen

1.5.1 SMN-Interaktionspartner hnRNP R

Als weitere Bindungspartner des SMN-Proteins konnten die sehr homologen Proteine hnRNP R und Q durch das Yeast-Two-Hybride System identifiziert werden (Mourelatos et al., 2001; Rossoll et al., 2002). Beide Proteine stammen aus der Familie der heterogenous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP), die bisher aus etwa 30 Proteinen besteht und eine wichtige Rolle beim Ablauf der mRNA-Prozessierung übernimmt (Dreyfuss et al., 1993; Kiebler und DesGroseillers, 2000; Shyu und Wilkinson, 2000). Eine alternative Spleißform

von hnRNP R (SYNCRIP, Synaptotagmin bindendes Protein) ist am mRNA-Transport entlang des Zytoskeletts beteiligt (Mizutani et al., 2000).

HnRNP R und hnRNP Q gehören zu den Glycin-Arginin-Thyrosin-reichen RNA-bindenden Proteinen und besitzen eine 90%ige Homologie auf Proteinebene (Rossoll et al., 2002). HnRNP Q ist bereits als Glycin-Arginin-Thyrosin-reiches RNA-Bindungsprotein (Blanc et al., 2001) und unter der früheren Bezeichnung gry-rbp als Komponente des spleißosomalen Komplexes bekannt (Neubauer et al., 1998). Im Gegensatz zu hnRNP Q scheint hnRNP R kein stabiler oder beständiger Teil der Spleißingmaschinerie zu sein (Mourelatos et al., 2001).

Die C-terminalen Abschnitte von hnRNP R und hnRNP Q enthalten eine Arginin-Glycin-reiche Region, die den RGG-(Arginin-Glycin-Glycin) Domänen in anderen SMN-bindenden Proteinen ähnelt (Friesen und Dreyfuss, 2000). Diese Domäne scheint die Interaktion mit SMN zu modulieren. Wie die Veröffentlichung von Rossoll und Kollegen (2002) zeigt, interagiert hnRNP R mit SMN, allerdings nur mit der Wildtypform des Proteins. Denn mutierte Formen des SMN-Proteins, wie sie bereits bei Patienten mit SMA beschrieben wurden, versagen bei der Bindung. Wie SMN werden auch hnRNP R und hnRNP Q in vielen Geweben exprimiert (Rossoll et al., 2002). HnRNP R fand sich in großen Mengen im Gehirn, während im Rückenmark, Herz, Lunge, Leber und Milz nur geringe Mengen entdeckt werden konnten. Eine starke Anreicherung von hnRNP Q konnte in Lunge, Leber und Gehirn gefunden werden, geringe Mengen zeigten sich in Niere und Muskelgewebe. Die Expression von hnRNP R und hnRNP Q scheint zudem entwicklungsabhängig reguliert zu werden. In der späten Embryogenese finden sich die größten Proteinmengen im Rückenmark, während es postnatal zu einem deutlichen Abfall an hnRNP R und hnRNP Q kommt (Rossoll et al., 2002). Eine ähnliche Verteilung findet sich auch für die entsprechende RNA. Im Nervensystem zeigt hnRNP R eine starke Präsenz in motorischen Nervenfasern, jedoch nicht in den Schwannschen Zellen und nur gering in sensorischen Neuronen. Innerhalb der Zelle wurde hnRNP R von der Arbeitsgruppe im Zytoplasma und im Axon, weniger in den Dendriten gefunden. Eine Kolo-kalisation mit SMN in den Kern des Zellkerns konnte nicht nachge-

wiesen werden. Dagegen fand sich eine Kolokalisation der beiden Proteine im distalen Axon von isolierten embryonalen Motoneuronen (Rossoll et al., 2002).

1.5.2 Zytoskelettprotein β -Aktin

Zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellstruktur eines Neurons ist das Zytoskelett – bestehend aus Neurotubuli, Neurofilamenten und Aktinfilamenten – unverzichtbar. Zu seinen Aufgaben gehören unter anderem die mechanische Stabilisierung der Ausläufer, die Gewährleistung der Zellmotilität und der Transport von Organellen und Proteinen innerhalb der Ausläufer (Hannan, et al., 1998; Lüllmann-Rauch, Histologie, 2003). In den Axonen und Dendriten der Nervenzellen müssen weit entfernt vom Zellkern Stoffwechselfvorgänge geregelt und das Wachstum gewährleistet werden. Um die langen Zellfortsätze mit Zytoskelettkomponenten und weiteren spezifischen Proteinen zu versorgen, werden diese nach ihrer Synthese im Perikaryon aktiv in die Axone und Wachstumskegel transportiert (Bassell et al., 1998). Neben diesem Mechanismus findet die Translation verschiedener mRNAs auch direkt vor Ort in den langen Zellfortsätzen statt (Mohr und Richter, 2001). Dazu ist ein Transport der mRNAs aus dem Soma in die Axone und Dendriten der Neurone erforderlich (Mohr und Richter, 2001). Die Beobachtung von Bassell und Kollegen (1998), dass sich β -Aktin-mRNA häufig mehr als 100 μm vom Zellkörper entfernt in distalen Axonen und Dendriten nachweisen lässt, dient ebenfalls als Hinweis auf einen mRNA-Transport in Nervenzellfortsätzen. Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die β -Aktin-mRNA in den Wachstumskegeln mit Komponenten der Translationsmaschinerie kolokalisiert. Drei Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass die Lokalisation von mRNA in Nervenzellen notwendig ist, um die β -Aktin-Proteinmenge im distalen Axon zu erhöhen und die Vorwärtsbewegung der Wachstumskegel als Antwort auf externe Signale zu gewährleisten (Zhang et al., 2001). Auch die Studie von Rossoll und Mitarbeitern (2003a) bestärkt die Vermutung eines spezifischen Transports der β -Aktin-mRNA und einer lokal stattfindenden Proteinbiosynthese in Axonen und Wachstumskegeln von Nervenzellen.

Aktinfilamente gehören zu den ubiquitären Bestandteilen des Zytoskeletts aller eukaryontischer Zellen (Hill und Gunning, 1993). Innerhalb von Nervenzellen

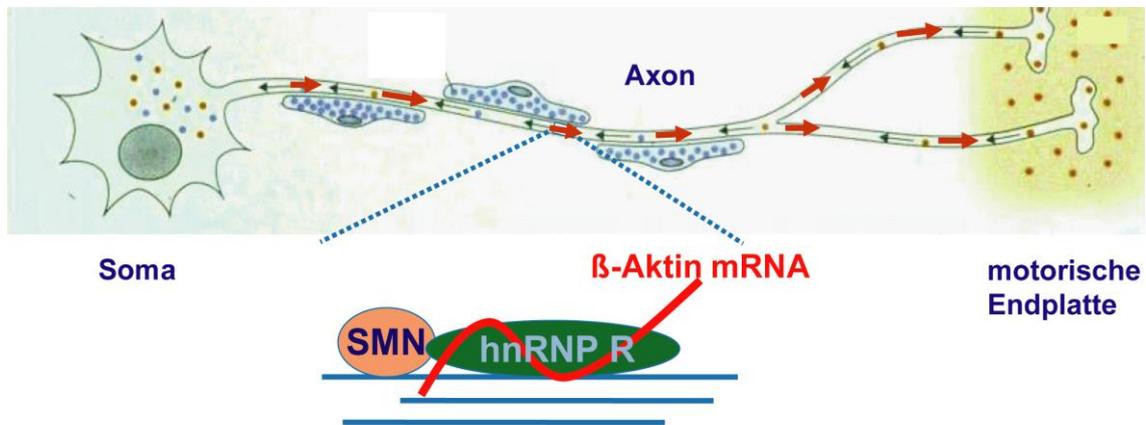
finden sich verschiedene Isoformen, mit unterschiedlicher Verteilung: α - und γ -Aktin finden sich hauptsächlich um den Zellkern gruppiert, während β -Aktin neben der perinukleären Anreicherung eine starke Akkumulation in den Zellfortsätzen und Wachstumskegeln der Neurone zeigt. Eine entsprechende Verteilung findet sich auch für die jeweilige Aktin-mRNA (Hill und Gunning, 1993; Hill et al., 1994; Bassell et al., 1998). In sich entwickelnden Neuronen fanden Hannan et al. (1998) hingegen keine enge Korrelation von β -Aktin-mRNA und -Protein. Die Mehrheit an β -Aktin-Protein zeigte sich in den Experimenten dieser Arbeitsgruppe im Wachstumskegel, während β -Aktin-mRNA in diesem Zellkompartiment nur spärlich vertreten war. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass Proteinsynthese auch im Wachstumskegel von Neuronen stattfindet (Crino und Eberwein, 1996) und es daher wahrscheinlich scheint, dass die β -Aktin-mRNA in Protein translatiert wurde.

β -Aktin übernimmt in den Fortsätzen von Nervenzellen vielfältige Aufgaben. So ist das Zytoskelettprotein am Auswachsen der Axone und Wachstumskegel beteiligt (Bassel et al., 1998; Zhang et al., 2001). Nach einer Nervenverletzung scheint β -Aktin zur Regeneration der Axone benötigt zu werden (Lund et al., 2002). In Synapsen wird vermutet, dass Aktin an der Regulation der prä-synaptischen Funktion beteiligt ist, indem es ein Gerüst für andere Proteine bildet und Mediatoren der Endozytose speichert (Sankaranarayanan et al., 2003). Shupliakov und Mitarbeiter (2002) weisen Aktin zudem eine wichtige Rolle im Recyclen von synaptischen Vesikeln zu. Auch die Fusion der synaptischen Vesikel in der aktiven Zone von Synapsen scheint ein Aktin-abhängiger Prozess zu sein (Morales et al., 2000). Die Lokalisation und Translation der β -Aktin-mRNA spielt außerdem eine essentielle Rolle bei der Kalzium-abhängigen Wachstumskegelführung in der Entwicklung von Axonen (Yao et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Aktinzytoskelett am Auswachsen der Axone und an der Bildung und Aufrechterhaltung von Synapsen beteiligt ist (Zhang und Benson, 2001; Luo, 2002).

Im Mausmodell für SMA zeigen Motoneurone einen Defekt in der Translokation von β -Aktin-mRNA im distalen Axon (Rossoll et al., 2003a; Jablonka et al., 2007). Dieser Fund korreliert mit einer veränderten β -Aktin-Proteinverteilung in

Smn-defizienten Motoneuronen und deutet auf eine essentielle Rolle von SMN und hnRNP R im β -Aktin-mRNA-Transport hin. Untersuchungen mit *in situ* Hybridisierung zeigen, dass Wildtypmengen an Smn-Protein notwendig sind, um eine Akkumulation von β -Aktin-mRNA im Wachstumskegel von Motoneuronen zu bewirken (Rossoll et al., 2003a). Zudem üben hnRNP R-Mutanten, die nicht in der Lage sind RNA oder Smn zu binden, einen negativen Effekt auf die mRNA-Translokation im Axon aus (Rossoll et al., 2003a). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die reduzierte distale Lokalisation von β -Aktin in Nervenzellfortsätzen in direktem Zusammenhang mit der, durch Smn und hnRNP R beeinflussten, distalen β -Aktin-mRNA-Akkumulation steht. Abbildung 6 zeigt ein Modell des β -Aktin-mRNA-Transports in normalen (A) und SMN-defizienten Motoneuronen (B).

A



B

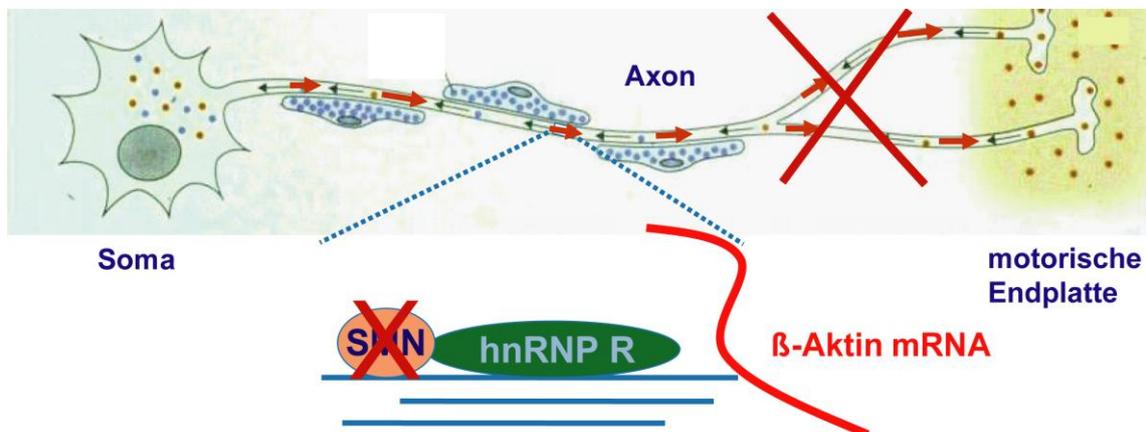


Abbildung 6. Modell des β -Aktin-mRNA-Transports. (A) Direkte Bindung des SMN-Proteins an hnRNP R und indirekte Bindung an spezifische mRNAs, hier β -Aktin-mRNA. Transport des Komplexes entlang des axonalen Zytoskeletts zu den Wachstumskegeln. In den Nervenfortsätzen erfolgt die Translation zum β -Aktin-Protein. (B) Fehlt SMN kann der mRNA-Transport nicht stattfinden und somit kein β -Aktin-Protein in den Zellfortsätzen gebildet werden (nach Rossoll et al., 2003b).

1.5.3 Interaktion von Laminin- β 2 mit spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen

Synapsen sind spezialisierte interzelluläre Kontakte, welche für die schnelle Signalübertragung zwischen Neuronen und deren Zielzellen benötigt werden. An chemischen Synapsen erfolgt die Übermittlung des Signals durch ein per Kalziumeinstrom in die Zelle ausgelöstes Verschmelzen von mit Neurotransmitter gefüllten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran, und darauf folgender Aktivierung von spezifischen postsynaptischen Rezeptoren (Klinke, Pape, Sil-

bernagl, Physiologie, 2005; Lüllmann-Rauch, Histologie, 2003). Somit erfordert die Bildung von funktionsfähigen Synapsen zum einen die Differenzierung einer Axonterminalen zur Präsynapse, zum anderen einer der Nervenendigung gegenüberliegenden, spezialisierten postsynaptischen Membran. Außerdem muss die Präsynapse in der Lage sein, nach Kalziumeinstrom in die Zelle, Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freizusetzen, um so eine Signalübertragung zu ermöglichen. Abbildung 7 zeigt schematisch den Aufbau einer chemischen Synapse.

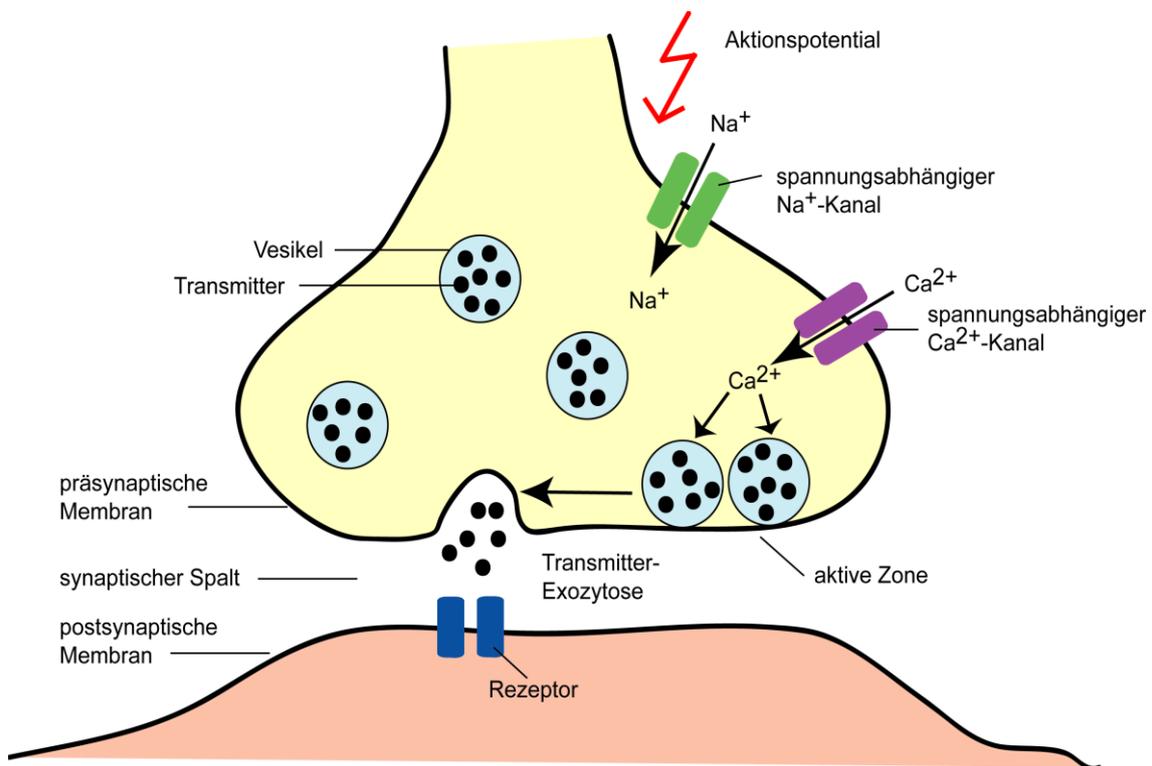


Abbildung 7. Schematischer Aufbau einer chemischen Synapse. Der synaptische Spalt trennt die präsynaptische Endigung des Axons von der postsynaptischen Membran der Zielzelle. In der Axonterminale befinden sich die mit Transmitter gefüllten Vesikel. Kommt ein Aktionspotential an der präsynaptischen Endigung an, öffnen sich dort durch die Depolarisation spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und es kommt zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle. Vermittelt durch die einströmenden Kalziumionen wird der Transmitter mittels Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann an Rezeptoren der postsynaptischen Membran andocken (nach Huppelsberg & Walter, 2003).

Die spezialisierte präsynaptische Region, welche für die Exozytose der Neurotransmitter verantwortlich ist, wird als aktive Zone einer Synapse bezeichnet (Atlas et al., 2001; Photowala et al., 2005). Aktive Zonen zeigen dichte Anhäufungen von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen in unmittelbarer Nähe zum Bereich der Vesikelfreisetzung (Harlow et al., 2001; Cao et al., 2004; Kittel et

al., 2006). Diese morphologische Spezialisierung der Präsynapse gewährleistet eine schnelle und effiziente Signalübertragung durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Kalziumionen (Schneppenburger und Neher, 2005; Kittel et al., 2006).

Um die präzise Positionierung der differenzierenden Nervenendigung zum postsynaptischen Apparat herzustellen, sind zielgerichtete Signale nötig, die eine wichtige Aufgabe bei der richtigen Lokalisierung der Axonterminalen innehaben (Sanes und Lichtman, 1999; Scheiffele, 2003). Genetische Studien mit Mäusen *in vivo* zeigen Laminin- β 2 als wichtiges Signalprotein für die präsynaptische Differenzierung (Noakes et al., 1995; Patton et al., 1998; Knight et al., 2003). Laminine finden sich in den Basallaminae unterschiedlicher Zellen. Es sind heterotrimere Glykoproteine, von denen bisher wenigstens 15 Trimere – zusammengesetzt aus den vorhandenen fünf α -, drei β - und drei γ -Untereinheiten – identifiziert wurden (Li et al., 2003). Skelettmuskelzellen produzieren verschieden Laminine: eines, das hauptsächlich die β 1-Untereinheit enthält, dominiert entlang des größten Teils der Zelloberfläche, während sich ein Laminin mit der β 2-Untereinheit als überwiegenden Part auf schmale Bereiche der Basallamina begrenzt, die den synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte bilden (Sanes et al., 1990; Noakes et al., 1995; Patton et al., 1997). Studien konnten zeigen, dass β 2-Fragmente und Heterotrimere, die die β 2-Untereinheit enthalten, als ein „Differenzierungssignal“ für motorische Neurone agieren, und die präsynaptische Differenzierung *in vitro* fördern (Hunter et al., 1991; Porter et al., 1995; Noakes et al., 1995; Son et al., 1999). *Laminin- β 2^{-/-}*-Mausmutanten zeigen Defekte in Struktur, Funktion und molekularer Architektur der neuromuskulären Endplatte: die Anzahl von aktiven Zonen ist verringert, Vesikel verteilen sich über die ganze Nervterminale (Noakes et al., 1995). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Laminin- β 2 ein von Muskelfasern stammender Regulator der Differenzierung von Nervterminalen ist.

Laminine binden zudem an mehrere Klassen von Membranproteinen. So bindet Laminin- β 2 direkt an die poren-formende Untereinheit (α oder Ca_v) von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen (voltage-gated calcium channels, VGCCs), welche in der präsynaptischen Membran konzentriert sind und für die Trans-

mitterfreisetzung benötigt werden (Nishimune et al., 2004). Diese Kalzium-Kanäle rekrutieren und stabilisieren ihrerseits andere Komponenten des Transmitterfreisetzungssapparats (Nishimune et al., 2004; Fox et al., 2007). Eine gestörte Gruppierung der VGCCs in der präsynaptischen Membran könnte eine fehlerhafte Transmitterfreisetzung bewirken.

Laminin- β 2 ist bereits in frühen Stadien der Synapsenentwicklung im synaptischen Spalt konzentriert (Patton et al., 1997; Fox et al., 2007). Zum Zeitpunkt der Geburt enthalten die Axonterminalen von Motoneuronen reichlich N-Typ Kalzium-Kanäle ($Ca_v2.2$ -Untereinheit). Diese werden im Laufe der ersten postnatalen Wochen zugunsten der $Ca_v2.1$ -Untereinheit (P/Q-Typ Kalzium-Kanal) abgelöst (Jun et al., 1999; Urbano et al., 2003; Pagani et al., 2004; Fox et al., 2007). Für die Entwicklung der Axonterminalen von Motoneuronen und zentralen Synapsen sind somit hauptsächlich die N-Typ Kalzium-Kanäle, sowie für die Transmitterfreisetzung nach Ausreifung der Synapsen die P/Q-Typ VGCCs verantwortlich (Urbano et al., 2002; Spafford und Zamponi, 2003).

Laminin- β 2 besitzt eine LRE (Leucin-Arginin-Glutamat)-Sequenz, welche für die Adhäsion von Neuronen wichtig ist und das Wachstum der Nervenzellfortsätze stoppt (Hunter et al., 1989; Hunter et al., 1991; Porter et al., 1995). Die spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle interagieren mit Laminin- β 2 über Bindung der LRE-Sequenz des Laminins- β 2 an die 11. extrazelluläre Schleife der $Ca_v2.1$ - und $Ca_v2.2$ -Untereinheiten (Nishimune et al., 2004).

Die Arbeitsgruppe um Nishimune (2004) weisen Laminin- β 2 eine potentielle Rolle in der Anhäufung von VGCCs in der präsynaptischen Membran zu und postulieren, dass die Auslösung der präsynaptischen Differenzierung durch Laminin- β 2 zumindest teilweise über spannungsabhängige Kalzium-Kanäle vermittelt wird. Zudem sind VGCCs bei der Bildung oder Aufrechterhaltung der aktiven Zone einer Synapse beteiligt (Kittel et al., 2006). Die Bedeutung der spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle für die aktive Zone einer Synapse zeigt die Kollokalisierung von N-Typ Kalzium-Kanälen ($Ca_v2.2$) mit dem aktiven Zonen Protein Piccolo (Jablonka et al., 2007). Laminin- β 2 ist für die initiale Formierung der aktiven Zonen entbehrlich, nicht aber für ihre Aufrechterhaltung oder weiteres Wachstum (Nishimune et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Interaktion von Laminin-β2 und spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen wichtig ist für die präsynaptische Entwicklung an neuromuskulären Endplatten und für die Stabilität der aktiven Zonen von Synapsen.

1.5.4 Stimulation der SMN-Gentranskription durch zyklisches AMP (cAMP)

Da das *SMN2*-Gen in SMA-Patienten seine Aktivität beibehält, wurde die *SMN*-Promotorregion genauer untersucht. Die Analyse der 750-bp umfassenden Region zeigte cis-Elemente für mehrere Transkriptionsfaktoren, einschließlich zweier putativer CREB-Bindungsstellen, CRE-I und CRE-II (Majumder et al., 2004).

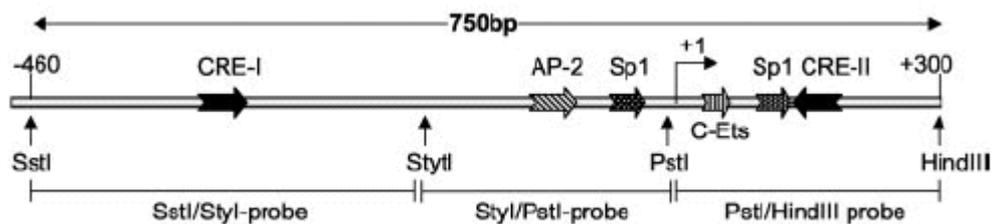


Abbildung 8. Schematische Darstellung der 750-bp *SMN2*-Promotorregion, mit Darstellung relevanter cis-Elemente (Abbildung aus Majumder et al., 2004).

Die *in vivo* und *in vitro* durchgeführten Footprinting-Studien deuten auf eine wichtige Rolle für die CRE-II Bindungsstelle bei der Regulierung der *SMN*-Promotor-Aktivität hin (Majumder et al., 2004). CREB ist ein Transkriptionsfaktor der eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung verschiedener Nervenzellen übernimmt und über eine Vielzahl von Signalmolekülen aktiviert werden kann (Monti et al., 2002). Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein ubiquitär vorkommender Signalstoff (second messenger), der von vielen Zellen produziert wird. Die Bindung von Liganden – wie beispielsweise Hormone oder Wachstumsfaktoren – an ihre spezifischen, in der Plasmamembran der Zielzellen gelegenen Rezeptoren aktiviert GTP-bindende Proteine (G-Proteine), welche mit den Rezeptoren gekoppelt sind. Diese G-Proteine stimulieren die Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase, welches ATP in cAMP umwandelt. Das so gebildete cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche eine Vielzahl von

Proteinen phosphoryliert. Es ist bekannt, dass Mitglieder der CREB Familie durch Phosphorylierung als Reaktion auf veränderte cAMP-Mengen aktiviert werden (Montminy und Bilezikjian, 1987). Die Arbeitsgruppe um Majumder (2004) konnte zeigen, dass der *SMN*-Promotor cAMP-abhängig ist und dass CRE-II und nicht CRE-I als cAMP-responsive element den *SMN*-Promotor aktivieren kann. Aktives CREB stimuliert den *SMN*-Promotor. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass CREB-1 die cAMP-abhängige Hochregulierung der *SMN*-Genexpression vermittelt (Majumder et al., 2004). Daneben gilt die Aktivierung des cAMP response element binding protein (CREB) als Verbindung zwischen Aktivierung der Proteinkinase A und der Genexpression. Die drei Mitglieder der CREB Familie, CREB-1, CREM-1 und ATF-1, können heterodimerisieren, allerdings zeigen sie sich *in vivo* hauptsächlich als Homodimere (Dwarki et al., 1990). Diese Familie von Transkriptionsfaktoren ist in viele intrazelluläre Signalwege eingebunden. Majumder et al. (2004) konnten nun erstmals die Involvierung in die Hochregulierung des *SMN*-Gens nachweisen. Die Studie von Majumder et al. (2004) zeigt, dass das cAMP-Analogon dibutyryl-cAMP und der Proteinkinase A-Aktivator Forskolin die *SMN2*-Genexpression in primären Hepatozyten aktivieren kann. Dabei führt die Aktivierung von CREB zur Aktivierung der *SMN*-Expression über die CRE-II Bindungsstelle des *SMN*-Promotors.

Die Ergebnisse von Majumder und Kollegen (2004) zusammen mit der Beobachtung, dass das *SMN2*-Gen durch einen Promotor reguliert wird, der mit dem von *SMN1* in Sequenz und Aktivität nahezu identisch ist (Echaniz-Laguna et al., 1999; Monani et al., 1999), führten zu der Frage, ob durch die cAMP-vermittelte Stimulierung des *SMN*-Promotors eine Wirkung/Kompensation auf die bei SMA vorherrschenden Motoneuronendefekte erzielt werden kann. In dieser Dissertation wurde daher im Hinblick auf eine zukünftige Therapie der spinalen Muskelatrophie durch eine gesteigerte *SMN2*-Transkription der Effekt von cAMP auf *Smn*-defiziente Motoneurone untersucht. Neben Medikamenten, die das Spleißen von *SMN2* modulieren (Feldkötter et al., 2002; Andreassi et al., 2004), könnte die Hochregulierung der *SMN2*-Transkription durch Substan-

zen, die den *SMN*-Promotor aktivieren, eine vielversprechende Therapiemöglichkeit für die spinale Muskelatrophie darstellen.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die bisherige Erforschung der spinalen Muskelatrophie anhand von Tiermodellen ergab Hinweise auf den der Erkrankung zugrunde liegenden Pathomechanismus. So konnten Rossoll und Kollegen (2003) anhand von primär kultivierten Mausmotoneuronen zeigen, dass *Smn*-defiziente Motoneurone im Vergleich zu Kontrollzellen kleinere Wachstumskegel aufweisen. Zudem konnten sie nachweisen, dass in Motoneuronen von *Smn*-defizienten Mausembryonen ein defektes Zytoskelett aufgrund eines Defizits an β -Aktin vorliegt. Das Zytoskelettprotein β -Aktin übernimmt in Nervenfortsätzen wichtige Funktionen. So bedingt β -Aktin die Anordnung von Transmembranproteinen, wie beispielsweise Ionenkanälen. In diesem Zusammenhang konnten Nishimune et al. (2004) zeigen, dass sich N-Typ spezifische Kalzium-Kanal ($\text{Ca}_v2.2$)-Cluster nach Kontakt mit der $\beta 2$ -Kette eines endplattenspezifischen Laminins (Laminin-221) spontan öffnen, und so einen intrazellulären Kalziumanstieg bewirken. 2007 gelang es Jablonka und Mitarbeitern nachzuweisen, dass in *Smn*-defizienten Motoneuronen die von Nishimune gefundene Anhäufung von Kalzium-Kanälen in der präsynaptischen Membran defekt ist, und es somit zu Erregbarkeitsstörungen der Zellen und zu Axonelongationsdefekten auf synapsenspezifischem Laminin-221 kommt.

Majumder und Kollegen zeigten 2004, dass cAMP aufgrund eines CRE-II Elements im *SMN*-Promotor die *SMN1/SMN2*-Transkription stimuliert, und dadurch den intrazellulären *SMN*-Proteingehalt erhöht. Ausgehend von diesen Ergebnissen ergab sich die allgemeine Fragestellung, ob die cAMP-vermittelte Aktivierung des *SMN*-Promotors in *Smn*-defizienten Motoneuronen von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausembryonen eine kompensierende Wirkung auf die oben beschriebenen, bei SMA vorhandenen motoneuronenspezifischen Defizite hat.

Alle für diese Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit primär kultivierten Motoneuronen des Rückenmarks bzw. neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellen von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausembryonen durchgeführt. Dieses SMA Typ I-Mausmodell wurde gewählt, um der genetischen Situation von schwer betroffenen SMA-Patienten möglichst nahe zu kommen. Ausgehend von den Er-

kenntnissen der oben beschriebenen Studien sollten folgende Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Um herauszufinden, ob die Stimulation des *SMN*-Promotors durch 8-CPT-cAMP beschriebene morphologische Defekte *Smn*-defizienter Motoneurone kompensiert, wurden Kulturen von *Smn*^{-/-}; *SMN2*⁻ und *Smn*^{+/+}; *SMN2*⁻ Mäusen mit 100 µM 8-CPT-cAMP behandelt und hinsichtlich folgender Merkmale mit unbehandelten Kontrollmotoneuronen verglichen:
 - a) Vermessung der Wachstumskegelfläche von *Smn*-defizienten Motoneuronen auf endplattenspezifischem Laminin-221.
 - b) Untersuchung der Verteilung von β-Aktin und der Ca_v2.2-Untereinheit spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle im Wachstumskegel, Axon und Zellkörper *Smn*-defizienter Motoneurone.
2. Vermessung der Axonlänge von auf Laminin-221 kultivierten *Smn*-defizienten Motoneuronen als funktioneller Defekt bei *Smn*-Defizienz und Vergleich mit Motoneuronen, welche in Zellkultur mit 8-CPT-cAMP behandelt wurden.
3. Vergleich der Verteilung von *SMN* und seinem Interaktionspartner hnRNP R innerhalb verschiedener Zellbereiche *Smn*-defizienter Motoneurone in An- und Abwesenheit von 8-CPT-cAMP während der Zellkultur.

3 Material

3.1 Technische Geräte

Elektrophorese-Kammer	PeqLab
Konfokales Mikroskop	Leica TCS 4D Leica SP2
Lichtmikroskop	Leica DM IRB
PCR-Cycler	Eppendorf Mastercycler
Photometer	Eppendorf BioPhotometer
Schüttler	Eppendorf Thermomixer comfort
UV-Transilluminator	INTAS Classic-Box
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R

3.2 Mausmodell $Smn^{-/-};SMN2$

$Smn^{-/-};SMN2$ (zwei Kopien)

Monani et al., 2000b

3.3 Motoneuronzellkultur

3.3.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Chemikalien

B27 Supplement	Gibco
Borsäure	Merck
8-CPT-cAMP	Calbiochem
Ethanol	J. T. Baker
Hanks´ balanced salt solution (HBSS)	Gibco
Horse Serum	Linaris
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax)	Gibco
Laminin-211/221	Chemicon
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Neurobasal (NB)	Gibco
p75-Antikörper (2,4 mg/ml)	Abcam
Poly-DL-Ornithin Hydrobromid	Sigma-Aldrich

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)		Merck
Trypsin		Worthington
Trypsin-Inhibitor		Linaris
Wachstumsfaktoren	BDNF (1 ng/ml)	Chemicon
	CNTF (1 ng/ml)	M. Sendtner, Institut für Klinische Neurobiologie, Würz- burg, Deutschland
Borat-Puffer	0,15 M Borsäure, aqua bidest., pH 8,3, autoklavieren	
Depolarisationslösung	30 mM KCl, 137 mM NaCl, aqua dest.	
Motoneuronen-Medium	Neurobasal-Medium, 10% Horse Serum, 2% B27 Supplement, 500 µM Glutamax	
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	
TRIS-Puffer	10 mM, pH 9,5	
1%iges Trypsin	0,25 g Trypsin-Pulver, 25 ml HBSS	

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

3.4 Immunzytochemie

3.4.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Chemikalien

Aceton	J. T. Baker
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
Mowiol	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Linaris

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Merck
 Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) Sigma-Aldrich

1·TBS-T TRIS-buffered Saline mit Tween;
 20 mM TRIS-HCl, pH 7,6, 0,8% NaCl, 0,1% Tween 20

4 % PFA-Lösung 40 g PFA, 500 ml aqua dest., 1 NaOH-Plätzchen; auf
 60° C erwärmen, pH auf 7,4 einstellen, 410 ml Na₂HPO₄
 (0,2 M) und 90 ml NaH₂PO₄ (0,2 M) zugeben, filtrieren

Mowiol-Präparat 10 g Mowiol, 40 ml PBS (pH 8,0), 20 ml wasserfreies
 Glycerin; 24 Stunden bei 60° C rühren

3.4.2 Antikörper und Farbstoff

Primärantikörper	Verdünnung	Typ, Herkunft	Referenz
β-Aktin	1:500	monoklonal, Maus	Abcam
Ca _v 2.2	1:200	polyklonal, Kaninchen	Sigma
Smn	1:250	monoklonal, Maus	Transduction Laboratories
hnRNP R	1:500	polyklonal, Kaninchen	Rossoll et al., 2002
tau	1:1000	polyklonal, Kaninchen	Sigma

Sekundärantikörper	Verdünnung	Typ, Herkunft	Referenz
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.

<i>Farbstoff</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Referenz</i>
DAPI	1:1000	Sigma

3.5 PCR, RT-PCR und Gelelektrophorese

3.5.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Reagenzien

Agarose	Invitrogen
Betain 5 M	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
dATP, dTTP, dCTP, dGTP (dNTPs)	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Merck
DEPC-Wasser	Invitrogen
DNTP-Mix	Invitrogen
5-FS-Puffer	Invitrogen
Glycerin	Merck
HPLC-Wasser	Merck
MDTT	Invitrogen
Oligo-dT	Invitrogen
<u>Primer für Genotypisierungs-PCR:</u>	
Primer Smn (GMS12, MSNM7, GNA3)	Invitrogen
Primer SMN2 (SMN2ex1f, SMN2ex1r)	Invitrogen
<u>Primer für RT-PCR:</u>	
Primer β -Aktin (3' β -Actin, 5' β -Actin)	MWG-Biotech
Primer Ca _v 2.2 (Cacna1b_2f, Cacna1b_2r)	MWG-Biotech

Primer Elongationsfaktor (ef1s, ef1a)	MWG-Biotech
Primer SMN2 (Ex5fSMA, Ex8rSMA)	Invitrogen
10-Puffer	Biotherm
SuperScript	Invitrogen
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Biotherm
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

6-Ladepuffer	30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol in 1-TAE
1-TAE	0,04 M TRIS·CH ₃ COOH, 0,01 M EDTA, pH 8,0
50-TAE	242 g (2 mol) TRIS, 60 g (1 mol) Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

3.5.2 Molekulargewichtstandards für doppelsträngige DNA

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
------------------------------------	---------------

3.5.3 Oligonukleotidsequenzen

Genotypisierungs-PCR

Smn:

GMS12 5'-GGC CTG GAA TTC AAT ATG CTA GAC TGG CCT GGA GCT
CTT GGC-3'

MSNM7 5'-GGC TTA TCT GGA GTT TCA CAA ATG TCA CCG TTC TTT
AGA G-3'

GNA3 5'-GAA TGT GTC GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA ACG CCA
GGG-3'

SMN2:

SMN2ex1f 5'-CGG AGG TCG TCA CTC TTA AG-3'

SMN2ex1r 5'-GAA GAA TGC TGA GAG CG-3'

RT-PCR

Smn:

Ex2a 5'-GCC ACA GCT TTA TCA TAA GC-3'

Ex8r 5'-GCT CAG CCA CGA CTG GGT AG-3'

SMN2:

Ex5fSMA 5'-CCA CTT ACT ATC ATG CT-3'

Ex8rSMA 5'-CTA CAA CAC CCT TCT CAC AG-3'

β-Aktin:

5' β-Aktin 5'-GAC CTG ACA GAC TAC CTC AT-3'

3' β-Aktin 5'-AGA CAG CAC TGT GTT GCC AT-3'

Ca_v2.2:

Cacna1b-2f 5'-CTG CTG CTG CCT GCG GAG CT-3'

Cacna1b-2r 5'-CAC CGA ATG CCG GGA GTA CTG-3'

ef:

ef1a 5'-CAA CAA TCA GGA CAG CAC AGT C-3'

ef1s 5'-ACA CGT AGA TTC CGG CAA GTC-3'

3.6 RNA- und DNA-Isolierung

3.6.1 Bezugsquellen und Herstellung verwendeter Reagenzien

Chloroform	J. T. Baker
Ethanol	J. T. Baker
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
HPLC-Wasser	Merck
Isopropanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Proteinase K	Roche
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Merck

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck
Trizol	Invitrogen

Lysis-Puffer 10 mM TRIS pH 7,5, 100 mM EDTA, 0,5% SDS

4 Methoden

4.1 Motoneuronzellkultur

Für die Motoneuronzellkultur wurde der ventrolaterale Anteil des lumbalen Rückenmarks 14 Tage alter Mausembryonen (E14) freigelegt. Danach wurde das Rückenmark entnommen, in 180 µl HBSS suspendiert und durch eine 15-minütige Behandlung mit 20 µl 1%igem Trypsin bei 37° C angedaut. Das Versetzen mit 20 µl 0,1%igem Trypsin-Inhibitor führte zur Beendigung der Trypsin-Reaktion. Durch vorsichtiges Trituieren erhielt man eine Einzelzell-Suspension, der anschließend 800 µl Neurobasal-Medium zugegeben wurde.

24-well-Platten (Nunclon™ Surface) wurden mit einer Lösung von monoklonalem p75-Neurotrophinrezeptor-Antikörper (Endkonzentration 10 ng/ml) in 5 ml TRIS-Puffer (10 mM, pH 9,5) für 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend drei Mal mit Neurobasal-Medium gewaschen, um den nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Die so vorbereiteten 24-well-Platten wurden als Panning-Platten genutzt, auf die die Zellsuspension aufgebracht und bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten inkubiert wurde. Die nichtgebundenen Anteile der Zellsuspension wurden durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Neurobasal-Medium entfernt. Durch Zugabe von 500 µl Depolarisationslösung wurde die p75-Motoneuron-Bindung gelöst. Anschließend wurden 500 µl Motoneuronen-Medium zugegeben und die Motoneurone darin suspendiert. Durch Zentrifugieren bei 400 x g für fünf Minuten wurde die Depolarisationslösung von den Zellen getrennt und anschließend der Überstand bis auf etwa 200 µl abgenommen. Danach wurde die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die Zellen mit einer Dichte von 2.000 Zellen/cm² auf 4-well-Platten (Greiner Bio-One) ausplattiert. Diese Platten wurden vorher folgendermaßen vorbereitet:

runde Glasplättchen (Durchmesser 1 cm) wurden mit 70%igem Ethanol abgeflammt und jeweils ein Plättchen in eine 4-well-Vertiefung gelegt. Danach folgten die Überschichtung mit 1 ml 1·PORN und die Inkubation für eine Stunde bei 37° C. Durch dreimaliges Waschen mit HBSS wurde 1·PORN entfernt und die Glasplättchen anschließend mit 75 µl Laminin-211/221 überschichtet. Vor dem Aufbringen der Zellen wurde das nicht gebundene Laminin-211/221 abgesaugt. Als Nährmedium wurde Motoneuronen-Medium (1 ml) verwendet, welches mit CNTF und BDNF jeweils in einer Endkonzentration von 1 ng/mL angereichert wurde. Für die Zellkulturen mit cAMP-Behandlung wurde das Motoneuronen-Medium zusätzlich mit 100 µM 8-CPT-cAMP (aufgelöst in HBSS) versetzt. Eine Motoneuron-Zellkultur wurde sieben Tage lang bei 37° C und 5% CO₂ angelegt und alle zwei Tage wurde das Nährmedium ausgewechselt.

4.2 Immunzytochemie der Motoneurone

Nach siebentägigem Wachstum in der Zellkultur wurden die Motoneurone mit 2 ml 4% PFA-Lösung 10 min fixiert und anschließend mit 1·PBS versetzt. Durch diese Behandlung war eine Lagerung bei 4° C möglich.

Die Glasplättchen (1cm Durchmesser) mit den Motoneuronen wurden für die immunzytochemische Färbung drei Mal mit 1·TBS-T gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit 2 ml -20° C kaltem Aceton für fünf Minuten und wiederholtem dreimaligen Waschen mit 1·TBS-T. Unspezifische Bindungen wurden mit 2 ml 10% BSA in 1·TBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

Der Primärantikörper wurde in den unter 3.4.2 angegebenen Verdünnungen in 1 ml 1·TBS-T mit 1% BSA gelöst. Die Lösung zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde abgesaugt, die Glasplättchen mit 80 µl der Primärantikörperlösung inkubiert und über Nacht bei 4° C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die überschüssige Antikörperlösung durch dreimaliges Waschen mit 1·TBS-T entfernt. Nachfolgend wurde ein erneutes Blockieren mit 1 ml 10% BSA in 1·TBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Der fluoreszierende Sekundärantikörper wurde in den unter 3.4.2 angegebenen Verdünnungen in 1 ml 1·TBS-T mit 1% BSA in 1·TBS-T gelöst. Anschließend

wurden die Glasplättchen mit 80 µl der Sekundärantikörperlösung für 60 Minuten unter Lichtabschluss und bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach folgte dreimaliges Waschen mit 1-TBS-T und das Einbetten der Glasplättchen in Mowiol. Die fertigen Präparate wurden unter Lichtabschluss bei 4° C gelagert.

Mit einem Konfokalen Mikroskop der Firma Leica wurde die Fluoreszenz dargestellt, wobei jeweils identische Einstellungen für Phinole (Blende) und Voltage (Photomultiplier) für zusammengehörige Experimente gewählt wurden.

4.3 DNA-Isolierung

Zur Materialgewinnung für die Genotypisierung wurden die Köpfe der Maus-embryonen in 500 µl Lysis-Puffer gelegt. Um eine Verdauung der Proteine und Freisetzung der DNA zu erreichen, wurde 30 µl Proteinase K zugesetzt und der Ansatz über Nacht bei 60° C in den Schüttler (ca. 750 U * min⁻¹) gestellt.

Am nächsten Tag wurden 430 µl 5% SDS, 170 µl 3 M NaCl und 750 µl Chloroform zugegeben und der Ansatz für zehn Minuten bei 13.500 U* min⁻¹ und 10° C zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl des Überstandes abgenommen und mit 250 µl HPLC-Wasser und 750 µl Chloroform versetzt. Es folgte erneutes Zentrifugieren für zehn Minuten bei 13.500 U* min⁻¹ und 10° C. Zur weiteren Aufreinigung der Proben wurde dieser Schritt ein bis zwei Mal wiederholt.

Danach wurden erneut 500 µl Überstand abgenommen und mit 1 ml 100% Ethanol bei Raumtemperatur für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, 500 µl 70% Ethanol zu dem Sediment gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgegossen und das gereinigte DNA-Sediment nach vollständiger Trocknung in HPLC-Wasser für mindestens 30 Minuten bei 37° C im Schüttler oder über Nacht bei 4° C gelöst.

Mithilfe eines Photometers wurde die erreichte DNA-Konzentration bestimmt und auf eine Endkonzentration von 100 - 150 ng/µl für die PCR mit HPLC-Wasser verdünnt.

4.4 RNA-Isolierung

Als Material für die RNA-Extraktion dienten Kulturen von neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellen (NSCs). Zur Ablösung der NSCs wurden 500 µl Trizol in die Kulturschale gegeben und die Zellen durch Reibung vom Grund gelöst. Die Probe wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, 100 µl Chloroform zugesetzt und bei 4° C für 15 Minuten bei 14.000 U* min⁻¹ zentrifugiert.

Die wässrige Phase des Überstandes (ca. 250 µl) wurde abgenommen und mit 250 µl Isopropanol versetzt. Es folgte die Inkubation der Proben bei 4° C für zehn Minuten mit anschließender Zentrifugation bei 4° C für zehn Minuten.

Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und nach Zugabe von 500 µl 70% Ethanol zum Sediment wurde erneut zentrifugiert (fünf Minuten bei 4° C). Abschließend wurde der Überstand erneut abgegossen und das Sediment nach Trocknung in 10 - 20 µl HPLC-Wasser aufgenommen.

Die erreichte RNA-Konzentration wurde mittels eines Photometers bestimmt und auf eine für die RT-PCR geeignete Endkonzentration von 150 - 200 ng/µl mit HPLC-Wasser verdünnt.

4.5 PCR zur Genotypisierung

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit bereits bekannter Sequenz. Im ersten Schritt des Reaktionszyklus wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhen der Temperatur auf ca. 90° C denaturiert. Danach folgt bei etwa 50° C die Anlagerung der Primer jeweils komplementär zur Sequenz an den 5`-Enden der Einzelstränge. Beendet wird der Reaktionszyklus bei 60 - 70° C durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase, die beide Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplettiert. Die erhöhte Temperatur ist bei der Reaktion notwendig, um eine unspezifische Hybridisierung zu vermeiden. Die mehrfache Wiederholung dieses Reaktionszyklus hat eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA zur Folge.

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde eine PCR des *Smn*-Gens durchgeführt. Der Ansatz für die Knock-out-PCR mit *Smn*-Primern enthielt folgende Komponenten:

1 µl	DNA (Endkonzentration 100 - 150 ng/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer 1 (GNA3) (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (GMS12) (10 pmol/µl)
5 µl	10-Puffer
10 µl	Betain (5 M)
0,7 µl	Taq Polymerase
Ad 50 µl	HPLC-H ₂ O

Der gesamte Ansatz wurde kurz im Vortex geschüttelt und bis zum Start der Reaktion auf Eis gekühlt. Im PCR-Cycler wurde folgendes Programm absolviert: *1 Zyklus*, 94° C / 3 min; *38 Zyklen*, bestehend aus **(1)** 94° C / 0,5 min, **(2)** 54° C / 0,5 min, **(3)** 72° C / 1 min; *1 Zyklus*, 72° C / 5 min.

Der Ansatz für die Wildtyp-PCR mit Smn-Primern enthielt folgende Komponenten:

1 µl	DNA (Endkonzentration 100 - 150 ng/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer 1 (GMS12) (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (MSNM7) (10 pmol/µl)
5 µl	10-Puffer
0,7 µl	Taq Polymerase
Ad 50 µl	HPLC-H ₂ O

Der gesamte Ansatz wurde kurz im Vortex geschüttelt und bis zum Start der Reaktion auf Eis gekühlt. Im PCR-Cycler wurde folgendes Programm absolviert: *1 Zyklus*, 94° C / 3 min; *38 Zyklen*, bestehend aus **(1)** 94° C / 0,5 min, **(2)** 52° C / 0,5 min, **(3)** 72° C / 1 min; *1 Zyklus*, 72° C / 5 min.

Anhand dieser beiden Polymerase-Kettenreaktionen war die Unterscheidung der Genotypen in Wildtyp-Mäuse, heterozygote Mäuse und Mutanten sicher möglich. Als Nachweis, dass die Mäuse auch transgen für das humane *SMN2*-Gen sind, wurde ein spezieller *SMN2*-PCR-Ansatz verwendet:

2 µl	DNA (Endkonzentration 100 - 150 ng/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer 1 (SMN2ex1f) (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (SMN2ex1r) (10 pmol/µl)
5 µl	10-Puffer
0,5 µl	Taq Polymerase
Ad 50 µl	HPLC-H ₂ O

Für die *SMN2*-PCR wurden die folgenden Bedingungen gewählt: 1 Zyklus, 94° C / 3 min; 33 Zyklen, bestehend aus **(1)** 94° C / 0,5 min, **(2)** 55° C / 0,5 min, **(3)** 72° C / 0,75 min; 1 Zyklus, 72° C / 5 min.

4.6 RT-PCR

Zur Untersuchung der Transkriptmenge von *Smn*, *SMN2*, *β-Aktin* und *Ca_v2.2* wurde eine so genannte RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) durchgeführt. Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, ist es notwendig, die abgelesene RNA zu untersuchen. Da bei der Amplifikation von DNA mithilfe der PCR spezifische DNA-Polymerasen eingesetzt werden, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren, muss zuerst eine Reverse Transkriptase – eine RNA abhängige DNA-Polymerase – verwendet werden. Die Reverse Transkriptase ermöglicht die Umschreibung der RNA in cDNA, welche im Anschluss als Ausgangsprodukt für eine PCR genutzt werden kann.

Vor Beginn der Reaktion wurden 1 µg RNA in DEPC-Wasser gelöst und kurz auf dem Vortex geschüttelt. Danach wurde 1 µl Oligo-dT zugegeben und der Ansatz für 10 Minuten bei 70° C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 4 µl 5-FS-Puffer, 2 µl MDTT und 1 µl DNTP-Mix zugefügt, die Probe kurz auf dem Vortex geschüttelt, zentrifugiert und dann für 2 Minuten bei 45° C inkubiert.

Zum Starten der Reaktion folgte die Zugabe von 1 µl SuperScript in den Ansatz und die Inkubation für eine Stunde bei 45° C. Danach wurde die RT-PCR durch Einfrieren des Ansatzes gestoppt. Mit der durch diese Reaktion erhaltenen cDNA wurden Polymerasekettenreaktionen durchgeführt. Der Ansatz enthielt bei allen PCRs folgende Komponenten, wurde kurz im Vortex geschüttelt und bis zum Start der Reaktion auf Eis gekühlt.

1 µl	cDNA (Endkonzentration 150 - 200 ng/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
5 µl	10-Puffer
0,4 µl	Taq Polymerase
Ad 50 µl	HPLC-H ₂ O

Im PCR-Cycler wurden die nachfolgend aufgeführten Programme für die jeweiligen Primer durchgeführt.

- **Smn (SMNEx2a, SMNEx8r):**
1 Zyklus, 94° C / 3 min; 30 Zyklen, bestehend aus (1) 94° C / 0,5 min, (2) 54° C / 0,5 min, (3) 72° C / 0,5 min; 1 Zyklus, 72° C / 5 min
- **SMN2 (Ex5fSMA, Ex8rSMA):**
1 Zyklus, 94° C / 3 min; 26 Zyklen, bestehend aus (1) 94° C / 0,5 min, (2) 56° C / 0,5 min, (3) 72° C / 0,5 min; 1 Zyklus, 72° C / 5 min
- **Elongationsfaktor (ef1a, ef1s):**
1 Zyklus, 94° C / 3 min; 24 Zyklen, bestehend aus (1) 94° C / 0,5 min, (2) 54° C / 0,5 min, (3) 72° C / 0,5 min; 1 Zyklus, 72° C / 5 min
 Diese PCR diente als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge
- **β-Aktin (3` β-Actin, 5` β-Actin):**
1 Zyklus, 94° C / 3 min; 35 Zyklen, bestehend aus (1) 94° C / 0,5 min, (2) 52° C / 0,5 min, (3) 72° C / 0,5 min; 1 Zyklus, 72° C / 5 min
- **Ca_v2.2 (Cacna1b_2f, Cacna1b_2r)**
1 Zyklus, 94° C / 3 min; 40 Zyklen, bestehend aus (1) 94° C / 0,5 min, (2) 54° C / 0,5 min, (3) 72° C / 0,5 min; 1 Zyklus, 72° C / 5 min

4.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Ladung und Größe. Zur Herstellung des Gels wurde 1,5 g Agarose pro 100 ml 1-TAE verwendet. Der Ansatz wurde zum Lösen der Agarose erhitzt und nach dem Abkühlen mit 8 - 10 µl Ethidiumbromid versetzt. Das 1,5% Agarose-

Gel wurde in eine mit 1-TAE gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Die durch Polymerasekettenreaktionen amplifizierten DNA-Ansätze wurden jeweils mit 10 µl 6-Ladepuffer vermischt. Anschließen wurden je 30 µl in die Vertiefungen des Gels pipettiert. Als DNA-Marker wurde für alle durchgeführten PCRs 10 µl des 100 bp plus Markers verwendet.

Die Gelelektrophorese lief bei einer Spannung von etwa 180 V und 120 mA Strom ab. Das im Agarose-Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und erlaubt so das Sichtbarmachen der DNA-Fragmente mit Hilfe von UV-Licht.

4.8 Datenanalyse

Für die Quantifizierung der Neuritenlängen und der Wachstumskegelflächen wurden Motoneurone ausgewählt, die eine klare Unterscheidung zwischen Axonen und Dendriten zuließen. Axone wurden als Fortsätze identifiziert, die mindestens zweimal länger sind als Dendriten. Es wurde nur der längste axonale Zweig gemessen. Dafür wurden die Zellkulturen mit dem konfokalen Mikroskop analysiert und die Axonlänge mit der Scion Image Software (Scion Corporation, Inc.) gemessen.

Für die Kulturen wurden drei Mutanten- und Kontrollembryonen (n = 3) von unterschiedlichen Würfen verwendet.

Zur Quantifizierung der β -Aktin- und N-Typ Ca^{2+} -Kanal-Verteilung sowie der Smn- und hnRNP R-Verteilung erfolgte die Messung der Signalintensität der Färbung im Zellkörper, Axon und Wachstumskegel als Intensität (Quantum Levels) der einzelnen Pixel (arbitrary unit) mit Hilfe der AIDA Software (Raytest, Deutschland). Dabei wurde die Hintergrundintensität für jedes einzelne Motoneuron gemessen.

Messwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengelegt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM angeben. Die statistische Auswertung der Signifikanzen erfolgte durch one-way ANOVA unter Benutzung der GraphPad Prism 4 Software.

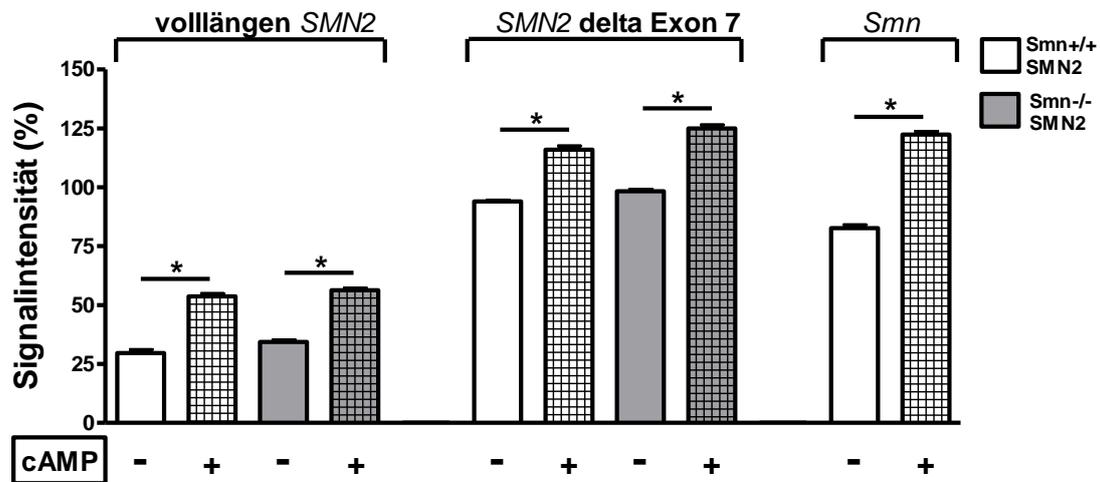
5 Ergebnisse

5.1 Effekte von 8-CPT-cAMP auf *Smn*/*SMN* und *SMN2*

5.1.1 Bestimmung der Transkriptionsrate von *Smn* und *SMN2*

Wie bereits in der Einleitung angeführt, enthält die *SMN*-Promotor Region ein CRE II bindendes Element, welches Effekte von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelt, und so eine Erhöhung des *SMN*-Transkript- und Proteingehalts in Maushepatozyten bewirkt (Majumder et al., 2004). Ausgehend von diesen Ergebnissen, stellte sich die Frage, ob cAMP zu einer Hochregulierung des *SMN2*-Transkripts in Neuronen führt. Um dieser Frage nachzugehen wurden neurosphärenbildende kortikale Vorläuferzellen (NSCs) von *Smn*^{+/+};*SMN2*- und *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mausembryonen mit 100 µM 8-CPT-cAMP behandelt. 8-CPT-cAMP ist ein lipophiler Aktivator der cAMP-abhängigen Proteinkinase und wurde zur Behandlung der Zellkulturen verwendet, da es sehr gut membrangängig ist, eine verbesserte Phosphodiesterase-Stabilität aufweist und im Vergleich zu cAMP ein höheres Aktivierungspotential hat. Da die Motoneuronenzahl, welche von einem *Smn*-defizienten (*Smn*^{-/-};*SMN2*) Mausembryo isoliert werden konnte, für quantitative RT-PCR- Analysen nicht ausreichte, wurde die Verwendung von NSCs notwendig. Anschließend folgten quantitative RT-PCR-Analysen der Transkriptmenge von volllängen *SMN2*, trunziertem *SMN2* (*SMN2* delta exon 7) und Maus-*Smn* von mit 8-CPT-cAMP behandelten und unbehandelten neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellkulturen.

A



B

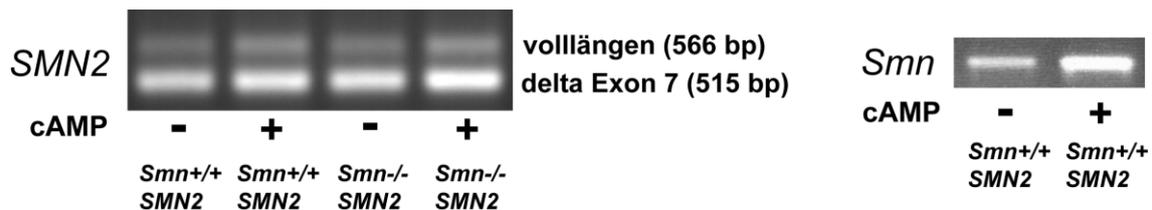


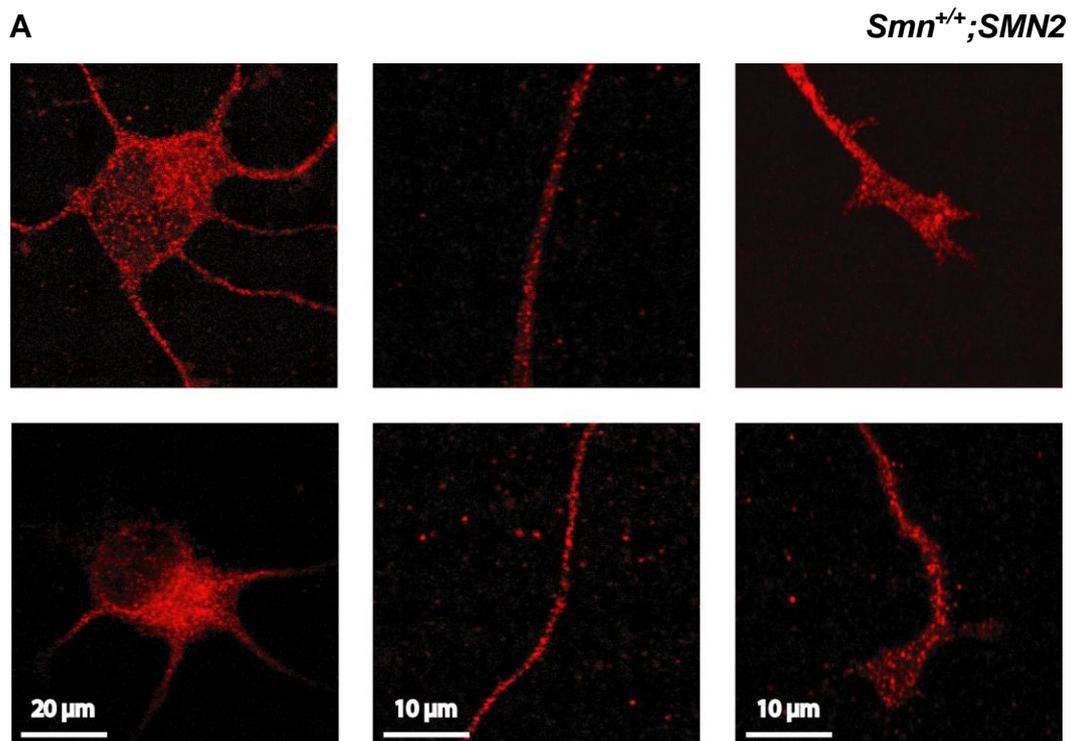
Abbildung 9. Darstellung der quantitativen RT-PCR-Analyse (A) der vollängen *SMN2*-, *SMN2* delta Exon 7- und Maus-*Smn*-Transkriptmenge in Kontroll- (weiße Balken) und *Smn*-defizienten NSCs (graue Balken), mit (karierte Balken) bzw. ohne (weiße und graue Balken) 8-CPT-cAMP-Behandlung. Die Zugabe von 100 μ M 8-CPT-cAMP in die Zellkulturen bewirkte eine Zunahme des vollängen *SMN2*- und des trunkierten *SMN2*-Transkripts sowohl in Kontroll- als auch in *Smn*-defizienten kortikalen Vorläuferzellen. In Kontrollzellen zeigte sich zudem ein signifikanter Anstieg der *Smn*-Transkriptmenge unter 8-CPT-cAMP-Behandlung. Die Sternchen geben das Signifikanzniveau an: * $P < 0,05$. Die Quantifizierung erfolgte als Signalintensität in Prozent (%). B zeigt die Ergebnisse der RT-PCR.

Sowohl in Kontroll- als auch in *Smn*-defizienten neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellen zeigte sich eine signifikante Zunahme des Transkriptgehalts an vollängen und trunkiertem (delta Exon 7) *SMN2* unter 8-CPT-cAMP-Behandlung. NSCs von Kontroll-Mausembryonen wiesen eine signifikante Erhöhung des Maus-*Smn*-Transkripts in Anwesenheit von 8-CPT-cAMP auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die *SMN2*-Transkription, aber auch die *Smn*-Transkription bei Kontrollzellen unter Behandlung mit 8-CPT-cAMP stimuliert wird.

5.1.2 Verteilung von Smn/SMN-Protein in Motoneuronen

Die positiven Effekte von zyklischem Adenosinmonophosphat auf Smn-defiziente neurosphärenbildende kortikale Vorläuferzellen führten zur Hypothese, dass die 8-CPT-cAMP-Behandlung auch eine Hochregulierung des SMN-Proteingehalts in Mäusen bewirken kann und damit Morphologie und Funktionen von Smn-defizienten Motoneuronen wiederhergestellt werden könnten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde zunächst die Verteilung von Smn/SMN im Zellkörper, Axon und Wachstumskegel kultivierter Motoneurone untersucht. Primäre Motoneurone von Smn-defizienten Mausembryonen wurden mit 100 μM 8-CPT-cAMP behandelt und mit unbehandelten *Smn*^{+/+}; *SMN2*⁻ und *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen verglichen. Nach siebentägiger Zellkultur folgte die Fixierung und Antikörperfärbung gegen Smn/SMN.



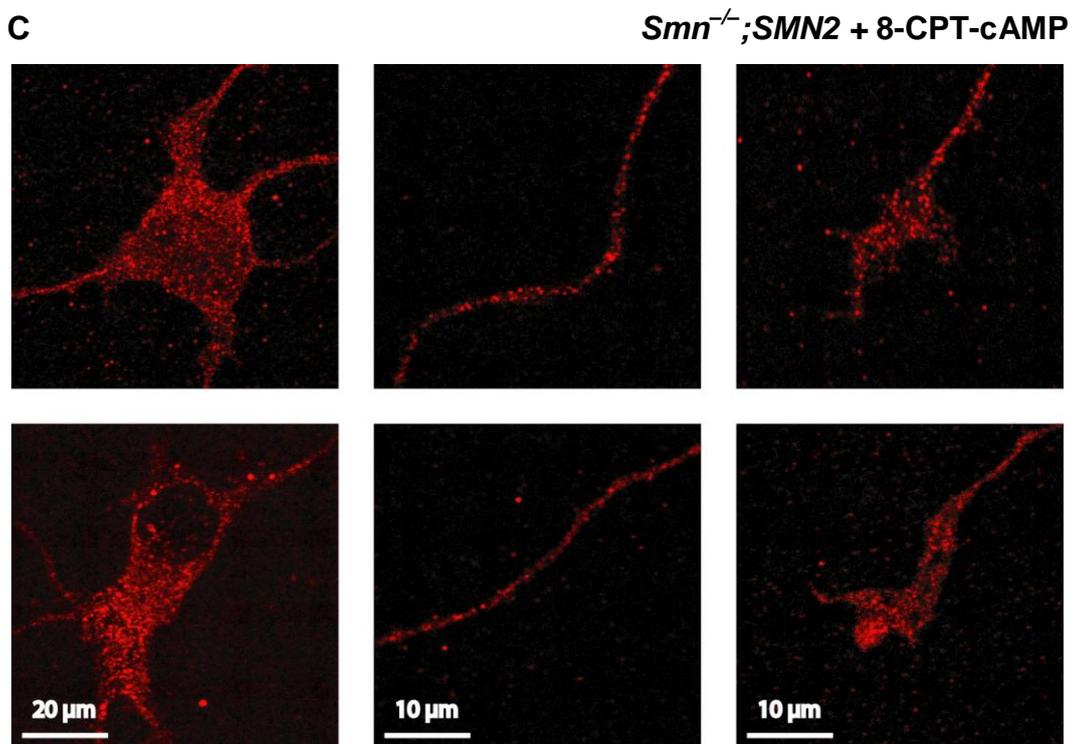
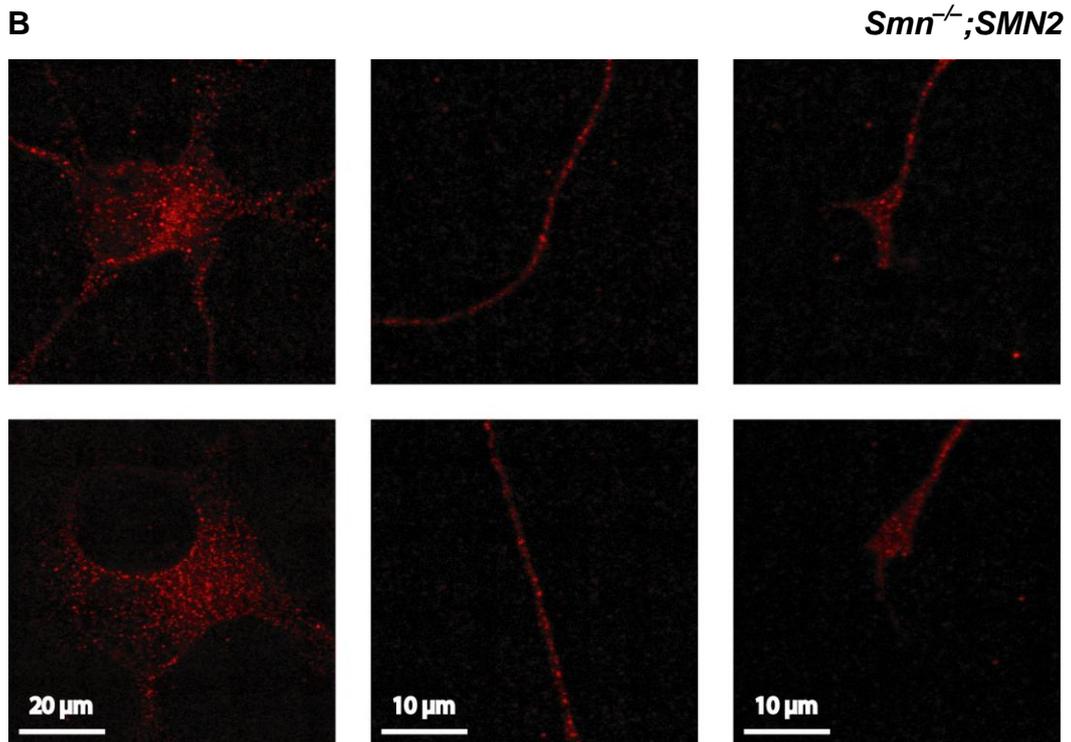


Abbildung 10. Smn/SMN-Verteilung in Zellkörpern, Axonen und Wachstumskegeln von *Smn*^{+/-};SMN2- (A), *Smn*^{-/-};SMN2- (B) und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2- Motoneuronzellkulturen (C). Motoneurone von Smn-defizienten Mausembryonen zeigten eine signifikante Verringerung der intrazellulären SMN-Signalintensität in allen untersuchten Zellbereichen. Behandlung der Smn-defizienten Zellkulturen mit 100 μM 8-CPT-cAMP erhöhte die SMN-Signalintensität in Perikaryen, Axonen und Wachstumskegeln.

Smn^{+/+};*SMN2*- und mit 8-CPT-cAMP behandelte *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneurone wiesen eine ähnliche Verteilung des Smn/SMN-Proteins auf, mit unterschiedlichem Proteingehalt in den untersuchten Zellkompartimenten. Unbehandelte Smn-defiziente Motoneurone hingegen zeigten eine signifikante Reduktion der intrazellulären Smn-Proteinverteilung, die alle Zellbereiche (Zellkörper, Axon, Wachstumskegel) betraf. Zur Quantifizierung des Proteingehalts wurden die Smn/SMN-spezifischen Fluoreszenzintensitäten als willkürliche Werte (arbitrary units) bestimmt. Die SMN-Proteinmenge von kultivierten Smn-defizienten Motoneuronen nahm unter 8-CPT-cAMP-Behandlung signifikant zu, verglichen mit unbehandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen. Allerdings reichte die gemessene Signalintensität der Zellkörper und Wachstumskegel nicht an das Niveau von Kontroll-Motoneuronen heran.

Tabelle 2. Die Smn/SMN-Signalintensität wurde als arbitrary unit (willkürlicher Wert) quantifiziert. *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneurone wiesen im Zellkörper, Axon und Wachstumskegel signifikant reduzierte Mengen an SMN auf, im Vergleich zu Kontroll-Motoneuronen. Behandlung der Smn-defizienten Zellen mit 8-CPT-cAMP bewirkte einen Anstieg des SMN-Gehaltes in allen untersuchten Kompartimenten. Im Bereich des Axons erreichten die SMN-Mengen der behandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen Kontrollniveau.

	<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> + 8-CPT-cAMP
Zellkörper	32,2 ± 1,9	17,5 ± 0,9	22,6 ± 1,2
Axon	16,8 ± 1,2	10,5 ± 0,8	16,2 ± 1,3
Wachstumskegel	25,9 ± 1,7	9,9 ± 0,6	20,0 ± 1,5

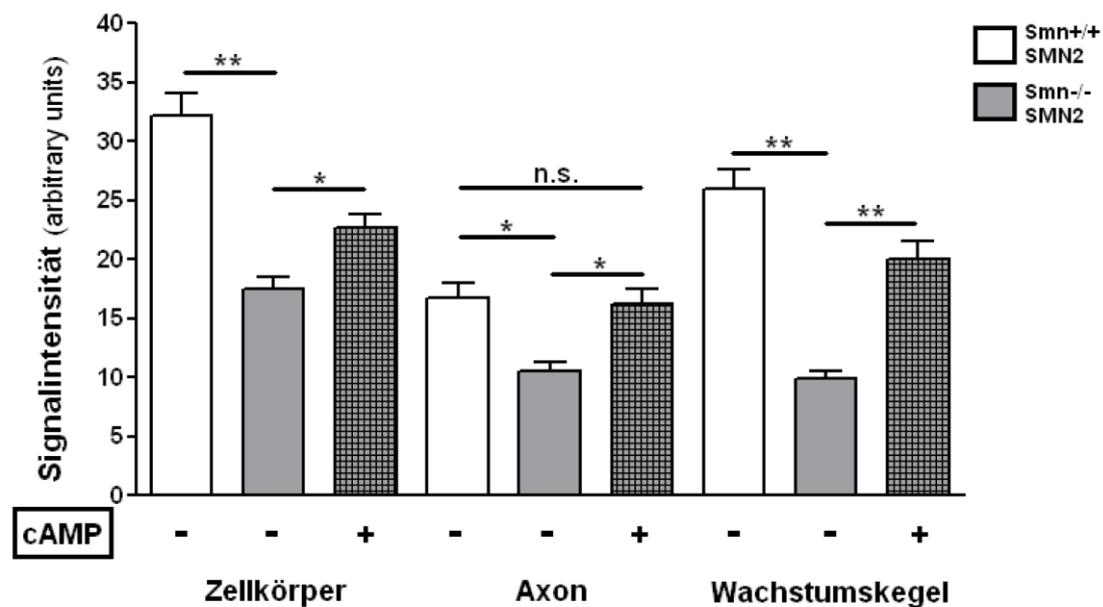


Abbildung 11. Darstellung der Smn/SMN-Signalintensitätsverteilung im Zellkörper, Axon und Wachstumskegel von *Smn^{+/+};SMN2*- (weiße Balken), *Smn^{-/-};SMN2*- (graue Balken) und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn^{-/-};SMN2*-Motoneuronen (karierte Balken). Smn-defiziente Motoneurone zeigten in allen untersuchten Zellbereichen signifikant reduzierte SMN-Signalintensitäten im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Behandlung der *Smn^{-/-};SMN2*-Motoneurone mit 8-CPT-cAMP in der Zellkultur führte zu einem signifikanten Anstieg der SMN-Signalintensität in den untersuchten Zellkompartimenten. Die Sternchen geben das Signifikanzniveau an: * P < 0,05 ** P < 0,01

Diese Ergebnisse zeigen, dass 8-CPT-cAMP zu einer Erhöhung des SMN-Proteingehaltes in primär kultivierten Motoneuronen von Smn-defizienten Mäusen führen kann.

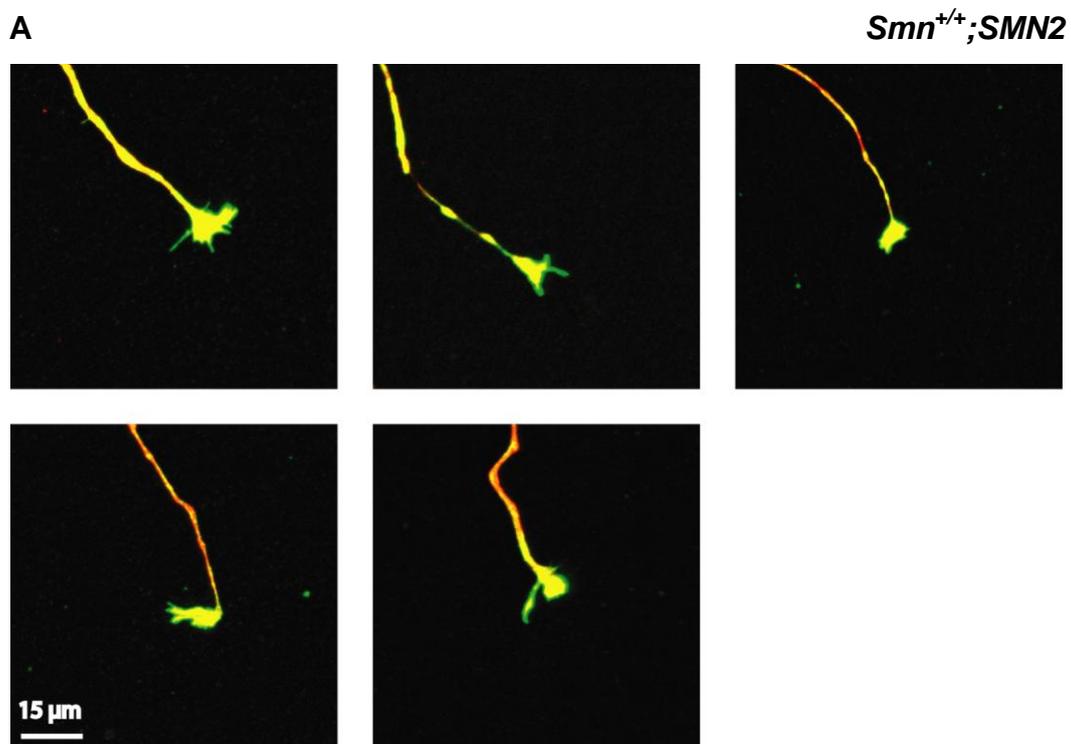
5.2 Effekte von 8-CPT-cAMP auf untersuchte Zellkompartimente kultivierter Motoneurone

5.2.1 Größenbestimmung von Wachstumskegeln

Die Wachstumskegel von Motoneuronen stellen denjenigen Bereich des Axons dar, in dem das gerichtete Längenwachstum stattfindet. Eine weitere wichtige Funktion dieser Axonterminalen ist die Beteiligung an der Ausbildung der Präsynapse, z. B. einer Motorendplatte, welche die notwendige Verbindung zum Zielgewebe schafft. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Defizit an β -Aktin-mRNA und -Protein in den distalen Axonkompartimenten zu

einer reduzierten Wachstumskegelgröße in *Smn*-defizienten Motoneuronen führt (Rossoll et al., 2003a).

Um die Morphologie und vor allem die Größe der Wachstumskegel auf Laminin-211/221 genauer zu untersuchen, wurden *Smn*^{+/+};*SMN2*⁻, *Smn*^{-/-};*SMN2*⁻ und mit 8-CPT-cAMP behandelte *Smn*^{-/-};*SMN2*⁻-Motoneurone nach siebentägiger Zellkultur mit 4% PFA fixiert und anschließend eine Antikörperfärbung gegen Tau und β -Aktin durchgeführt. Die Verwendung des Laminin-Mix (Laminin-211/221) war nötig, da Laminin-221 nicht isoliert erhältlich ist.



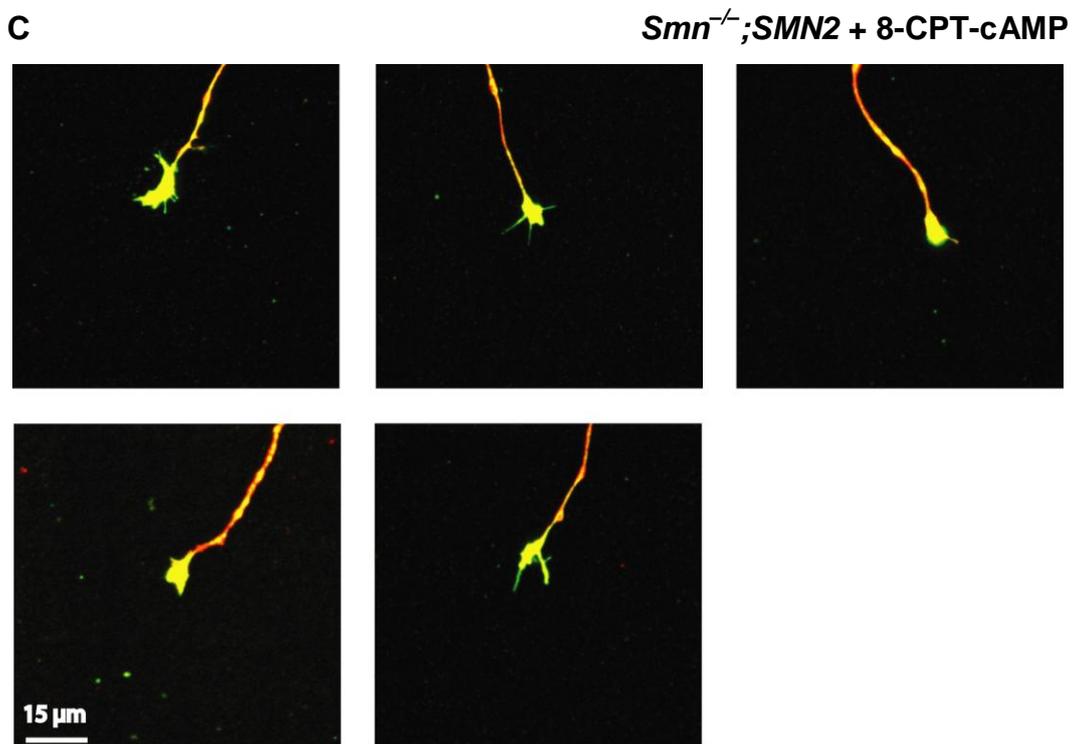
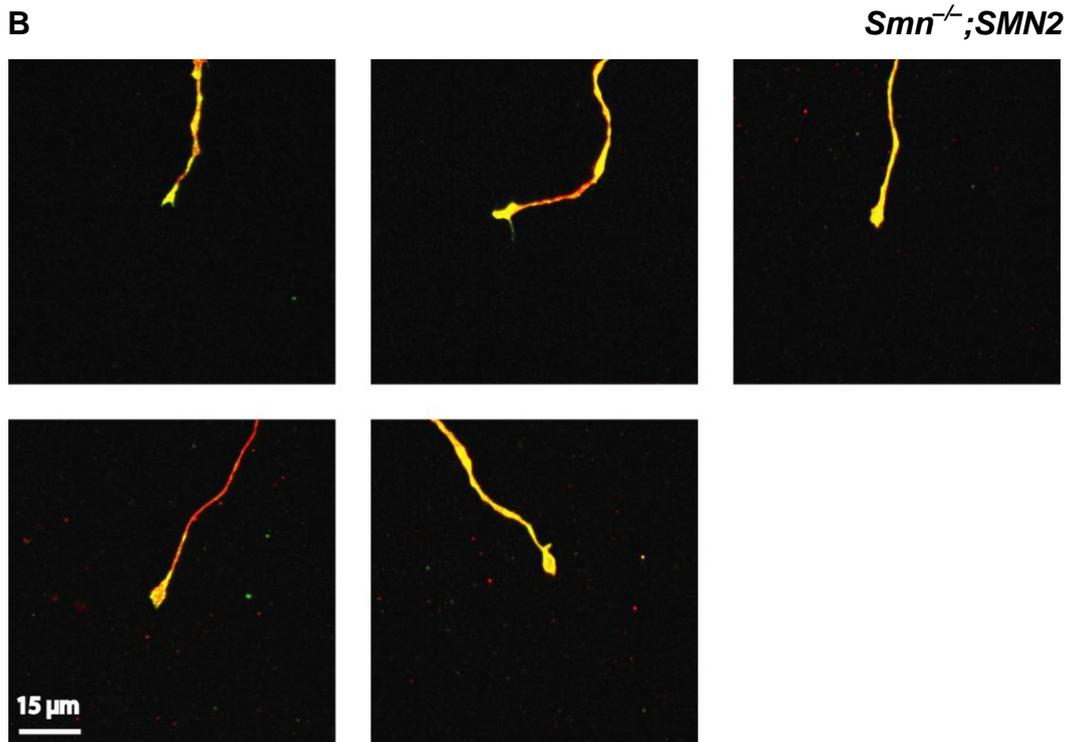


Abbildung 12. Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Wachstumskegelmorphologie von *Smn*^{+/-};SMN2- (A), *Smn*^{-/-};SMN2- (B) und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2- Motoneuronen (C). Die Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen erschienen deutlich verkleinert. Zellkulturen mutierter Motoneurone, welche mit 8-CPT-cAMP behandelt wurden, zeigten größere Wachstumskegel als nicht behandelte Zellen.

Die Messungen der Wachstumskegel von Smn-defizienten Motoneuronen zeigten eine signifikante Reduktion der Fläche ($32,3 \pm 3,1 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu Kontroll-Motoneuronen ($47,6 \pm 4,9 \mu\text{m}^2$). Bei den mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen ergab die Ausmessung der Wachstumskegelfläche eine signifikante Größenzunahme ($43,6 \pm 4,1 \mu\text{m}^2$) verglichen mit den unbehandelten Smn-defizienten Motoneuronen ($32,3 \pm 3,1 \mu\text{m}^2$). Zudem unterschied sich die Fläche der Wachstumskegel nicht signifikant von der Wachstumskegelfläche der Kontrollzellen. Die Messergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt und in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

Tabelle 3. Die Flächen der Wachstumskegel waren bei *Smn*^{-/-};*SMN2*- gegenüber *Smn*^{+/+};*SMN2*-Motoneuronen auf Laminin-211/221 signifikant verringert. Mit 8-CPT-cAMP behandelte Smn-defiziente Motoneurone zeigten eine deutliche Zunahme der Wachstumskegelfläche im Vergleich zu unbehandelten Motoneuronen.

Motoneurone	Fläche der Wachstumskegel
<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	$47,6 \pm 4,9 \mu\text{m}^2$
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	$32,3 \pm 3,1 \mu\text{m}^2$
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> + 8-CPT-cAMP	$43,6 \pm 4,1 \mu\text{m}^2$

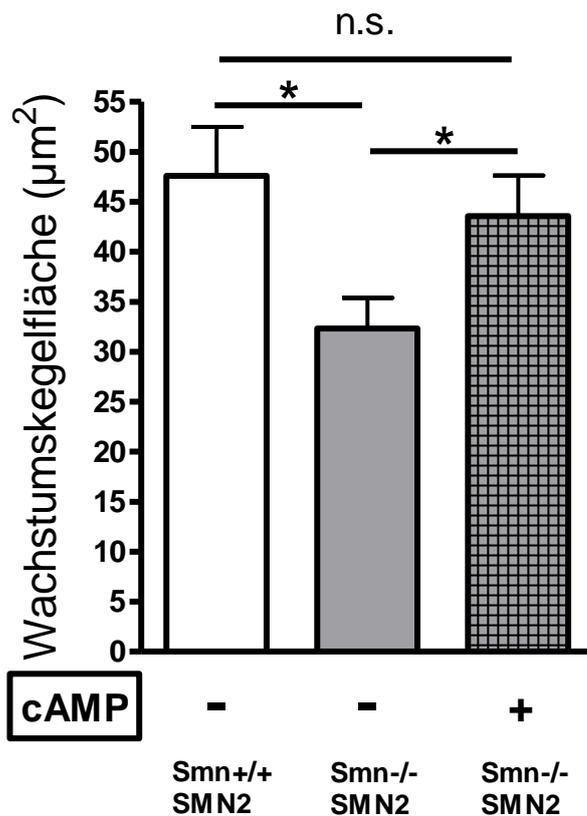


Abbildung 13. Motoneurone von Kontroll- und Smn-defizienten Mäusen wurden sieben Tage auf Laminin-211/221 kultiviert, gegen Tau und β -Aktin gefärbt und die Fläche der axonalen Wachstumskegel ausgemessen. *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone wiesen signifikant geringere Wachstumskegelflächen als Kontroll- oder mit 8-CPT-cAMP behandelte Smn-defiziente Motoneurone auf. *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone, die mit 8-CPT-cAMP kultiviert wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg der Wachstumskegelfläche mit Annäherung an Kontrollniveau. Die Sternchen geben die Signifikanz an: * $P < 0,05$

Diese Ergebnisse zeigen, dass 8-CPT-cAMP zu einer Vergrößerung der Fläche der Wachstumskegel bei Smn-defizienten Motoneuronen führt, die mit der Ausprägung von Kontroll-Wachstumskegeln vergleichbar ist.

5.2.2 Verteilung von β -Aktin in Motoneuronen

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die Vergrößerung der Wachstumskegel von mit 8-CPT-cAMP behandelten Smn-defizienten Motoneuronen auf eine Erhöhung der β -Aktin-Anreicherung in den distalen Axonen zurückzuführen ist. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden zunächst Übersichtsaufnahmen von kultivierten *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen mit und ohne 8-CPT-cAMP-Behandlung angefertigt.

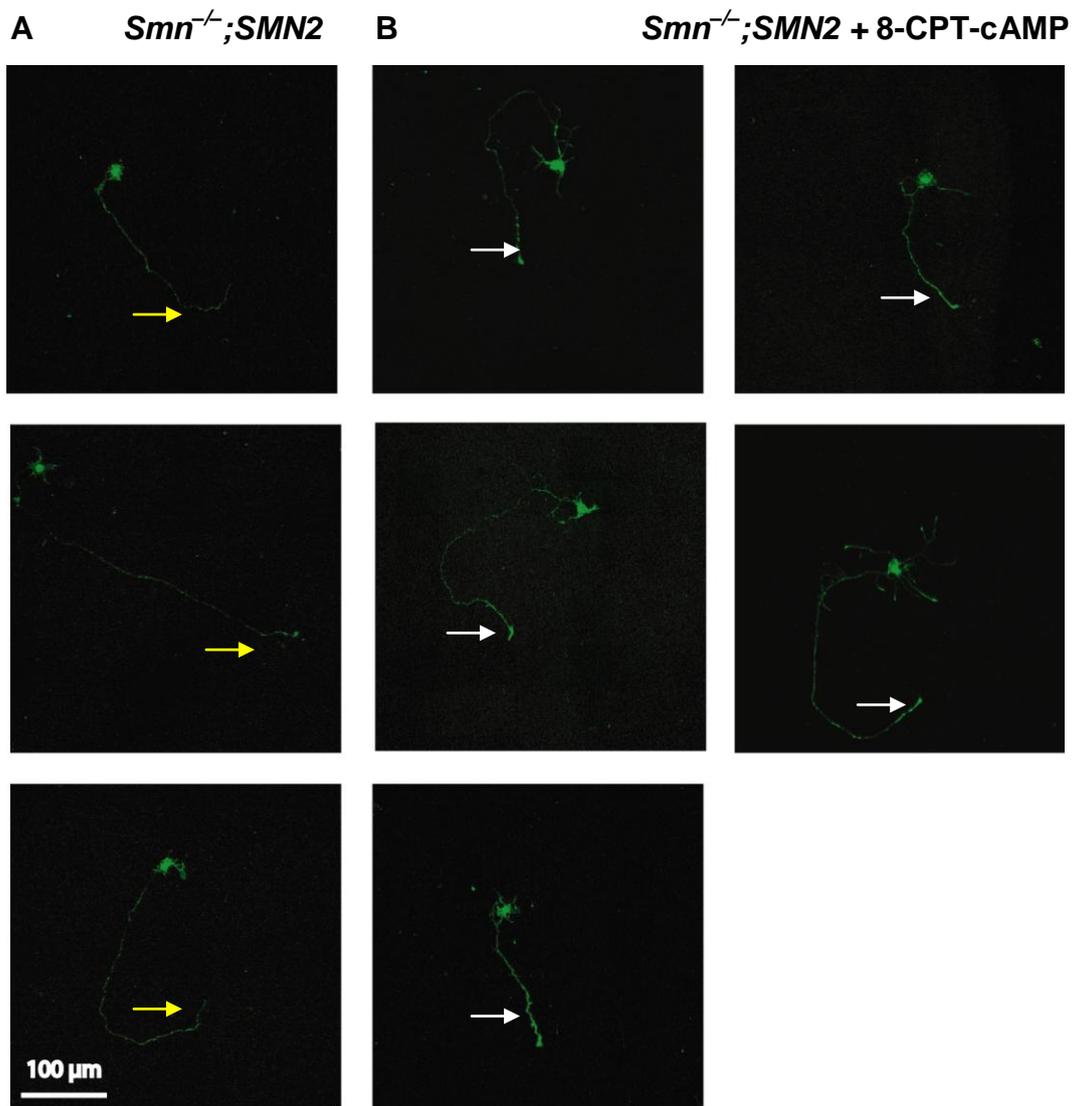


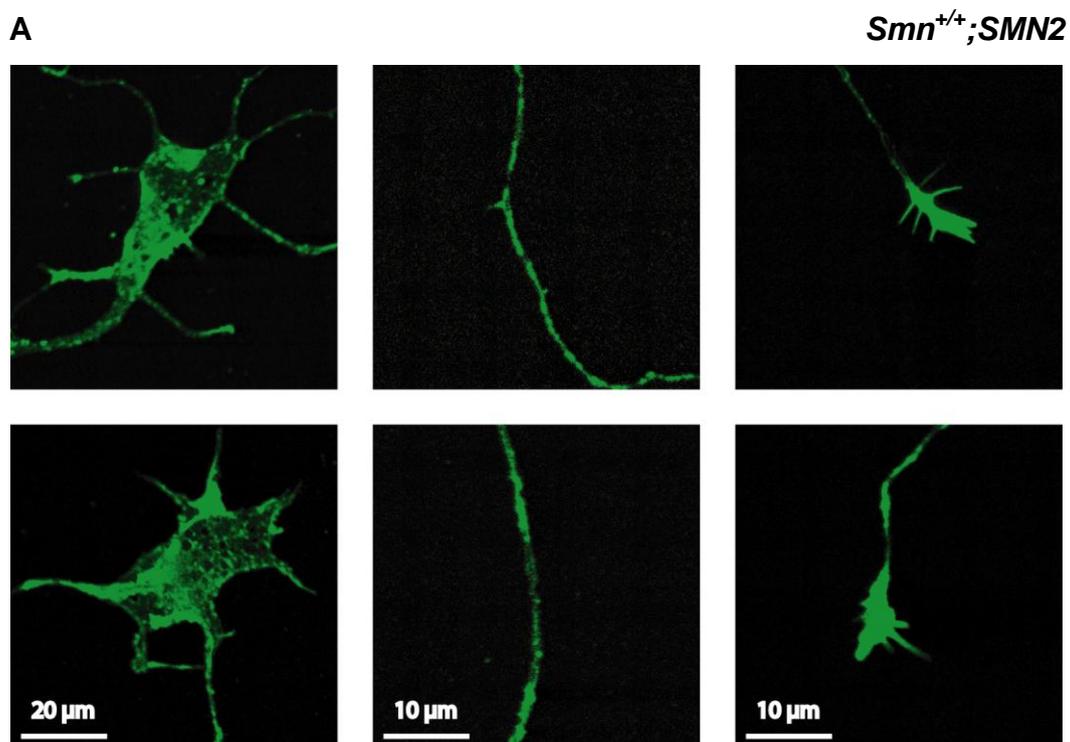
Abbildung 14. Verteilung des Zytoskelettproteins β -Aktin in von *Smn*^{-/-};SMN2-Mausembryonen isolierten, primär kultivierten Motoneuronen ohne (A) bzw. mit (B) 8-CPT-cAMP Behandlung. Unbehandelte *Smn*-defiziente Motoneurone zeigten eine geringere Intensität der β -Aktin-Färbung im Bereich des Axons und eine fehlende Akkumulation des Proteins im distalen Axon und Wachstumskegel (gelbe Pfeile). Die Behandlung der Zellkulturen mit 8-CPT-cAMP führte zu einer Signalintensitätszunahme im distalen Teil des Axons (weiße Pfeile).

Aktin ist ein Zytoskelettprotein, welches in drei Isoformen – α -, β - und γ -Aktin – vorkommt. Die Isoform β -Aktin findet sich vorwiegend im Nervensystem und spielt eine entscheidende Rolle beim Auswachsen von Nervenzellfortsätzen. Daher finden sich größere Mengen von β -Aktin vor allem im Bereich der Neuriten. Frühere Studien zeigten, dass das proximale Axonkompartiment von *Smn*^{+/+};SMN2-Motoneuronen wenig β -Aktin enthält, während es im distalen

Axon zu einer deutlichen Zunahme des β -Aktin-Gehaltes kommt. Bei *Smn*-defizienten Motoneuronen hingegen, findet sich keine distale Akkumulation von β -Aktin, und die starke Anfärbung des Wachstumskegels, wie sie bei *Smn*^{+/+};SMN2-Motoneuronen zu beobachten ist, fehlt ebenfalls (Rossoll et al., 2003a).

Die mit 8-CPT-cAMP kultivierten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen zeigten eine deutliche Zunahme an β -Aktin im distalen Axon und im Wachstumskegel, verglichen mit unbehandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen. Sowohl bei unbehandelten als auch bei den mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen ließ sich eine starke Anfärbung des Zellkörpers erkennen.

Zur Quantifizierung des β -Aktin-Gehaltes wurden Messungen der Signalintensität eines gegen β -Aktin eingesetzten fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers von herausvergrößerten Zellkörpern, distalen Axonen und Wachstumskegeln durchgeführt. Die Messung der Signalintensität ließ somit Rückschlüsse auf den β -Aktin-Gehalt zu.



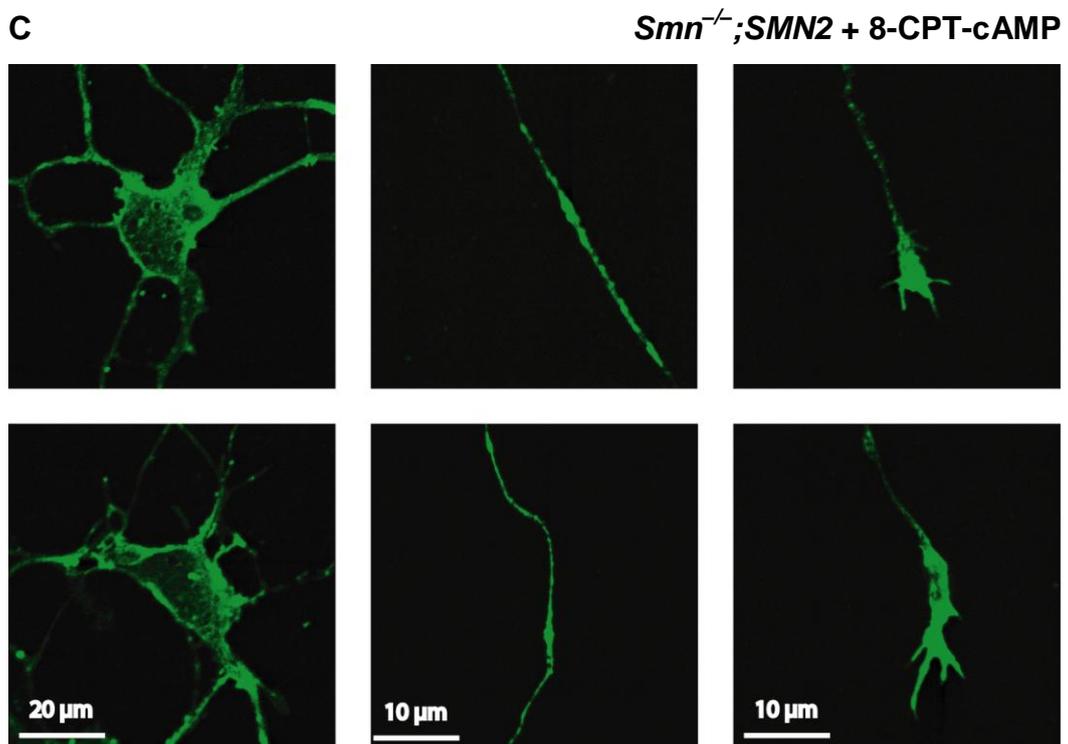
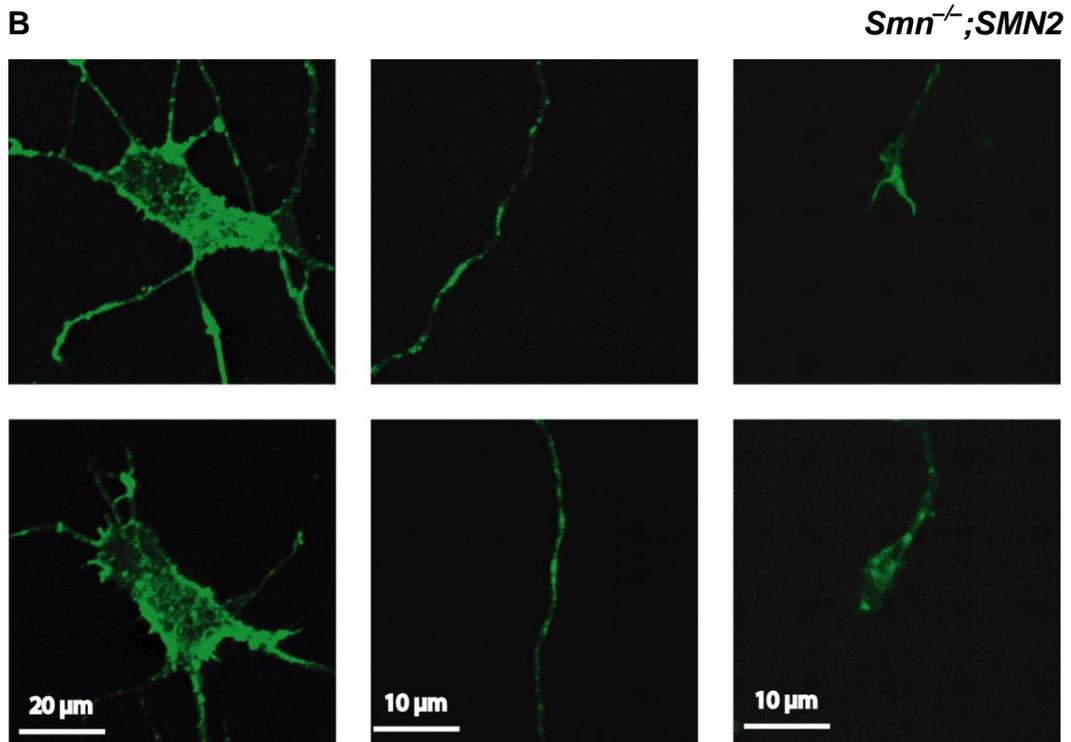


Abbildung 15. Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Zellkompartimente (Soma, distales Axon, Wachstumskegel) primär kultivierter Motoneurone mit einem Antikörper gegen β -Aktin. Die Akkumulation von β -Aktin im Bereich des Wachstumskegels, die bei $Smn^{+/+};SMN2$ - (A) und mit 8-CPT-cAMP behandelten $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen (C) gefunden werden konnte, fehlte bei unbehandelten $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen (B).

Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Signalintensität, angegeben als willkürliche Werte (arbitrary units) im Bereich des distalen Axons ($22,9 \pm 2,1$) und Wachstumskegels ($9,3 \pm 0,9$) von *Smn*-defizienten Motoneuronen verglichen mit der Intensität von *Smn*^{+/+};*SMN2*-Motoneuronen ($34,5 \pm 1,7$ bzw. $32,3 \pm 3,8$). Im Zellkörper hingegen fand sich kein signifikanter Unterschied in der Signalintensität zwischen *Smn*^{-/-};*SMN2*- und *Smn*^{+/+};*SMN2*-Motoneuronen. Distale Axone und Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen, die mit 8-CPT-cAMP behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen eine signifikante Zunahme der Signalintensität ($30,9 \pm 2,9$ bzw. $26,2 \pm 3,9$), die an das Niveau von Kontrollzellen heranreichte.

Tabelle 4. Messung der Signalintensität im Zellkörper, distalen Axon und Wachstumskegel von *Smn*^{+/+};*SMN2*-, *Smn*^{-/-};*SMN2*- und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen. Die Messergebnisse sind als arbitrary units (willkürliche Werte) aufgeführt. *Smn*-defiziente Motoneurone zeigten eine signifikant verminderte Signalintensität im Bereich des distalen Axons und des Wachstumskegels. Die Behandlung der Motoneuronkulturen mit 8-CPT-cAMP führte zu einer signifikanten Zunahme der β -Aktin-Signalintensität in diesen Zellbereichen.

	<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> + 8-CPT-cAMP
Zellkörper	$48,9 \pm 4,4$	$45,1 \pm 3,1$	$48,7 \pm 3,2$
distales Axon	$34,5 \pm 1,7$	$22,9 \pm 2,1$	$30,9 \pm 2,9$
Wachstumskegel	$32,3 \pm 3,8$	$9,3 \pm 0,9$	$26,2 \pm 3,9$

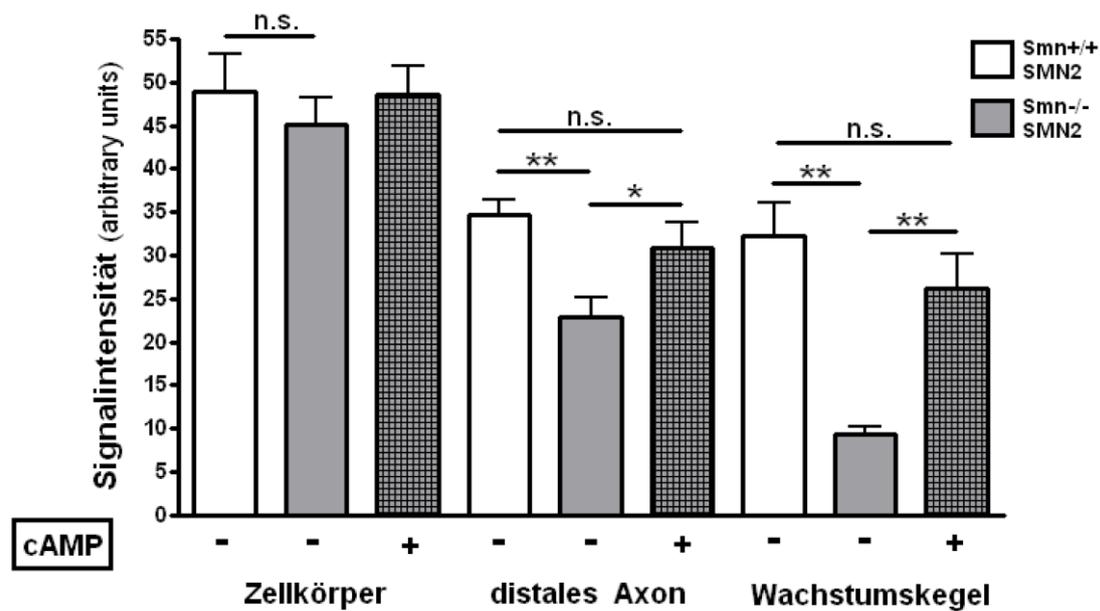


Abbildung 16. Die β -Aktin-Signalintensität wurde als arbitrary unit (willkürlicher Wert) in Zellkörpern, distalen Axonen und Wachstumskegeln von $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneuronen (weiße Balken), $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen (graue Balken) und mit 8-CPT-cAMP behandelten $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen (karierte Balken) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Bereich des Zellkörpers. Smn -defiziente Motoneurone wiesen im distalen Axon und Wachstumskegel eine signifikante ($P < 0,01$) Verringerung der Signalintensität auf. Die mit 8-CPT-cAMP behandelten Smn -defizienten Motoneuronen unterschieden sich hingegen nicht signifikant von Kontrollzellen. Die Sternchen bezeichnen das Signifikanzniveau: * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Durch die Experimente konnte gezeigt werden, dass $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone auf Laminin-211/221 eine Störung der β -Aktin-Verteilung mit geringeren Mengen an β -Aktin im distalen Axon und im Wachstumskegel aufweisen, und dass die Behandlung der Zellkulturen mit 8-CPT-cAMP zu einem Anstieg des β -Aktin-Gehaltes im distalen Zellkompartiment führt.

5.2.3 Vergleich der Verteilung von N-Typ Kalzium-Kanälen und β -Aktin

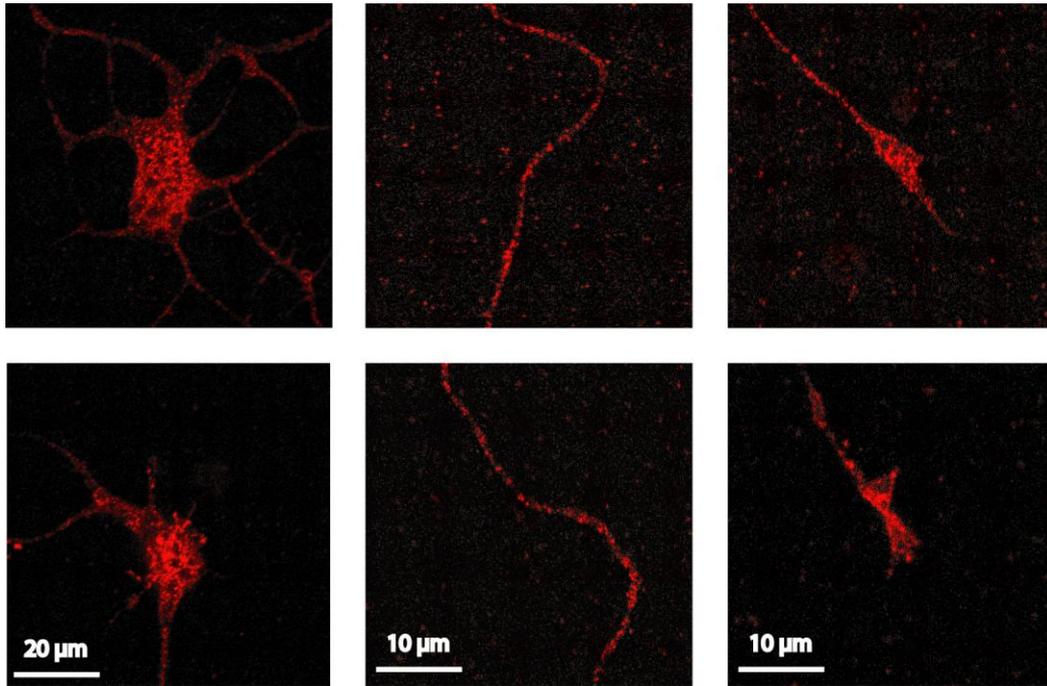
Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist zur Ausbildung einer funktionierenden Synapse die Differenzierung von Axonterminalen zu Präsynapsen notwendig, welche nach Kalziumeinstrom eine spezifische Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt ermöglicht (Son et al., 1999; Santafé et al., 2001; Kittel et al., 2006). In embryonalen Motoneuronen sind für diesen Kalziumeinstrom mit nachfolgender Transmitterfreisetzung hauptsächlich N-Typ Ca^{2+} -Kanäle verantwortlich (Urbano et al., 2002; Spafford und Zamponi, 2003).

Ein wichtiger Bestandteil des synaptischen Spalts der neuromuskulären Endplatte stellt die β 2-Untereinheit des Glykoproteins Laminin dar, welche in Wechselwirkung mit der α -Untereinheit (Ca_v) von spannungsabhängigen N-Typ Ca^{2+} -Kanälen steht (Nishimune et al., 2004). Die β 2-Untereinheit des Laminins bindet direkt an die porenformende α -Untereinheit der Ca^{2+} -Kanäle und führt zu einer Anhäufung weiterer Kanäle in der präsynaptischen Membran. Wie Nishimune et al. (2004) zeigen konnten, interagieren die $\text{Ca}_v2.1$ - und $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit mit β 2-Laminin. Die Axonterminalen von Motoneuronen enthalten zum Zeitpunkt der Geburt hauptsächlich die $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit (N-Typ Kalzium-Kanäle), die in den ersten Lebenswochen durch die $\text{Ca}_v2.1$ -Untereinheit (P/Q-Typ Kalzium-Kanäle) ersetzt wird.

Immunhistochemische Färbungen ermöglichten die Untersuchung der Verteilung von N-Typ Ca^{2+} -Kanälen in den Zellkörpern, distalen Axonen und Wachstumskegeln von embryonalen Motoneuronen. Dazu wurden $\text{Smn}^{+/+};\text{SMN2}$ -, $\text{Smn}^{-/-};\text{SMN2}$ - und mit 8-CPT-cAMP behandelte $\text{Smn}^{-/-};\text{SMN2}$ -Motoneurone nach siebentägiger Zellkultur mit Antikörpern gegen die α 2-Kette der $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit, hier in rot gezeigt, angefärbt.

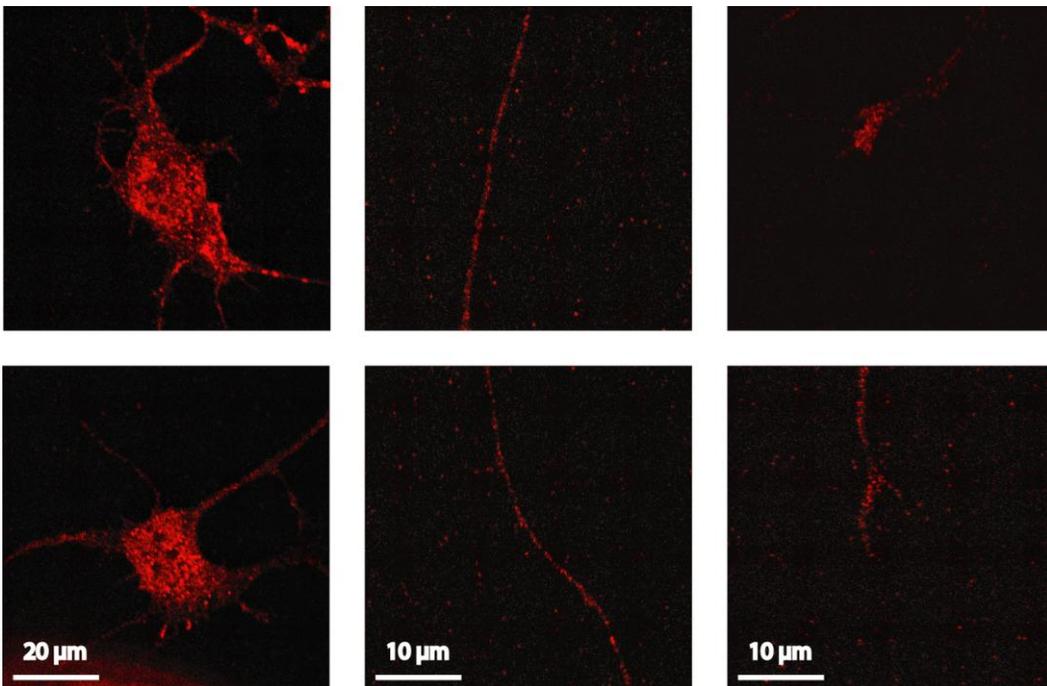
A

Smn^{+/+};SMN2



B

Smn^{-/-};SMN2



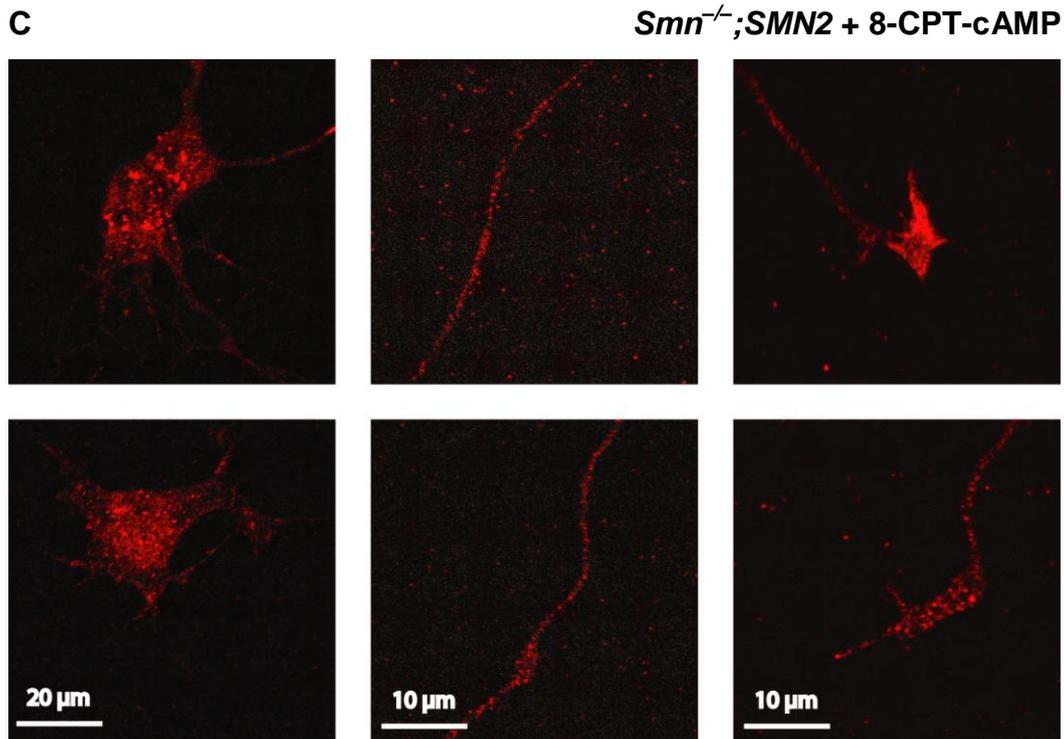


Abbildung 17. Darstellung von Zellkörpern, Axonen und Wachstumskegeln primär kultivierter Motoneurone mit bzw. ohne 8-CPT-cAMP-Behandlung der Zellkulturen. Immunfluoreszenzfärbung von *Smn*^{+/+}; **SMN2**- (A), *Smn*^{-/-}; **SMN2**- (B) und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-}; **SMN2**-Motoneuronen (C) mit anti-Ca_v2.2-Antiserum. Axone und Wachstumskegel *Smn*-defizienter Motoneurone ohne 8-CPT-cAMP-Behandlung der Zellkulturen zeigten geringere Akkumulationen der Ca_v2.2-Untereinheit als Kontroll- und mit 8-CPT-cAMP-behandelte *Smn*-defiziente Motoneurone.

Die Färbung gegen die embryonal hauptsächlich vorhandene Ca_v2.2-Untereinheit zeigte eine signifikant reduzierte Signalintensität im Bereich des Wachstumskegels von *Smn*-defizienten Motoneuronen ($8,7 \pm 1,1$) verglichen mit der Intensität von *Smn*^{+/+}; **SMN2**-Motoneuronen ($21,9 \pm 2,1$). Eine Intensitätsabnahme fand sich auch im distalen Axon von *Smn*^{-/-}; **SMN2**-Motoneuronen ($4,3 \pm 0,6$ vs. $7,3 \pm 1,4$). Im Gegensatz dazu standen die Beobachtungen am Zellkörper. Hier fand sich kein Unterschied in der Signalintensität zwischen *Smn*^{-/-}; **SMN2**- und *Smn*^{+/+}; **SMN2**-Motoneuronen. Im Vergleich zu unbehandelten *Smn*^{-/-}; **SMN2**-Motoneuronen zeigten die distalen Axone und Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen, die mit 8-CPT-cAMP behandelt wurden, eine signifikante Zunahme der Signalintensität ($8,6 \pm 2,1$ bzw. $21,5 \pm 1,9$), die an das Niveau von Kontrollzellen heranreichte.

Tabelle 5. Die Signalintensität, quantifiziert als willkürliche Werte (arbitrary units), des fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers gegen das Ca_v2.2-Protein in Zellkörpern von *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen unterschied sich nicht signifikant von Kontrollzellen. Im distalen Axon und Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Zellen fanden sich signifikant reduzierte Signalintensitäten im Vergleich zu Kontrollen. Behandlung der *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneurone mit 8-CPT-cAMP während der Zellkultur bewirkte eine Zunahme der Ca_v2.2-Signalintensität, die sich nicht signifikant von Kontrollzellen unterschied.

	<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> + 8-CPT-cAMP
Zellkörper	44,1 ± 2,6	41,8 ± 1,6	46,4 ± 2,1
distales Axon	7,3 ± 1,4	4,3 ± 0,6	8,6 ± 2,1
Wachstumskegel	21,9 ± 2,1	8,7 ± 1,1	21,5 ± 1,9

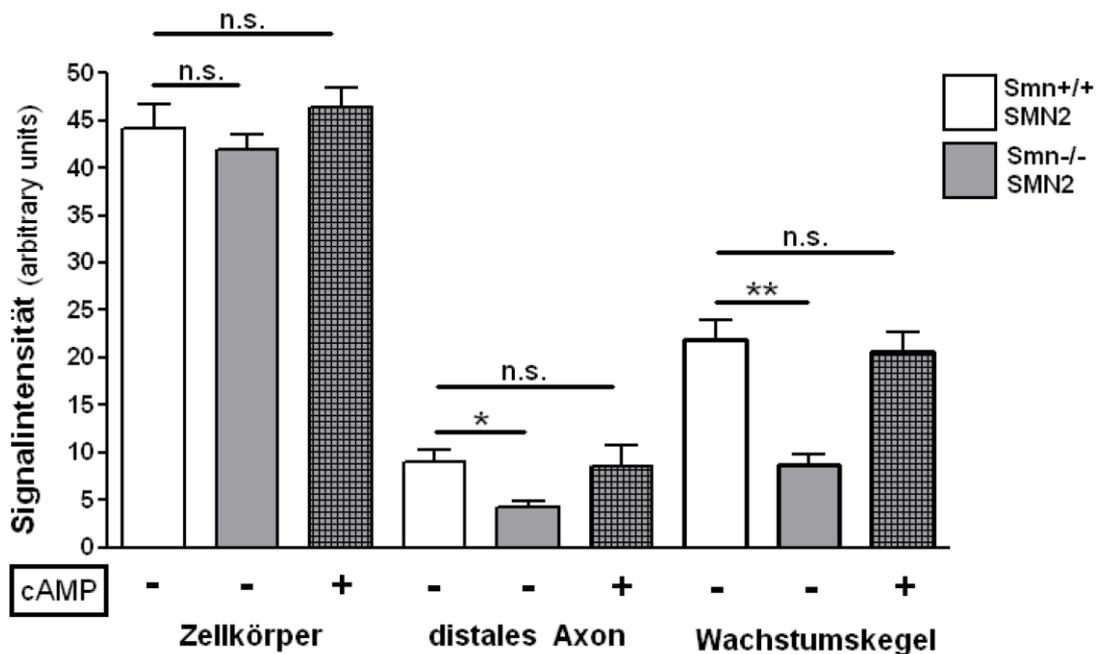
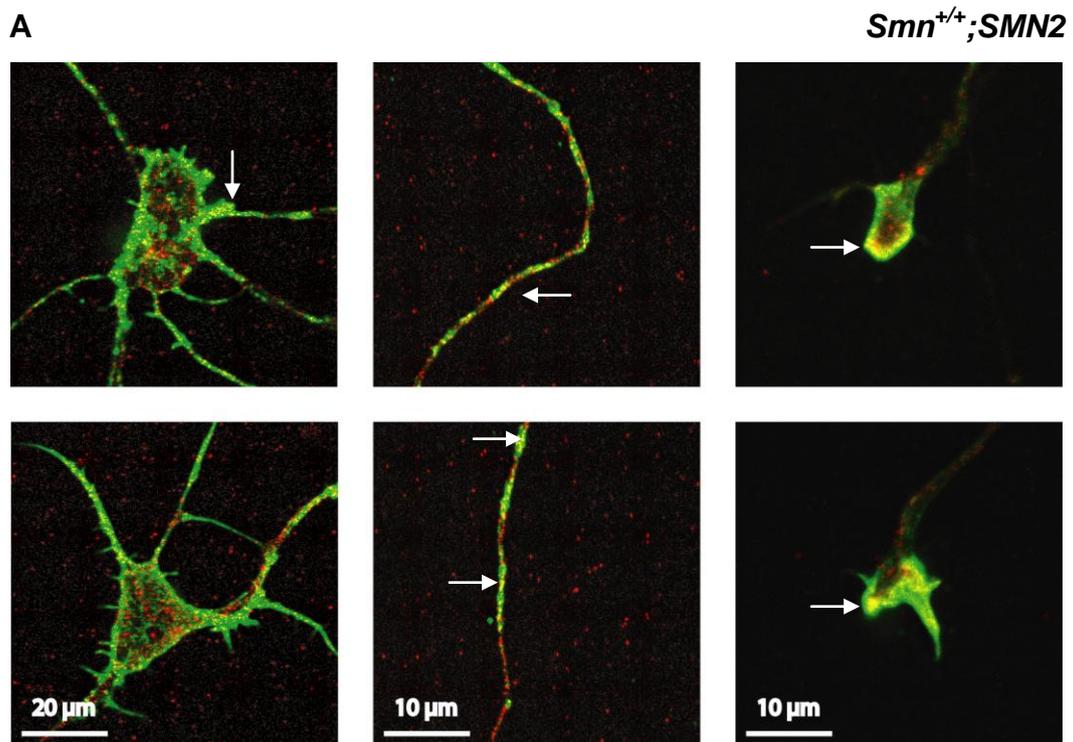


Abbildung 18. Motoneurone von *Smn*^{+/+};*SMN2*- und *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mäusen wurden auf Laminin-211/221 kultiviert und gegen Ca_v2.2 angefärbt. Die indirekte Quantifizierung des Proteingehaltes als arbitrary units (willkürliche Werte) erfolgte durch Messung der Signalintensität eines fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers gegen Ca_v2.2. *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneurone (graue Balken) zeigten im distalen Axon und Wachstumskegel signifikant verringerte Signalintensitäten im Vergleich zu Kontroll-Motoneuronen (weiße Balken). Behandlung der *Smn*-defizienten Motoneurone mit 8-CPT-cAMP (karierte Balken) während der Zellkultur führte zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Signalintensität in diesen Zellkompartimenten. Die Sternchen geben das Signifikanzniveau an: * P < 0,05 ** P < 0,01.

Diese Ergebnisse wiesen eine starke Ähnlichkeit zu den Resultaten der oben beschriebenen β -Aktin-Verteilung auf, woraufhin sich die Frage stellte, ob die

Ca_v2.2-Untereinheit der spannungsabhängigen N-Typ Ca²⁺-Kanäle in Zellkörpern, Axonen und Wachstumskegeln mit β-Aktin kolokalisiert.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen gegen die α2-Kette der Ca_v2.2-Untereinheit, rot gezeigt, und gegen β-Aktin, grün dargestellt, angefertigt. Gelbe Zellbereiche wiesen auf eine Kolokalisation der Proteine hin.



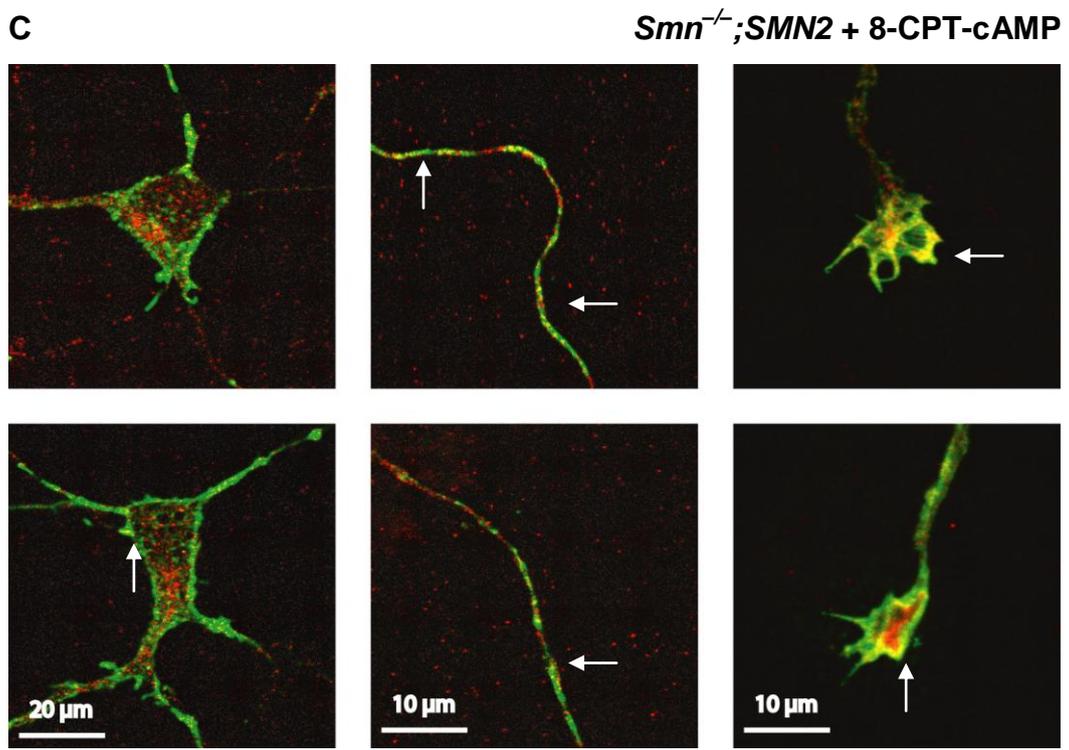
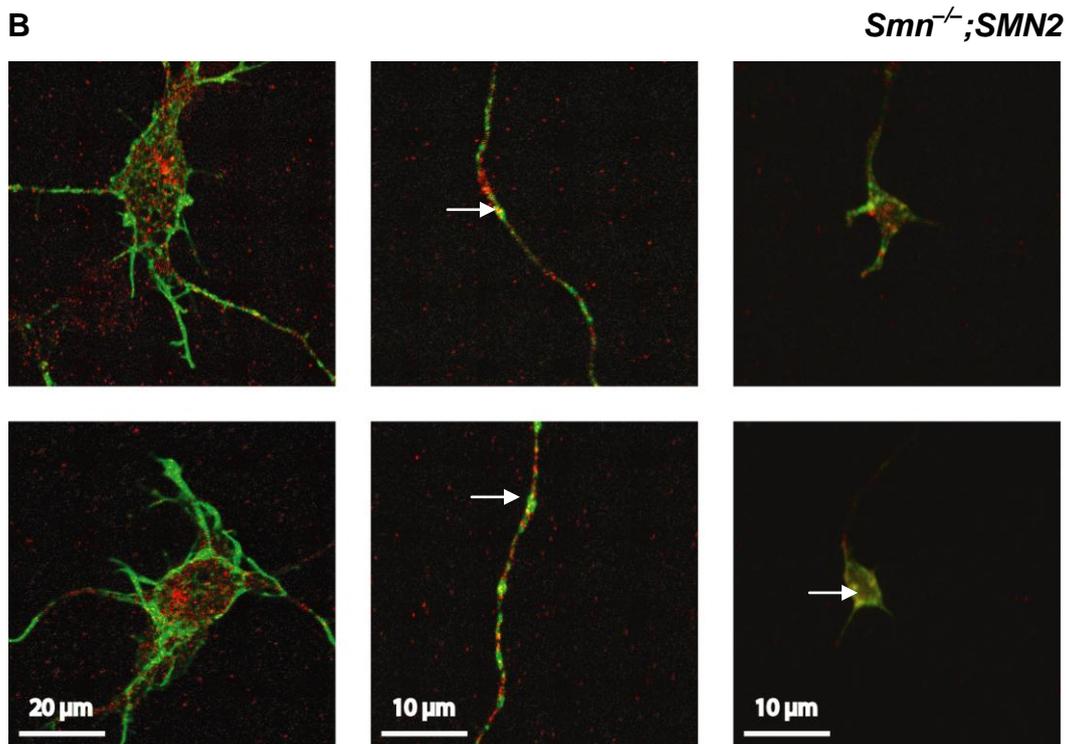


Abbildung 19. Immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen die α_2 -Kette der $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit (rot) und β -Aktin (grün). Die weißen Pfeile zeigen einige Bereiche, in denen beide Proteine kolokalisieren. Dargestellt sind jeweils typische Beispiele für Zellkörper, distale Axone und Wachstumskegel von Kontroll- (A), mit 8-CPT-cAMP behandelten (C) und unbehandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen (B).

Im Zellkörper zeigte sich sowohl bei den *Smn*-defizienten als auch Kontroll-Motoneuronen eine geringe Kolo­kalisierung von β -Aktin und $\text{Ca}_v2.2$, die punktförmig imponierte. Auffällig war die zentrale Konzentration der $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit, während sich β -Aktin überwiegend in den peripheren Bereichen des Zellkörpers befand und sich in die abgehenden Zellfortsätze ausbreitete. Das distale Axon war durch abschnittsweise vorkommende Überlappungen der beiden Proteine charakterisiert. Dazwischen fanden sich Bereiche, die nur β -Aktin oder die $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit enthielten. Diese Beobachtungen ließen sich bei allen untersuchten Motoneuronen machen. Die Wachstumskegel von *Smn*^{+/+};*SMN2*-Motoneuronen und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen hingegen wiesen eine stärkere Überlappung der beiden Proteine auf, die sich weniger punktförmig als flächig darstellte. In den Wachstumskegeln der unbehandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen fand sich wiederum eine punktförmige, geringere Kolo­kalisierung von β -Aktin und der $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit, verglichen mit Kontroll-Motoneuronen.

5.2.4 Bestimmung der Transkriptionsrate von β -Aktin und $\text{Ca}_v2.2$

Wie bereits oben beschrieben, führte die Behandlung von *Smn*-defizienten Motoneuronen mit 8-CPT-cAMP zu einer Akkumulation von β -Aktin im distalen Axon und zu einer Vermehrung der $\text{Ca}_v2.2$ -Untereinheit im Wachstumskegel. Um zu ermitteln, ob 8-CPT-cAMP auch zu einer Erhöhung des β -Aktin- und $\text{Ca}_v2.2$ -Transkriptgehaltes führt, wurden quantitative RT-PCR Analysen von neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellen (NSCs), welche ausreichend Zellmaterial boten, durchgeführt. Dazu wurden NSCs von *Smn*-defizienten Mäusen drei Tage mit 100 μM 8-CPT-cAMP behandelt und mit unbehandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*- und *Smn*^{+/+};*SMN2*-Zellen verglichen.

Zur Durchführung der RT-PCR wurde die aus den Zellkulturen gewonnene RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase – eine RNA abhängige DNA-Polymerase – in cDNA umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA konnte als Ausgangsprodukt für die PCR genutzt werden.

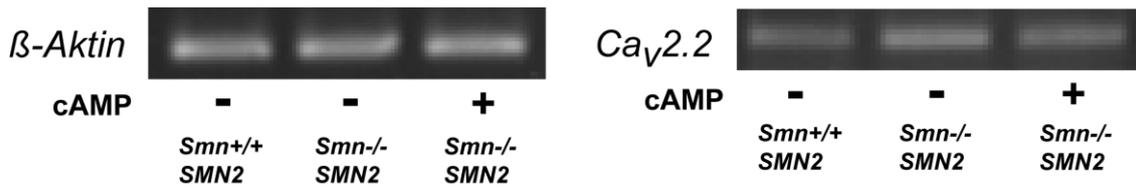


Abbildung 20. Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Transkriptmenge von Kontroll- und *Smn*-defizienten neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellen. Auch die mit 8-CPT-cAMP behandelten NSCs wiesen keinen Anstieg des β -Aktin- und *Ca*_v2.2-Transkriptgehaltes auf.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im β -Aktin- und *Ca*_v2.2-cDNA-Gehalt von behandelten verglichen mit unbehandelten neurosphärenbildenden kortikalen Vorläuferzellen von *Smn*-defizienten und Kontroll-Mausembryonen.

5.3 Effekte von 8-CPT-cAMP auf das Axonwachstum

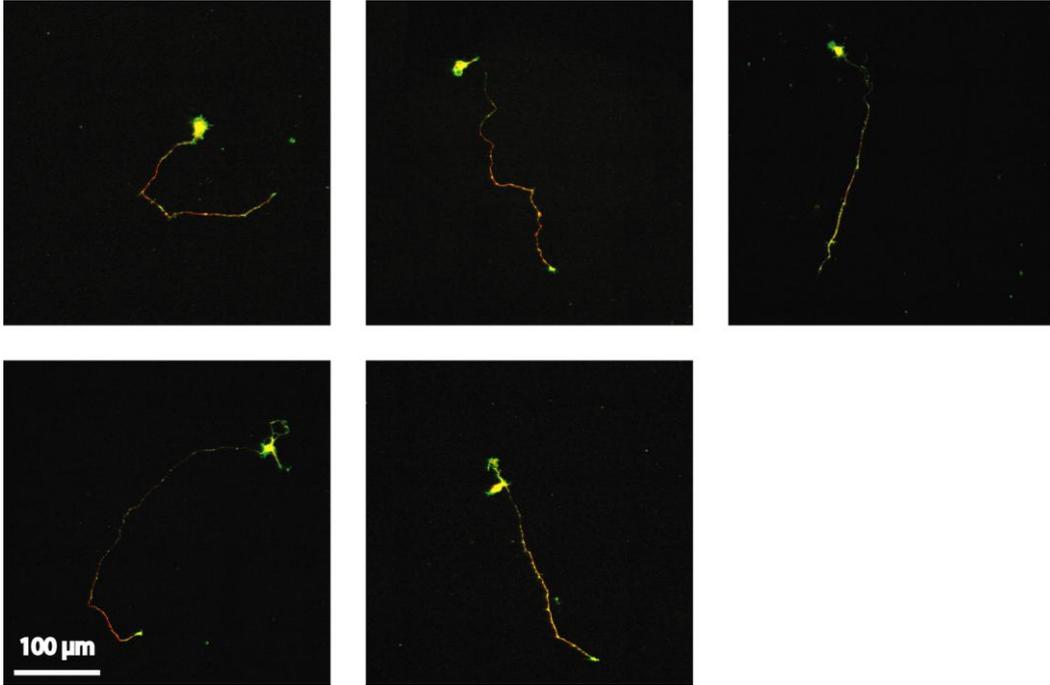
5.3.1 Längenmessung von Axonen

Wie bereits beschrieben sind Laminine heterotrimere Glykoproteine, bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit, welche sich in unterschiedlichen Kombinationen in den Basallaminae vieler Zellen finden. So ist beispielsweise die β 2-Untereinheit eines von Skelettmuskelzellen produzierten Laminins auf schmale Bereiche der Basallamina beschränkt, die den synaptischen Spalt bilden (Patton et al., 1997). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Neuritenwachstum auf Laminin-221 im Vergleich zu Laminin-111 reduziert ist (Porter et al., 1995; Greka et al., 2003). Dieses Heterotrimer enthält unter anderem die β 2-Untereinheit, welche das neuronale Wachstum von Motoneuronen stoppt und die präsynaptische Differenzierung fördert.

Um das Verhalten des axonalen Längenwachstums auf Laminin-221 zu untersuchen, wurden *Smn*^{+/+};*SMN2*⁻, *Smn*^{-/-};*SMN2*⁻ und mit 8-CPT-cAMP behandelte *Smn*^{-/-};*SMN2*⁻-Motoneurone nach siebentägiger Kultur mit Antikörpern gegen Tau und β -Aktin gefärbt. Der Tau Antikörper stellt sich rot dar. Das Zytoskelettprotein β -Aktin, hier grün gezeigt, findet sich in verschiedenen Zellkompartimenten.

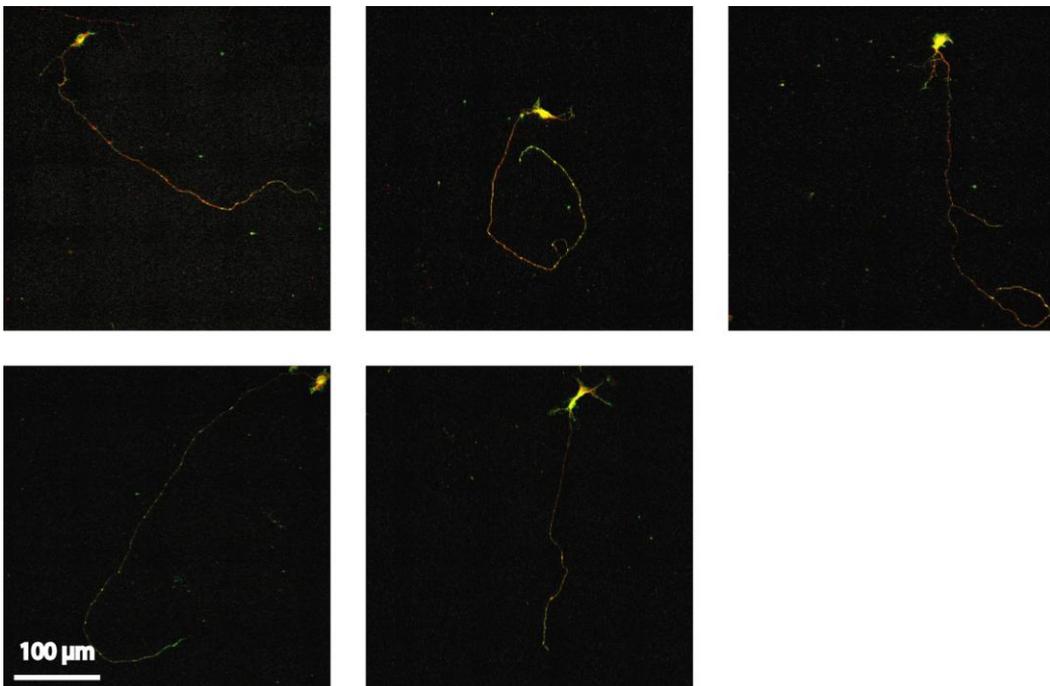
A

Smn^{+/+};SMN2



B

Smn^{-/-};SMN2



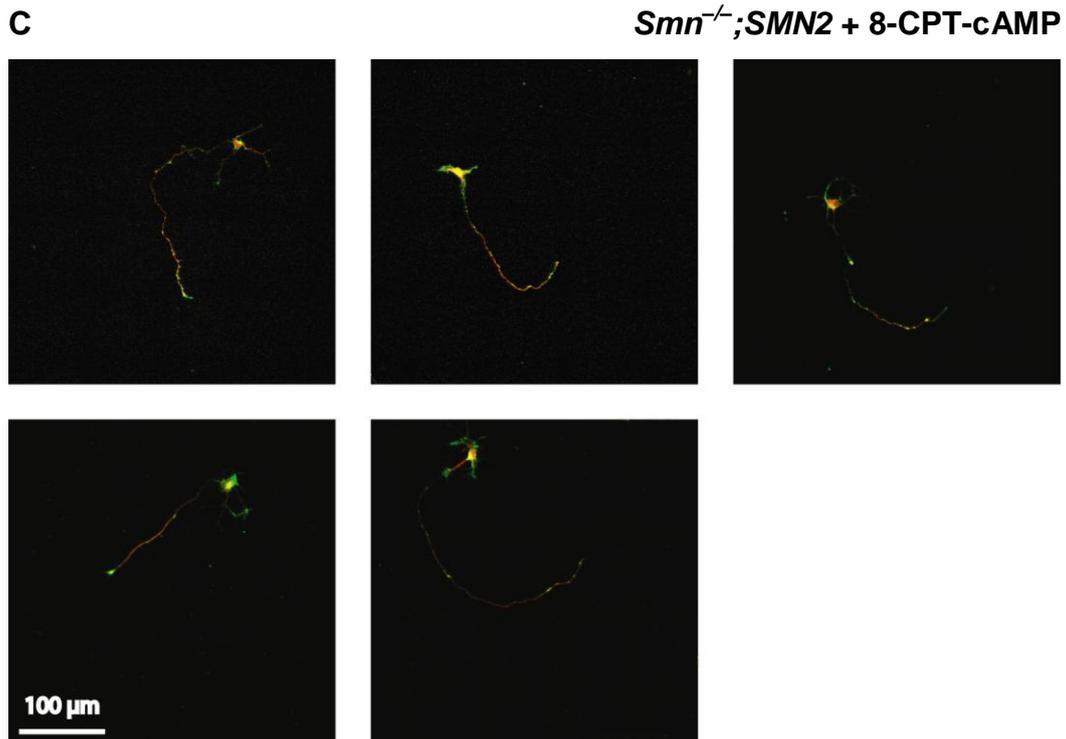


Abbildung 21. Immunfluoreszenzfärbung von, auf Laminin-211/221 kultivierten, fixierten Motoneuronen mit Antikörpern gegen Tau (rot) und β -Aktin (grün). *Smn*-defiziente Motoneurone (**B**) zeigten längere Axone als *Smn*^{+/+};SMN2- (**A**) und mit 8-CPT-cAMP behandelte *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneurone (**C**).

Smn-defiziente, unbehandelte Motoneurone zeigten auf Laminin-211/221 eine signifikante ($P < 0,05$) Zunahme der Axonlänge ($298,9 \pm 11,7 \mu\text{m}$) im Vergleich zu Kontroll-Motoneuronen ($264,1 \pm 11,2 \mu\text{m}$). Die mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneurone wiesen eine verkürzte Axonlänge ($241,1 \pm 14,6 \mu\text{m}$) auf, die sich nicht signifikant von der Länge der Kontrollaxone unterschied. In Tabelle 6 sind die Messergebnisse aufgeführt und in Abbildung 22 graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen die Wachstumsbeendigung der Axone gestört ist, und dass 8-CPT-cAMP einen Stopp des gestörten Axonwachstums bewirkt.

Tabelle 6. Vergleich des längsten axonalen Abschnitts von *Smn*^{+/+};*SMN2*-, *Smn*^{-/-};*SMN2*- und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen auf Laminin-211/221. Die Axone *Smn*-defizienter Motoneurone waren auf Laminin-211/221 signifikant länger als bei Kontroll- und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronen.

Motoneurone	Axonlänge
<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	264,1 ± 11,2 µm
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	298,9 ± 11,7 µm
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> + 8-CPT-cAMP	241,1 ± 14,6 µm

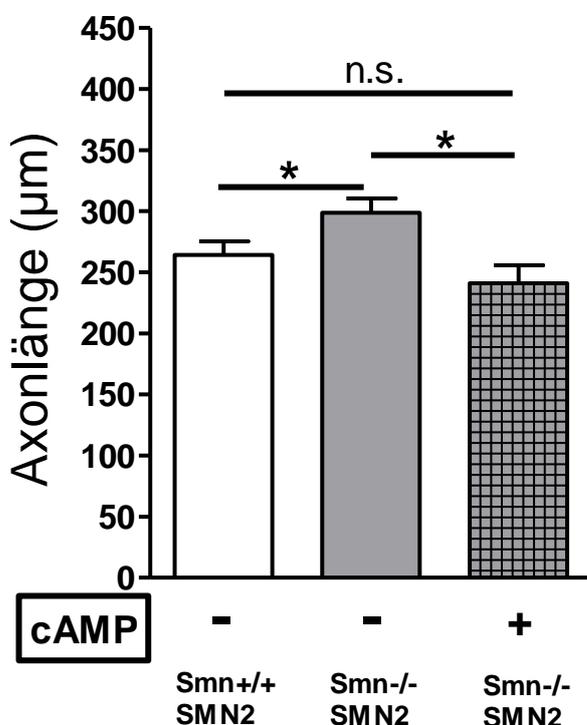


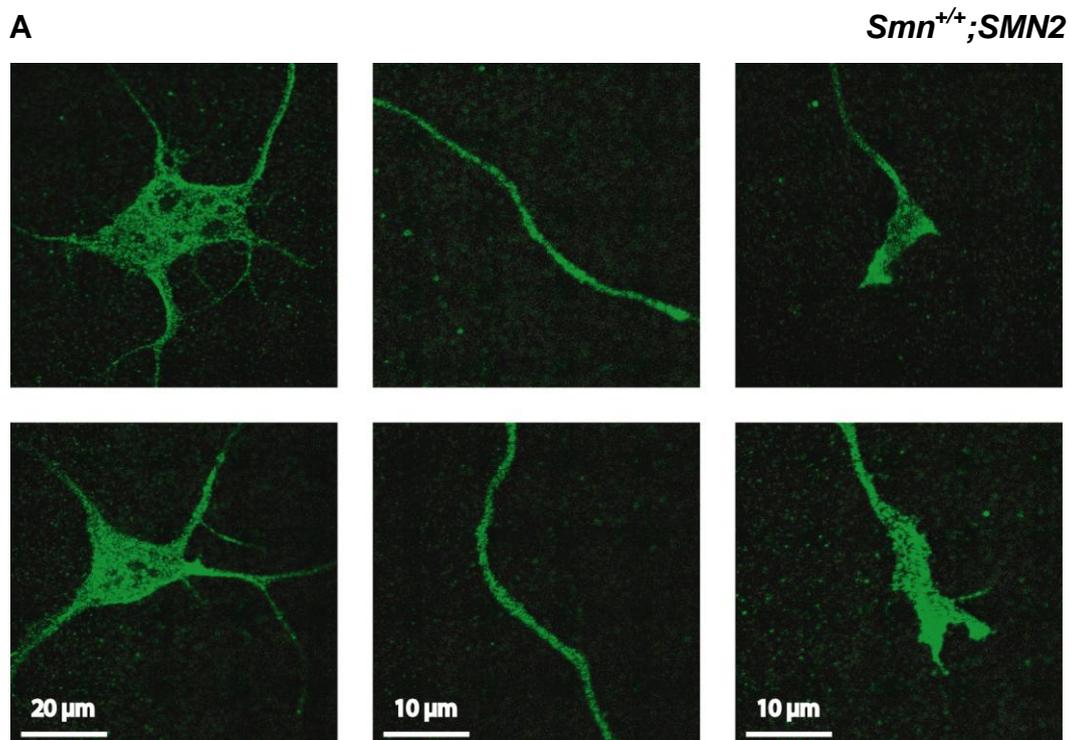
Abbildung 22. Mittlere Länge des längsten axonalen Astes der Motoneurone nach siebentägiger Kultur auf Laminin-211/221 mit bzw. ohne 8-CPT-cAMP. Motoneurone von *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mäusen zeigten ein signifikant längeres Axon auf Laminin-211/221 als Kontrollzellen. Mit 8-CPT-cAMP behandelte *Smn*-defiziente Motoneurone wiesen eine den Kontrollen vergleichbare Axonlänge auf. Die Sternchen geben das Signifikanzniveau an: * P < 0,05

5.4 Vergleich der Verteilung von hnRNP R und Smn/SMN-Protein

Von Rossoll und Mitarbeitern konnte 2002 ein neuer *Smn*-Interaktionspartner identifiziert werden. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein R – genannt hnRNP R – gehört zu den RNA-bindenden Proteinen und ist hauptsächlich in Axonen von motorischen Nervenfasern lokalisiert. Zudem konnten Rossoll und Mitarbeiter nachweisen, dass hnRNP R und *Smn* in Axonen von kultivierten

embryonalen Motoneuronen kolokalisieren und dass hnRNP R spezifisch die Wildtyp-Form von Smn bindet. Die Familie der hnRNP-Proteine übernimmt vielfältige Aufgaben im mRNA-Metabolismus: Regulation der mRNA-Stabilität, des mRNA-Editing, und –Spleißens (Kiebler und DesGroseillers, 2000; Mourelatos et al., 2001). Speziell der Komplex aus hnRNP R und SMN dient dem Transport von β -Aktin-mRNA und weiteren mRNAs (Rossoll et al., 2003a).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und den oben beschriebenen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob eine Normalisierung der SMN-Proteinverteilung und des SMN-Proteingehaltes in $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen durch 8-CPT-cAMP zu einer Veränderung des hnRNP R-Proteingehalts in Smn-defizienten embryonalen Motoneuronen führt. Zur Untersuchung der hnRNP R-Verteilung und der Kolokalisation mit Smn/SMN wurden immunzytochemische Färbungen von $Smn^{+/+};SMN2^{-/-}$, $Smn^{-/-};SMN2^{-/-}$ und mit 8-CPT-cAMP behandelten $Smn^{-/-};SMN2^{-/-}$ -Motoneuronen gegen hnRNP R, grün dargestellt, Smn/SMN, in rot gezeigt, und zur Detektion des Zellkerns gegen DAPI, blau gefärbt, angefertigt.



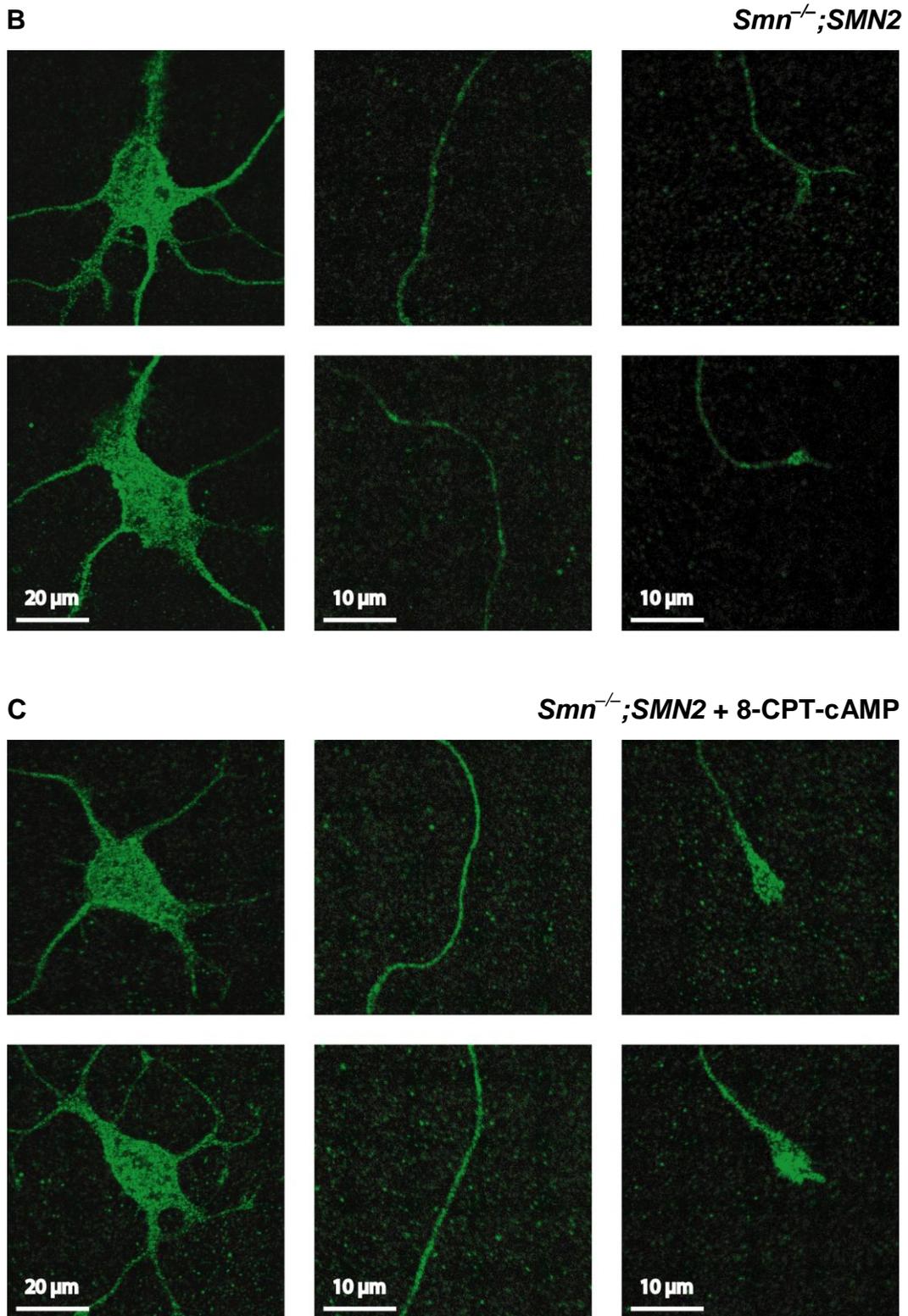


Abbildung 23. Immunfluoreszenzfärbung fixierter Motoneurone gegen hnRNP R. Darstellung verschiedener Zellkompartimente (Soma, Axon, Wachstumskegel) von *Smn^{+/+};SMN2*- (A), *Smn^{-/-};SMN2*- (B) und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn^{-/-};SMN2*-Motoneuronen (C). Bei unbehandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen war eine geringere Akkumulation an hnRNP R im Axon und Wachstumskegel bei insgesamt schwächerer Färbung zu beobachten.

HnRNP R fand sich im Bereich des Zellkörpers bei allen untersuchten Motoneuronen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Im axonalen Kompartiment zeigte sich eine deutliche, abschnittsweise imponierende Anhäufung des Proteins in Kontroll- und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen, während bei unbehandelten *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Axonen die Färbung insgesamt deutlich schwächer und die Akkumulation geringer ausfiel. In unbehandelten *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen war zudem die Anreicherung im Wachstumskegel geringer als bei den Kontroll- und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen.

Die Ergebnisse dieser Färbung wiesen darauf hin, dass die korrekte Lokalisation von hnRNP R im Axon und Wachstumskegel von motorischen Nervenfasern möglicherweise von der Anwesenheit einer ausreichenden Menge an intaktem *Smn*/*SMN*-Protein abhängt. Um dies zu erhärten, wurden Messungen der hnRNP R-Signalintensität durchgeführt und mit den oben angeführten Daten für *Smn*/*SMN* verglichen.

Tabelle 7. Quantifizierung der Signalintensität gegen ein fluoreszenz-gekoppeltes Antiserum gegen hnRNP R als arbitrary unit (willkürlicher Wert). *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone zeigten im Bereich des Axons und Wachstumskegels signifikant reduzierte Mengen an hnRNP R-Signalintensitäten im Vergleich zu Kontrollzellen. Bei mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*-defizienten Zellen fand sich ein signifikanter Anstieg der hnRNP R-Signalintensität im Axon und Wachstumskegel. Im Zellkörper konnte kein Unterschied in der hnRNP R-Signalintensität von *Smn*^{-/-}; *SMN*- und *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Motoneuronen gefunden werden.

	<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> + 8-CPT-cAMP
Zellkörper	46,2 ± 3,2	43,9 ± 2,0	45,7 ± 3,3
Axon	21,4 ± 1,8	13,2 ± 0,8	19,9 ± 1,9
Wachstumskegel	63,9 ± 2,4	21,8 ± 2,6	45,5 ± 3,6

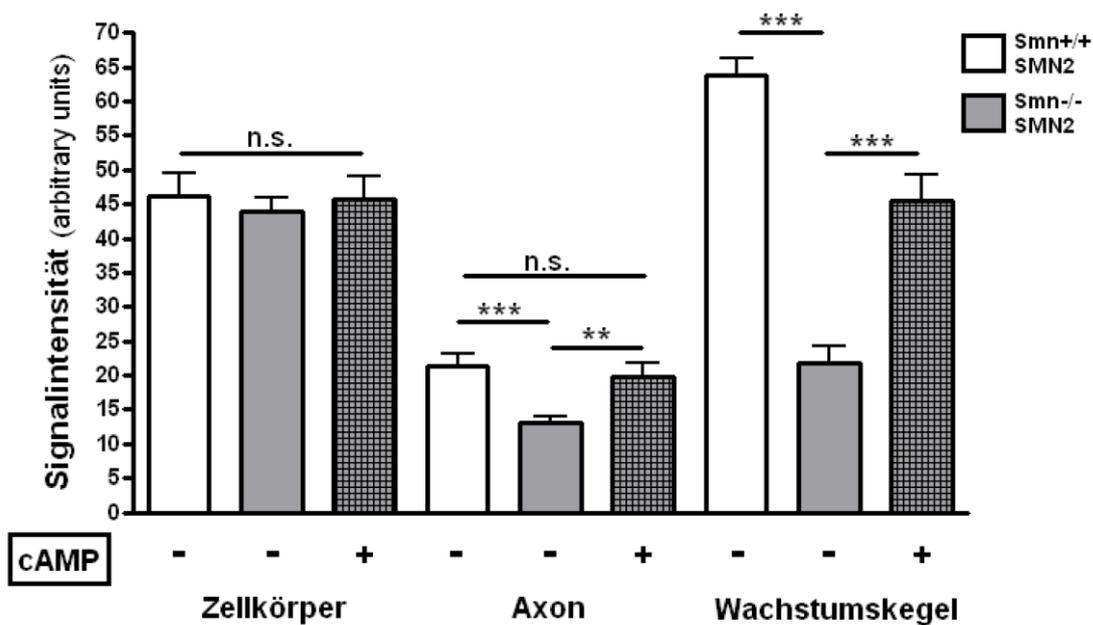


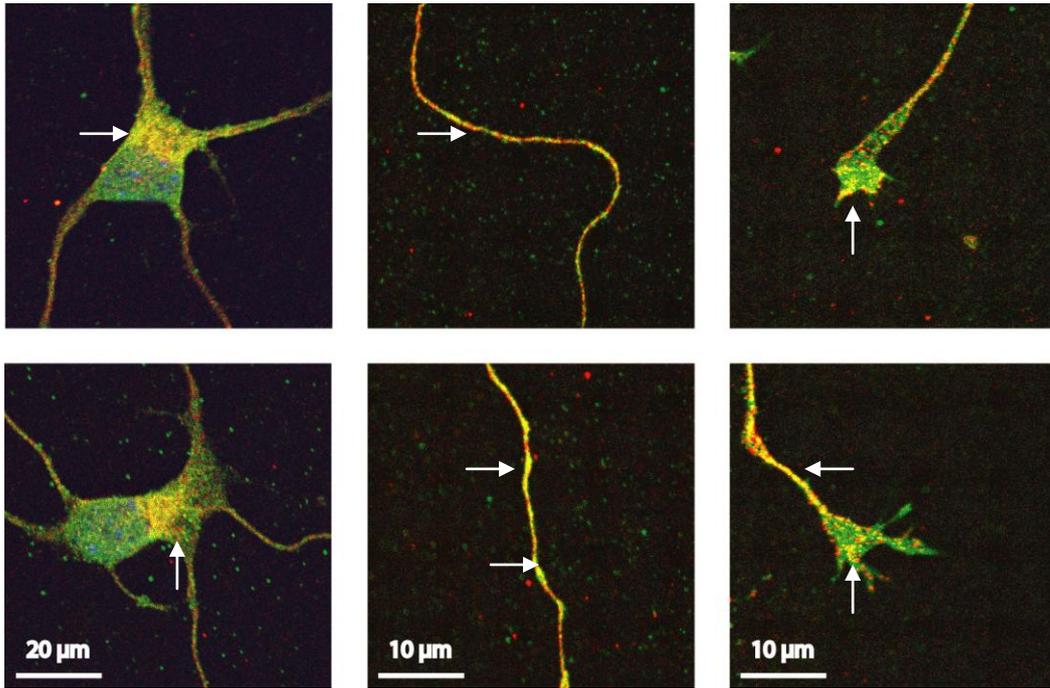
Abbildung 24. Motoneurone von *Smn*^{+/+};SMN2- und *Smn*^{-/-};SMN2-Mäusen wurden sieben Tage auf Laminin-211/221 mit bzw. ohne 8-CPT-cAMP kultiviert, fixiert und gegen hnRNP R angefärbt. Die hnRNP R-Signalintensität im Axon und Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen (graue Balken) unterschied sich signifikant von der gemessenen Intensität in Kontroll-Motoneuronen (weiße Balken). Behandlung der *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneurone mit 8-CPT-cAMP (karierte Balken) bewirkte im Bereich des Axons eine Zunahme der hnRNP R-Signalintensität auf Kontrollniveau. Die Sternchen geben die Signifikanz an: ** P < 0,01 *** P < 0,001

Im Axon und Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen zeigten indirekte quantitative Messungen eine signifikante Reduktion des hnRNP R-Proteingehaltes verglichen mit behandelten *Smn*^{-/-};SMN2- und *Smn*^{+/+};SMN2-Motoneuronen. Diese Ergebnisse entsprachen den oben beschriebenen für die SMN-Verteilung. Im Gegensatz zur SMN-Signalintensitätsmessung fand sich kein signifikanter Unterschied der hnRNP R-Intensität im Zellkörper aller untersuchter Motoneurone.

Abbildung 25 zeigt die Kolo-kalisation von *Smn*/SMN mit hnRNP R in den untersuchten Zellabschnitten.

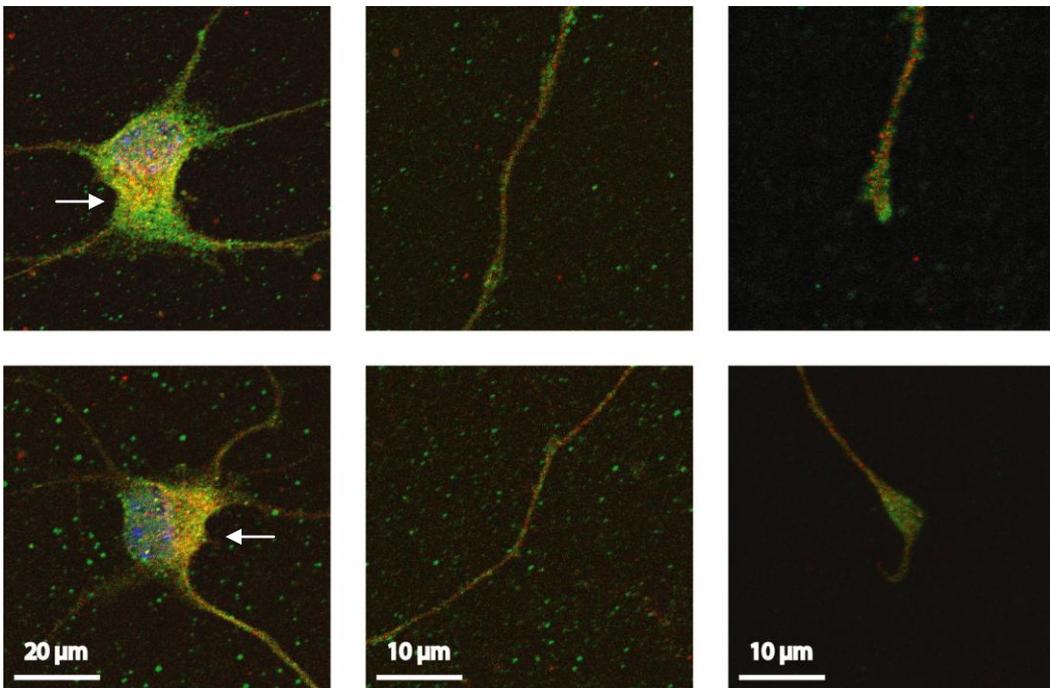
A

Smn^{+/+};SMN2



B

Smn^{-/-};SMN2



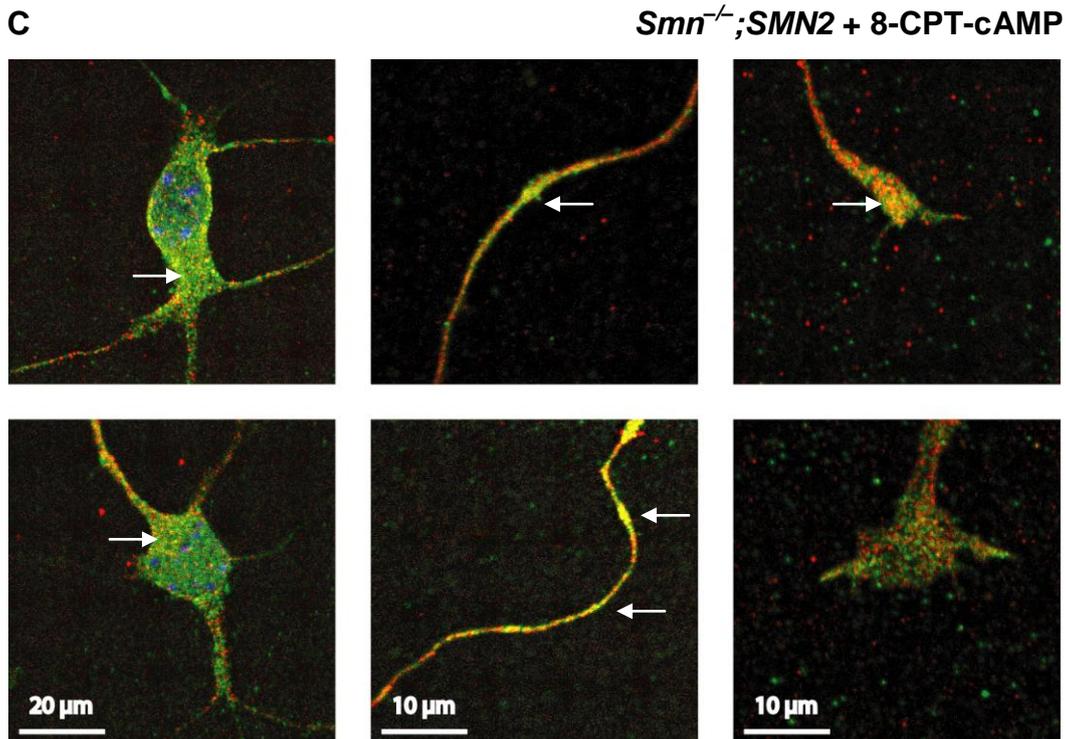


Abbildung 25. Immunhistochemische Färbung von *Smn*^{+/+};SMN2- (A), *Smn*^{-/-};SMN2- (B) und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen (C) mit Antikörpern gegen Smn/SMN (rot), hnRNP R (grün) und DAPI (blau). Bereiche der Kolokalisation von Smn/SMN und hnRNP R stellten sich gelb dar, und sind in der Abbildung zum Teil durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Smn-defiziente Motoneurone zeigten geringere Kolokalisationen und eine insgesamt schwächere Färbung als Kontroll- und mit 8-CPT-cAMP behandelte *Smn*^{-/-};SMN2-Zellen.

Eine Kolokalisation der beiden Proteine ließ sich im Zellkörper sowohl von Smn-defizienten als auch Kontroll-Motoneuronen erkennen. Die blau gefärbten Bereiche stellen den Zellkern dar. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Diamidino-Phenylindol) bindet selektiv an doppelsträngige DNA und bildet blau fluoreszierende Komplexe mit AT-reichen Nukleinsäure-Regionen, sodass DAPI als Gegenfärbung für den Zellkern genutzt wird. Reichlich Smn/SMN fand sich vor allem im Zytoplasma und in geringeren Anteilen im Zellkern, während hnRNP R gleichmäßig im ganzen Zellkörper vorkam. Im Axon von *Smn*^{+/+};SMN2- und mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen zeigte sich eine Kolokalisation der beiden Proteine, wie sich anhand der deutlichen Gelbfärbung erkennen ließ. Smn/SMN und sein Interaktionspartner hnRNP R kolokalisierten zudem im Wachstumskegel von motorischen Nervenfasern, wenn auch in geringerem Ausmaß als im Axon. Smn-defiziente Motoneurone zeigten eine deutlich schwächere Signalintensität mit scheinbar geringerer Kolokalisation der

beiden Proteine im Axon im Vergleich zu Kontroll- und mit 8-CPT-cAMP kultivierten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen. Die Wachstumskegel Smn-defizienter Motoneurone wiesen nur geringe, punktförmige Kollokalisierungen auf.

Diese Ergebnisse deuten verstärkt auf eine Abhängigkeit der hnRNP R-Lokalisation von der vorhandenen Menge an nicht-trunkiertem Smn/SMN-Protein hin und zeigen, dass 8-CPT-cAMP in der Lage ist, sowohl die Menge an SMN als auch an seinem Interaktionspartner hnRNP R in kultivierten embryonalen Motoneuronen Smn-defizienter Mäuse zu erhöhen.

6 Diskussion

Das Verstehen und die Aufklärung der pathomechanistischen Ereignisse, welche zu einer proximal betonten spinalen Muskelatrophie (SMA) führen, sind Grundvoraussetzungen, um therapeutische Strategien gegen diese Motoneuronenkrankung zu entwickeln. Die Untersuchung von zelltypspezifischen Krankheitsmechanismen setzt die Generierung von Mausmodellen sowie die Isolierung und Kultivierung des betroffenen Zelltyps voraus. Anhand morphologischer Analysen von embryonalen Smn-defizienten Motoneuronen konnte ich zeigen, dass die Smn-Defizienz zu einem Differenzierungsdefekt in Gegenwart von Laminin-221, einem Matrixprotein, welches im synaptischen Spalt der neuromuskulären Endplatte lokalisiert ist, führt. Darüber hinaus ist es mir gelungen nachzuweisen, dass die Smn-Defizienz in isolierten Motoneuronen durch die Gabe von zyklischem Adenosinmonophosphat aufgehoben werden kann und dadurch morphologische Defekte kompensiert werden.

Bereits 2000 zeigten Monani und Kollegen, dass der Schweregrad des Phänotyps eines Typ I SMA Mausmodells sich nicht durch einen moderaten Motoneuronenverlust von 17% im Rückenmark erklären lässt. Es wurde daher postuliert, dass es sich bei der klassischen proximal betonten Form der spinalen Muskelatrophie um eine sogenannte „dying back disease“ handelt (Cifuentes-Diaz et al., 2002). Die Degeneration der α -Motoneurone beginnt am präsynaptischen Bereich der Motorendplatte und schreitet im Laufe der Krankheit rückwärts bis zum Zellkörper fort. Daher scheint die bei der SMA stattfindende Motoneuronendegeneration mit einem Defekt im präsynaptischen Teil der Motorendplatte assoziiert zu sein.

Studien nach Rossoll et al. (2003a) haben gezeigt, dass in Smn-defizienten Motoneuronen ein Mikrofilamentdefekt vorliegt, begründet auf einem Defizit an β -Aktin. Da β -Aktin auch die Anordnung von Transmembranproteinen bedingt, unter anderem von Ionenkanälen (Bassell et al., 1998; Luo et al., 2002), haben Jablonka und Mitarbeiter (2007) beschrieben, dass es aufgrund einer defekten Kalzium-Kanal-Akkumulation im präsynaptischen Bereich von isolierten Motoneuronen zu Erregbarkeitsstörungen kommt, die wiederum Axonelongationsdefekte in Gegenwart von Laminin-221, welches eine β 2-Kette trägt, bedingen.

Nishimune und Kollegen konnten 2004 nachweisen, dass sich spannungsabhängige N-Typ- und P/Q-Typ-spezifische Kalzium-Kanal-Cluster spontan akkumulieren, wenn sie in Kontakt mit der β 2-Kette des synapsenspezifischen Laminins-221 kommen, und durch das anschließende Öffnen der Kanäle einen intrazellulären Kalziumanstieg bewirken. Dieser intrazelluläre Kalziumanstieg ist ein so genanntes Differenzierungssignal, welches dem Wachstumskegel eines "ankommenden" Motoneurons vermittelt, sich zu einer vollfunktionstüchtigen Präsynapse zu entwickeln. In der Zellkultur äußert sich das in einem verkürzten Neuritenwachstum (Porter et al., 1995; Greka et al., 2003). Bei den spannungsabhängigen N-Typ-spezifischen Kalzium-Kanälen handelt es sich um die embryonal exprimierte $Ca_v2.2$ -Untereinheit. Morphologische Analysen an Mäusen, bei denen die $Ca_v2.2$ -Untereinheit ausgeschaltet wurde, zeigten keine Zeichen einer Motoneuronenkrankheit. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass $Ca_v2.2$ postnatal durch $Ca_v2.1$ ersetzt wird (Jun et al., 1999; Urbano et al., 2003; Pagani et al., 2004; Fox et al., 2007). Hingegen entwickelten sich $Ca_v2.1$ -defiziente Mäuse nur bis zur dritten postnatalen Woche normal (Jun et al., 1999). Danach zeigten morphologische Untersuchungen von $Ca_v2.1$ -defizienten Mäusen ebenso wie von Mäusen, die keine β 2-Kette eines synapsenspezifischen Laminins exprimierten, eine Degeneration der motorischen Endplatte (Ino et al., 2001; Nishimune et al., 2004; Fox et al., 2007). Diese verzögerte Degeneration bei $Ca_v2.1$ -defizienten Mäusen könnte durch einen kompensatorischen Effekt von noch vorhandenem $Ca_v2.2$ erklärt werden, welches in den ersten Lebenswochen durch $Ca_v2.1$ ersetzt wird. Zusammengefasst deuten diese Daten auf eine, durch die Interaktion der β 2-Kette des Laminins-221 mit der Ca_v -Domäne von $Ca_v2.1$ und $Ca_v2.2$, geförderte postnatale Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte.

Da Rossoll und Kollegen (2002, 2003a) ein verändertes axonales Wachstumsverhalten und verkleinerte Wachstumskegel bei Smn-defizienten isolierten Motoneuronen beschreiben konnten, war ein Ziel meiner Arbeit die morphologische Analyse von Smn-defizienten Motoneuronen in Gegenwart von Laminin-221. Die isolierten embryonalen Motoneuronen wurden auf einem Laminin-Mix (Laminin-211/221) kultiviert, da das endplattenspezifische Laminin-221 nicht

isoliert erhältlich ist. Gleichzeitig wollte ich zeigen, wie die beschriebenen morphologischen Defekte durch Erhöhung der SMN-Expression kompensiert werden. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit embryonale Motoneurone mit zyklischem AMP behandelt, um die *SMN2*-Transkription zu stimulieren.

Wie bereits beschrieben, enthält die *SMN*-Promotor-Region ein CRE II bindendes Element, welches Effekte von zyklischem Adenosinmonophosphat vermittelt und so zu einer Erhöhung des SMN-Transkript- und Proteingehalts in Maushepatozyten führt (Majumder et al., 2004). Bereits 1998 konnten Bassell und Mitarbeiter nachweisen, dass die Behandlung von Neuronen mit dibutyrylcAMP, ein membranpermeables Analogon von cAMP, zu einer starken Erhöhung der β -Aktin-mRNA in den Wachstumskegeln von Nervenzellen führt. Eine neuere Studie konnte zeigen, dass Axone von sich entwickelnden Neuronen mRNAs enthalten, die für das CRE-binding protein (CREB) kodieren (Cox et al., 2008). Die Arbeitsgruppe kam aufgrund ihrer Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass axonales CREB für die CRE-abhängige Transkription nötig ist.

6.1 Erhöhung der *Smn/SMN2*-Transkription und *Smn/SMN*-Proteinmenge

6.1.1 *Smn*- und *SMN2*-Transkription

Da die Anzahl von isolierten Motoneuronen eines *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mausembryos für eine quantitative RT-PCR zur Untersuchung des Einflusses von cAMP auf die Transkription *in vitro* nicht ausreichte, verwendete ich RNA-Extrakte von Kulturen neurosphärenbildender kortikaler Vorläuferzellen (NSC) aus dem Vorderhirn von Kontroll- und *Smn*-defizienten Mäusen (E 11,5), welche drei Tage mit bzw. ohne 8-CPT-cAMP (100 μ M) kultiviert wurden. Die aus den Zellkulturen gewonnene RNA wurde mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RNA abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA konnte als Ausgangsprodukt für die anschließend durchgeführte PCR genutzt werden.

Die signifikante Zunahme des Transkriptgehalts sowohl an intaktem als auch trunkiertem (delta exon 7) *SMN2* und an *Smn* unter 8-CPT-cAMP-Behandlung zeigt, dass die *Smn*- und *SMN2*-Transkription durch den „second messenger“

cAMP stimuliert wird und dadurch in Kontrollzellen die Smn/SMN-Proteinmenge und in Smn-defizienten Zellen die SMN-Proteinmenge ansteigt (Jablonka et al., 2007).

6.1.2 Smn/SMN-Proteingehalt

Um einen möglichen Effekt von 8-CPT-cAMP auf den Smn/SMN-Proteingehalt in primär kultivierten Motoneuronen zu untersuchen, wurden Antikörperfärbungen gegen Smn/SMN in An- und Abwesenheit von 8-CPT-cAMP während der Kulturzeit von sieben Tagen durchgeführt. Unbehandelte Smn-defiziente Motoneurone zeigten signifikant geringere Signalintensitäten in allen untersuchten Zellbereichen (Zellkörper, Axon und Wachstumskegel) verglichen mit Kontroll-Motoneuronen. Die Behandlung mit 8-CPT-cAMP führte durch die Stimulierung der *SMN2*-Transkription bei *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären SMN-Gehalts (vgl. Tabelle 2 und Abbildung 11).

Somit ließen die bisherigen Ergebnisse die Vermutung zu, dass die Effekte von 8-CPT-cAMP über die erhöhte *Smn*- und *SMN2*-Transkription vermittelt werden. Allerdings ist zyklisches Adenosinmonophosphat ein häufiger „second messenger“ und daher in viele Signal-Transduktionswege verwickelt, welche zum Überleben und zur Differenzierung von Neuronen beitragen, so dass sich weitere Wirkmechanismen eröffnen. Von Burnett und Kollegen konnte 2009 gezeigt werden, dass die Rekrutierung von SMN in den SMN-Komplex durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert wird, und dass durch Stimulation des PKA-Signalwegs durch Forskolin in Fibroblasten von SMA-Patienten das SMN-Protein akkumuliert. Eine Veränderung der SMN-mRNA-Menge konnte durch RT-PCR-Analysen von dieser Arbeitsgruppe nicht beobachtet werden und führte zu dem Schluss, dass die SMN-Induktion durch Forskolin posttranskriptionell eintrat. Gegenstand weiterer Forschungen mit Tiermodellen für SMA könnte die Entschlüsselung der für die positiven Effekte von 8-CPT-cAMP auf Smn-defiziente Motoneurone verantwortlichen Signalwege sein.

6.2 Veränderung von Morphologie und Funktion *Smn*-defizienter Motoneurone unter Behandlung mit cAMP

Aufgrund der stimulierenden Effekte von 8-CPT-cAMP auf die *Smn/SMN2*-Transkription und daher auch auf den *Smn/SMN*-Proteingehalt in kultivierten Motoneuronen, stellte sich weiter die Frage, ob die Erhöhung des *Smn/SMN*-Proteingehalts in *Smn*^{-/-};*SMN2*-Zellkulturen durch 8-CPT-cAMP positive Auswirkungen auf die Morphologie (Axonwachstum und Wachstumskegelgröße) der *Smn*-defizienten Motoneurone zeigt. Um dies zu klären, wurden embryonale *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneurone *in vitro* mit 100 µM 8-CPT-cAMP behandelt und mit unbehandelten *Smn*-defizienten und Kontroll-Motoneuronen verglichen. Die Motoneurone wurden über sieben Tage auf Laminin-211/221 kultiviert, danach fixiert und immunzytochemisch sichtbar gemacht.

6.2.1 Vergrößerung der Fläche von Wachstumskegeln und Anreicherung von β-Aktin

Die Wachstumskegel von Nervenzellen dienen zum einen dem gerichteten Auswachsen der Axone von Motoneuronen, zum anderen aufgrund der konzentrierten Lokalisation von Rezeptoren und Ionenkanälen in der präsynaptischen Membran (z. B. Kalzium-Kanäle) zur Erfassung von externen Signalen. Wird im Laufe der Entwicklung eine Motorendplatte ausgebildet, entwickelt sich der Wachstumskegel zum präsynaptischen Bereich. Dies bedeutet, dass die richtige Anordnung von Rezeptoren und Ionenkanälen gewährleistet sein muss, damit die Transmitterfreisetzung funktioniert.

Untersuchungen bei *Smn*^{-/-};*SMN2*-Mäusen ergaben eine signifikante Verringerung der Fläche der Wachstumskegel im Vergleich zu *Smn*^{+/+};*SMN2*-Mäusen (siehe Tabelle 3 und Abbildung 13). Dieses Ergebnis entsprach den schon früher beschriebenen morphologischen Veränderungen im Wachstumskegelbereich von *Smn*-defizienten Motoneuronen. (Rossoll et al., 2003a). Die Behandlung der *Smn*^{-/-};*SMN2*-Motoneuronkulturen mit 8-CPT-cAMP führte zu einem signifikanten Anstieg der Wachstumskegelfläche auf Kontrollniveau. Es liegen somit Hinweise dafür vor, dass zyklisches Adenosinmonophosphat die Störung

gen des präsynaptischen Bereichs in *Smn*-defizienten Motoneuronen kompensieren kann.

Die verkleinerten Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen deuten auf einen Defekt der Mikrofilamente in *Smn*-defizienten Motoneuronaxonen hin (Rossoll et al., 2003a). Das Zytoskelett wird von verschiedenen Mikrofilamenten gebildet und ist unter anderem für die Gestalt einer Zelle notwendig. Ein ubiquitär verbreiteter Anteil des Zytoskeletts stellt die Aktin-Proteinfamilie dar, die sich in α -, β - und γ -Aktine unterteilen lässt. In Neuronen ist β -Aktin die am häufigsten abundante Form und erfüllt in Motoneuronen verschiedene Aufgaben. So scheint die Anreicherung von β -Aktin-mRNA und die nachfolgende Translation zum β -Aktin-Protein im distalen Bereich von Motoneuronaxonen für das gerichtete Auswachsen der Zellfortsätze wichtig zu sein (Bassel et al., 1998; Jablonka et al., 2004; Yao et al., 2006). Außerdem wird das Aktinzytoskelett zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von funktionsfähigen Synapsen, sowie zur Modulation der Synapsenstärke benötigt (Zhang und Benson, 2001). Im präsynaptischen Bereich fungieren angereichertes β -Aktin und andere Mikrofilamente zudem als Stützgerüst für die Neurotransmitter-Vesikel und weitere Proteine (Sankaranarayanan et al., 2003). Wichtige Aufgaben übernimmt das Aktinzytoskelett auch bei der Bereitstellung und dem Recycling synaptischer Vesikel für die Neurotransmitterausschüttung (Shupliakov et al., 2002; Bloom et al., 2003). Daneben scheint Aktin zusammen mit Synapsin bei der Regulation der Vesikel-Beweglichkeit und -Ausschüttung beteiligt zu sein (Cingolani und Goda, 2008).

Im distalen Axon und im Wachstumskegel von primär kultivierten Motoneuronen reichern sich β -Aktin-mRNA und -Protein stark an (Rossoll et al., 2003a; Jablonka et al., 2007). Färbungen von *Smn*^{+/+}; *SMN2*-Motoneuronen gegen das β -Aktin-Protein zeigten neben einer perinukleären Anreicherung eine im Verlauf des Axons zunehmende Farbintensität und eine starke Anreicherung im Wachstumskegel. Dagegen fand sich in den Axonen von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mäusen eine schwache Färbung und keine Anreicherung im distalen Axon und Wachstumskegelbereich (Rossoll et al., 2003a).

Diese Beobachtungen weisen auf eine eindeutige defizitäre β -Aktinverteilung im Wachstumskegelbereich hin und lassen die Vermutung zu, dass *Smn*-defiziente Motoneurone *in vivo* einen defekten präsynaptischen Bereich der Motorendplatte entwickeln. Aufgrund des ungenügend ausgebildeten Mikrofilaments ist es durchaus denkbar, dass es im präsynaptischen Bereich zu einer verminderten Vesikelausschüttung kommt, was wiederum eine defizitäre Transmitterübertragung zur Folge hätte. Möglicherweise degenerieren diese "schwächeren" Synapsen aufgrund der Nicht-Funktion des präsynaptischen Bereichs.

Um den Einfluss von zyklischem Adenosinmonophosphat auf die β -Aktin-Proteinverteilung in *Smn*-defizienten Motoneuronen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Motoneurone von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausembryonen mit 8-CPT-cAMP kultiviert, wieder eine Antikörperfärbung gegen β -Aktin durchgeführt und die Fluoreszenz-Signalintensität mit unbehandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen und Kontrollzellen verglichen. Es zeigte sich sowohl bei unbehandelten als auch bei den mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen eine starke Signalintensität innerhalb des Zellkörpers. Die unbehandelten Zellen zeigten ein deutliches β -Aktin-Defizit im distalen Axonkompartiment, wohingegen die Behandlung der Zellkulturen mit 8-CPT-cAMP zu einer Anreicherung von β -Aktin im distalen Axon und Wachstumskegelbereich führte (siehe Abbildung 14). Durch Messung der Signalintensität von Zellkörpern, distalen Axonen und Wachstumskegeln konnte der β -Aktin-Gehalt quantifiziert und somit eine eindeutige Zunahme an β -Aktin-Protein im distalen Axon und Wachstumskegelbereich *Smn*-defizienter Motoneurone in Anwesenheit des „second messengers“ cAMP nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4 und Abbildung 16).

Studien mit *in situ* Hybridisierung zeigten zudem eine signifikante Zunahme an β -Aktin-mRNA in Axonterminalen *Smn*-defizienter Motoneurone, welche mit 8-CPT-cAMP kultiviert wurden (Jablonka et al., 2007). Bassell et al. konnten bereits 1998 beobachten, dass eine *in vivo* Behandlung von Neuronen mit dibutyryl-cAMP die rasche Lokalisation von β -Aktin-mRNA in den Wachstumskegel induziert. Diese und die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen einen eindeutigen Zusammenhang von *Smn*/*SMN*-Präsenz und korrekter Mikrofilamentverteilung in den Axonterminalen von Motoneuronen. Eine neuere Arbeit konnte

durch Überexprimierung von Plastin 3 (ein Protein, welches F-Aktin stabilisiert) eine Kompensation der durch erniedrigtes SMN bedingten Axondefekte in kultivierten Zellen beobachten (Oprea et al., 2008). Diese Studie deutet somit ebenfalls auf eine Verbindung zwischen SMN und Zytoskelettproteinen hin.

6.2.2 Akkumulation von N-Typ Kalzium-Kanälen

Anhand von Calcium Imaging Techniken konnten Jablonka und Kollegen (2007) nachweisen, dass auf Laminin-211/221 kultivierte isolierte embryonale Motoneurone eine verminderte Erregbarkeit im distalen Bereich zeigen. Um den Grund der verminderten Erregbarkeit zu finden, wurden für diese Dissertation Antikörperfärbungen gegen embryonal exprimierte N-Typ spezifische Kalzium-Kanäle ($Ca_v2.2$) durchgeführt.

Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit der N-Typ Ca^{2+} -Kanäle gaben Aufschluss über die Verteilung der Kanalproteine in den untersuchten Zellbereichen. *Smn*-defiziente Motoneurone zeigten eine deutlich reduzierte Anreicherung von $Ca_v2.2$ -Kanälen im Bereich der Wachstumskegel (vgl. Abbildung 17). Dieser Fund korreliert mit dem reduzierten Ca^{2+} -Einstrom und der reduzierten spontanen elektrischen Aktivität in diesem Zellabschnitt (Jablonka et al., 2007). Axone von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausembryonen zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion an $Ca_v2.2$ -Kanälen verglichen mit Kontrollmotoneuronen, wohingegen es im Zellkörper zu keiner Veränderung kam. Durch Stimulation der *SMN2*-Transkription mittels Behandlung *Smn*-defizienter Motoneurone mit 8-CPT-cAMP, kam es zu einer erhöhten $Ca_v2.2$ -Kanal-Akkumulation im Bereich des Wachstumskegels im Gegensatz zu unbehandelten Zellen (siehe Tabelle 5 und Abbildung 18). Die erhöhte Anreicherung von $Ca_v2.2$ -Kanälen im Bereich der Wachstumskegel in Anwesenheit von 8-CPT-cAMP korreliert unter anderem mit einer erhöhten Frequenz von spontanen Kalziumströmen im Wachstumskegel von mit 8-CPT-cAMP behandelten und auf Laminin-211/221 kultivierten *Smn*-defizienten Motoneuronen (Jablonka et al., 2007).

Entlang des Aktinzytoskeletts findet neben den bereits beschriebenen Funktionen auch die Integration von Transmembranproteinen, wie beispielsweise Rezeptoren und Ionenkanälen im Wachstumskegel, statt (Bassell et al., 1998; Luo

et al., 2002). Die korrekte Anordnung und Verfügbarkeit speziell von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen spielen bei der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte und somit auch bei der Transmitterfreisetzung eine wichtige Rolle (Urbano et al., 2002; Spafford und Zamponi, 2003; Nishimune et al., 2004). Daneben sind Kalziumsignale für viele Aspekte der frühen neuronalen Entwicklung wichtig, einschließlich neuronaler Proliferation, Migration und axonaler Führung (Spitzer, 2006). Die Differenzierung neuromuskulärer Endplatten setzt die Entwicklung aktiver Zonen voraus, die wiederum an kurzzeitige intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhungen gekoppelt ist (Schneppenburger und Neher, 2005). Motorendplatten von transgenen Mäusen, die eine verminderte Expression oder Störung im Clustering von spannungsabhängigen N-typischen Kalzium-Kanälen ($Ca_v2.2$ pränatal, $Ca_v2.1$ postnatal) haben, zeigen eine defekte Anordnung der aktiven Zonen und einen stark degenerativen Phänotyp (Nishimune et al., 2004). In isolierten embryonalen Motoneuronen wird durch das einströmende Kalzium die Ausreifung einer funktionstüchtigen Präsynapse initiiert (Nishimune et al., 2004; Jablonka et al., 2007). Mit dieser Differenzierung zur vollfunktionsfähigen Synapse ist aber auch eine funktionierende vesikuläre Transmitterfreisetzung verbunden. Eine gestörte Smn/SMN-Funktion verhindert die korrekte Lokalisation von β -Aktin im präsynaptischen Bereich (Rossoll et al., 2003a) und könnte somit zu einer Störung im strukturellen Aufbau der Synapse, zu Erregbarkeitsstörungen und damit auch zu einer defekten Transmitterfreisetzung führen.

Bereits vorhandene Erkenntnisse und meine Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Smn-defiziente Motoneurone nicht in der Lage sind, den Differenzierungsprozess als Antwort auf den Kontakt von $Ca_v2.2$ mit dem endplattenspezifischen Laminin (Laminin-221) einzuleiten (vgl. Nishimune et al., 2004). Die defekte Kalzium-Kanal-Akkumulation könnte zu funktionellen Defekten in den aktiven Zonen führen (Nishimune et al., 2004) und jene zu einer gestörten Neurotransmitterfreisetzung. Eine gestörte Freisetzung des Transmitters könnte wiederum eine Schwächung der Synapse und eine anschließende Degeneration des präsynaptischen Bereiches bedingen. Allerdings sind die spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle auch für Synapsen des ZNS wichtig. Somit bleibt un-

klar, warum nur die Synapsen der neuromuskulären Endplatte und nicht des zentralen Nervensystems betroffen sind, wenn eine Veränderung der Verteilung von Kalzium-Kanälen ausschlaggebend für die spinale Muskelatrophie ist (Burghes und Beattie, 2009).

6.2.3 Unveränderte Transkription von β -Aktin und $\text{Ca}_v2.2$

Untersuchungen des Gesamttranskriptgehalts von β -Aktin und $\text{Ca}_v2.2$ in kortikalen Vorläuferzellen in Anwesenheit von 8-CPT-cAMP zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch *in situ* Hybridisierung konnten Jablonka und Mitarbeiter (2007) allerdings zeigen, dass es in *Smn*-defizienten Motoneuronen unter 8-CPT-cAMP Behandlung zu einer lokalen Erhöhung der β -Aktin-mRNA im Bereich des Wachstumskegels kommt. Zyklisches AMP ist also in der Lage, das β -Aktin-mRNA-Defizit in *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen auszugleichen. Jablonka und Kollegen fanden hingegen keinen signifikanten Unterschied in der $\text{Ca}_v2.2$ -mRNA-Menge im Wachstumskegelbereich von mit 8-CPT-cAMP behandelten und unbehandelten Motoneuronen.

Dies wirft die Frage auf, warum 8-CPT-cAMP zu einer Erhöhung des β -Aktin-mRNA- und Proteingehaltes führt, und gleichzeitig nur den Anstieg an $\text{Ca}_v2.2$ -Protein bewirkt und keinen Einfluss auf den $\text{Ca}_v2.2$ -mRNA-Gehalt hat.

6.2.4 Normalisierung des axonalen Längenwachstums

Störungen des axonalen Längenwachstums sind bei isolierten embryonalen SMA Typ I Maus-Motoneuronen bereits bekannt (Rossoll et al., 2003a), aber auch in anderen *Smn*-defizienten Tiermodellen z.B. dem Morpholin-induzierten Knockdown im Zebrafisch (McWorther et al., 2003) bzw. dem gewebespezifischen Knockout des Exon 7 im *Smn*-Gen der Maus (Cifuentes-Diaz et al., 2002). McGovern und Mitarbeiter (2008) konnten hingegen durch *in vivo* Studien zeigen, dass Motoneurone von Typ I SMA-Mäusen zu keinem untersuchten Entwicklungszeitpunkt Defekte der axonalen Formation oder Elongation aufweisen. *In vitro* Assays mit Zellkulturen erlauben die Untersuchung einzelner Axone unter streng kontrollierten Umweltbedingungen. Primäre Motoneuronkulturen von SMA Typ I Mausembryonen wachsen außerhalb der Muskelzellen, die das motorische Axon normalerweise innerviert. In dieser Arbeit wurde, um

der Situation *in vivo* möglichst nahe zu kommen, das im Muskel vorkommende, synapsenspezifische Laminin-221 verwendet.

Wie bereits unter 6.2.2 diskutiert, weisen isolierte *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneurone ein N-Typ Kalzium-Kanal-Defizit im präsynaptischen Bereich auf. Nishimune zeigte mit Kollegen (2004), dass embryonal exprimierte Kalzium-Kanäle (Ca_v2.2) direkt mit synapsenspezifischen Lamininformen (z. B. Laminin-221) interagieren und dadurch eine Wirkung auf die präsynaptische Differenzierung haben. An isolierten embryonalen Motoneuronen ließ sich beobachten, dass das Neuritenwachstum auf Laminin-221 im Vergleich zu Laminin-111 reduziert ist (Porter et al., 1995; Greka et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die β2-Kette des Laminins-221 mit der porenformenden Ca_v-Untereinheit von N-Typ Kalzium-Kanälen (Ca_v2.2) interagiert (Nishimune et al., 2004) und dass bei *Smn*-defizienten Motoneuronen das „Clustering“ von Ca_v2.2 in der Präsynapse vermindert ist (Jablonka et al., 2007). Zudem führte die Interaktion von Laminin-β2 und Ca_v2.2 zu einer Hemmung des Wachstums der Neuriten *in vitro* (Sann et al., 2008). Aufgrund der verringerten Präsenz von Kalzium-Kanälen im präsynaptischen Bereich sind *Smn*-defiziente Motoneurone nicht mehr in der Lage das, durch die Ca_v/β2-Ketten Interaktion vermittelte, Differenzierungssignal (erhöhter Ca²⁺-Einstrom) zu erkennen. Daher sollte in dieser Arbeit das axonale Längenwachstum *Smn*-defizienter Motoneurone auf endplattenspezifischem Laminin-221 untersucht werden.

Auf Laminin-211/221 kultivierte, *Smn*-defiziente Motoneurone zeigten eine signifikante Zunahme der Axonlänge (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 22) im Vergleich zu Kontrollzellen. Aus dem verlängerten Neuritenwachstum von *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen in Anwesenheit von Laminin-221 lässt sich schließen, dass *Smn*-defiziente Motoneurone nicht in der Lage sind, aufgrund des bereits gezeigten verminderten Ca_v2.2 „Clustering“, das Differenzierungssignal der β2-Untereinheit zu erkennen. Allerdings konnten bisher *in vivo* bei *Smn*-defizienten Mäusen keine „zu langen“ Axone im Bereich der neuromuskulären Endplatte beobachtet werden.

Durch die stimulierte SMN2-Transkription mit 8-CPT-cAMP und den dadurch erhöhten SMN-Proteingehalt zeigten *Smn*-defiziente Motoneurone auf Laminin-

221 Axonlängen vergleichbar mit Kontrollmotoneuronen. Jablonka und Mitarbeiter (2007) konnten zudem nachweisen, dass die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte Axonlänge von mit 8-CPT-cAMP behandelten und auf Laminin-221 kultivierten Smn-defizienten Motoneuronen mit einem erhöhten Kalziumeinstrom in die Präsynapse korreliert. Dieses Ergebnis zusammen mit meinen Beobachtungen zeigt, dass cAMP das Kalzium-Kanal-Clustering stimuliert und folglich in Smn-defizienten Motoneuronen ein erhöhter Kalziumeinstrom ermöglicht wird, und die Neuronen dadurch das Differenzierungssignal erkennen, was schließlich in einem verminderten axonalen Längenwachstum resultiert.

Neben diesen morphologischen Veränderungen konnten Jablonka und Mitarbeiter (2007) auch einen funktionellen Defekt im Wachstumskegelbereich beschreiben. Dieser Defekt basiert auf einem verminderten spontanen Kalziumeinstrom, begründet auf der bereits nachgewiesenen verminderten $Ca_v2.2$ -Kanal-Akkumulation. Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass Smn-defiziente Motoneurone möglicherweise Probleme bei der Freisetzung der Neurotransmitter aus dem präsynaptischen Bereich haben. Die Transmitterfreisetzung an den aktiven Zonen der Motorendplatte ist mit einer stark erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden (Kittel et al., 2006). Kommt es aufgrund eines mangelnden Kalzium-Kanal-„Clusterings“ zu einem verminderten Kalziumeinstrom, könnte dies zu einer mangelnden Transmitterfreisetzung führen.

SMN scheint in Motoneuronen außerdem für die Integrität der präsynaptischen neuromuskulären Endplatte nötig zu sein. So zeigen Zebrafisch *smn* Mutanten Defekte der neuromuskulären Endplatte (Boon et al., 2009). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen, die durch Analyse von SMA-Mausmodellen erzielt wurden (Kariya et al., 2008; Murray et al., 2008; Kong et al., 2009). Untersuchungen an Typ II SMA-Mäusen zeigten, dass die ersten wahrnehmbaren strukturellen Konsequenzen des reduzierten SMN Abnormalitäten im Bereich des distalen Endes von Motoneuronen, einschließlich der neuromuskulären Endplatte, darstellen und dass SMN eine wichtige Rolle für die korrekte postnatale Entwicklung der neuromuskulären Endplatte innehat, nicht aber für die initiale Formierung (Kariya et al., 2008). Außerdem postulieren

Kariya und Mitarbeiter, dass sich die strukturellen Defekte im Bereich der neuromuskulären Endplatte in einer defekten synaptischen Signalübertragung mit intermittierendem Neurotransmitterversagen widerspiegeln. Neuromuskuläre Endplatten von SMA-Mäusen einer anderen Arbeitsgruppe zeigten eine abnormale synaptische Transmission und eine verminderte Dichte an synaptischen Vesikeln. Überraschenderweise blieben die neuromuskulären Endplatten bis in späte Krankheitsstadien innerviert (Kong et al., 2009). Diese Daten legen nahe, dass eine axonale Degeneration nicht der initiale Grund für die Fehlfunktion der Motoreinheit bei schweren SMA-Formen ist. Es bleibt somit die Frage offen, ob die verminderte Dichte an synaptischen Vesikeln zusammen mit den beobachteten morphologischen Abnormalitäten, wie die defekte Anhäufung von Kalzium-Kanälen und Akkumulation von Neurofilament in der Präsynapse, zur Fehlfunktion der neuromuskulären Endplatten bei SMA führt (Jablonka et al., 2007; Kariya et al., 2008; Murray et al., 2008; Kong et al., 2009).

6.2.5 Erhöhte Kolokalisation von hnRNP R und Smn/SMN

Wie bereits frühere Studien belegten, interagiert das Smn-Protein mit einem RNA bindenden Protein aus der hnRNP-Familie (heterogenous nuclear ribonucleoprotein), genannt hnRNP R (Rossoll et al., 2002). HnRNP R ist speziell in Motoraxonen stark exprimiert (Rossoll et al., 2002) und bindet spezifisch an die 3' UTR von β -Aktin-mRNA (Rossoll et al., 2003a). Ausgehend von diesen Ergebnissen stellten Rossoll und Mitarbeiter 2003 die Hypothese auf, dass das Smn-Protein einen Komplex mit hnRNP R bildet, welcher wiederum spezifisch an β -Aktin-mRNA bindet. Dieser Komplex wird entlang des Zytoskeletts in den präsynaptischen Bereich der Motoneurone transportiert. Dort erfolgt die Translation zum β -Aktin-Protein, welches wichtig ist für das Auswachsen und die Aufrechterhaltung der Zellfortsätze und die Entwicklung der Präsynapse (Rossoll et al., 2003b). Durch die Beobachtung, dass sowohl die β -Aktin-mRNA als auch das β -Aktin-Protein im präsynaptischen Bereich von Smn-defizienten Motoneuronen deutlich reduziert ist, wird diese Annahme bestärkt.

Die durch 8-CPT-cAMP bewirkte Erhöhung des SMN-Proteingehalts in *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen warf die Frage auf, inwieweit sich die Behandlung der Zellen mit 8-CPT-cAMP auf die Verteilung des SMN-Interaktionspartners

hnRNP R in den verschiedenen Zellkompartimenten Smn-defizienter Motoneurone auswirkt. Um den Gehalt an hnRNP R-Protein und dessen Verteilung in Motoneuronen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörperfärbungen gegen hnRNP R in An- und Abwesenheit von 8-CPT-cAMP durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben eine Fehlverteilung von hnRNP R in unbehandelten Smn-defizienten Motoneuronen, mit deutlich geringerer Signalintensität im Axon und im Wachstumskegel. *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneurone, die mit 8-CPT-cAMP behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu unbehandelten Zellen einen signifikanten Anstieg der Signalintensität im Axon und im Wachstumskegel (vgl. Abbildung 24 und Tabelle 7).

Rossoll und Mitarbeiter konnten zudem nachweisen, dass hnRNP R spezifisch die nicht mutierte Form von Smn bindet. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, inwieweit Smn/SMN und hnRNP R in kultivierten Motoneuronen kolokalisieren. Smn-defiziente Motoneurone wiesen im Vergleich zu mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2- und *Smn*^{+/+};SMN2-Motoneuronen deutlich geringere Signalintensitäten der beiden Proteine auf. Dieses Ergebnis macht die Unterscheidung zwischen erhöhter Signalintensität versus erhöhter Kolokalisation von SMN und hnRNP R in mit cAMP behandelten *Smn*^{-/-};SMN2-Motoneuronen schwierig. Es scheint, als würden SMN und hnRNP R in Smn-defizienten Motoneuronen geringer kolokalisieren als in Kontrollen und mit 8-CPT-cAMP behandelten Smn-defizienten Motoneuronen (siehe Abbildung 25). Diese Interpretation der Ergebnisse würde die Vermutung bestärken, dass die Interaktion von SMN und hnRNP R in Smn-defizienten Motoneuronen gestört ist.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass zyklisches Adenosinmonophosphat zu einer Erhöhung an SMN und hnRNP R in Smn-defizienten Motoneuronen führt und möglicherweise eine vermehrte Kolokalisation der beiden Proteine bewirkt. Schlussfolgernd könnte die durch cAMP erhöhte SMN-Proteinmenge zu einer erhöhten Stabilität oder vermehrten Interaktion mit hnRNP R führen, und somit letztlich in einen vermehrten axonalen Transport von β -Aktin-mRNA resultieren. Dieses Zusammenspiel könnte zu der beobachteten Erhöhung der

β -Aktin-Anreicherung in den distalen Nervenzellfortsätzen führen und das Auswachsen der Axone und die Aufrechterhaltung der Synapsen ermöglichen.

6.2.5 Isolierte Smn-defiziente Motoneurone als *in vitro* Assay für einen Substanz-Screen

Die in dieser Dissertation beschriebene Etablierung des *in vitro* Assays von kultivierten Motoneuronen zeigt eindeutig, dass Smn-defiziente Motoneurone durch verkleinerte Wachstumskegel, verbunden mit einem defekten Ca_v2.2 „Clustering“ und einem veränderten axonalen Auswachsen, einen Differenzierungsdefekt aufweisen.

Eine Behandlung der Smn-defizienten Motoneuronen mit zyklischem AMP führt zu einer fast vollständigen Kompensation der Ca_v2.2-Zusammenlagerung und nachfolgend zur Kompensation der Erregbarkeit und Axonlänge. Somit wurde mit dieser Arbeit ein „Proof of Principle“ erarbeitet, welcher zeigt, dass eine Erhöhung an SMN-Protein zu einer Kompensation der *in vitro* beschriebenen morphologischen und funktionellen Defekte führt. Mit Hilfe dieses *in vitro* Assays ist es nun möglich, weitere Substanzen, die in der Lage sind die SMN2-Transkription zu stimulieren, auf ihr kompensatorisches Potential zu testen.

In diesem Zusammenhang wären die so genannten Histondeacetylase(HDAC)-Inhibitoren zu nennen, welche eine Lockerung der DNA-Struktur bewirken und somit eine verstärkte Transkription einiger Gene ermöglichen (Allfrey, 1966; Jenuwein und Allis, 2001; Kernochnan et al., 2005; van Bergeijk et al., 2006). Die DNA eukaryontischer Zellen ist mit Histonen assoziiert (Georgopoulos, 2002). Modifikationen am N-terminalen Ende der Histonproteine durch Acetylierung oder Deacetylierung können die Interaktion zwischen DNA und Histonen verändern und stellen somit einen Regulationsmechanismus der Genexpression dar (Grunstein, 1997; Kuo und Allis, 1998; Struhl, 1998; Jenuwein und Allis, 2001). Die Rekrutierung von Histonacetyltransferasen ist mit einer offenen DNA-Konformation vergesellschaftet, welche die Transkription von Genen erleichtert (Jenuwein und Allis, 2001; Gurvich et al., 2004). Im Gegensatz dazu bewirkt die Deacetylierung von Histonen durch HDACs eine geschlossene Chromatin-Konformation und somit in der Regel eine Unterdrückung der Transkription

(Gurvich et al., 2004; Hsieh et al., 2004). Die Hemmung der HDACs führt typischerweise zu einer Erleichterung der Transkription (Gurvich et al., 2004). Als Beispiel für Histondeacetylase-Inhibitoren könnte die Valproinsäure als ein bereits zugelassenes Medikament (Antiepileptikum) dienen, welche die Transkription von 2% aller bekannten Gene, darunter auch *SMN2*, stimuliert (Pazin und Kadonaga, 1997; Brichta et al., 2003; Sumner et al., 2003). Verschiedene Studien konnten demonstrieren, dass Valproat die SMN-Proteinmenge in Zellen, welche von SMA-Patienten stammen, erhöht (Brichta et al., 2003; Sumner et al., 2003). Daneben konnte bei SMA-Mäusen nach Behandlung mit Valproat eine geringere Degeneration von spinalen Motoneuronen beobachtet werden (Tsai et al., 2006). Zudem zeigten mit Valproat behandelte Mäuse eine verbesserte motorische Funktion, geringere Muskelatrophie und bessere Innervation der neuromuskulären Endplatte als unbehandelte Mäuse (Tsai et al., 2008). Diese Ergebnisse erscheinen vielversprechend. Weitere HDAC-Inhibitoren, wie beispielsweise Phenylbutyrat oder Trichostatin A, bewirken auch eine Steigerung der SMN-Proteinmenge (Andreassi et al., 2004; Avila et al., 2007). Nun wäre es interessant weiter zu untersuchen, ob die durch HDAC-Inhibitoren bewirkte SMN-Stimulation ebenfalls zu einer Kompensation der in dieser Dissertation beschriebenen morphologischen und funktionellen Defekte bei *Smn*-defizienten Motoneuronen führt, und damit HDAC-Inhibitoren als mögliches Therapeutikum für die spinale Muskelatrophie in Betracht gezogen werden können.

7 Zusammenfassung

Die proximale spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, welche durch fortschreitende Muskelatrophie mit Betonung der proximalen Extremitäten, sowie zunehmende motorische Lähmungen charakterisiert wird. Bedingt wird diese neurodegenerative Erkrankung durch Mutation bzw. Deletion des *SMN1*-Gens auf Chromosom 5q13. Dies führt zu reduzierten Mengen des ubiquitär exprimierten SMN-Proteins, da der Verlust des *SMN1*-Gens nicht durch das noch verbleibende *SMN2*-Gen kompensiert werden kann. Die SMN-Promotor-Region enthält ein CRE II bindendes Element, welches Effekte von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelt und so die SMN-Transkription in untersuchten Zellen stimuliert. Ausgehend von diesem Befund stellte sich die Frage, ob cAMP dem Mangel an volllängigen SMN bei der SMA entgegen wirkt. Daher wurden für diese Dissertation neurosphärenbildende kortikale Vorläuferzellen und primär kultivierte Motoneuronen von *Smn*^{+/+}; *SMN2*- und *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Mausembryonen untersucht, um zu klären, ob die cAMP-Behandlung der Zellen zu einer Hochregulierung des *SMN2*-Transkripts führt, und durch die resultierende Erhöhung des SMN-Proteingehalts morphologische und funktionelle Defekte kompensiert werden. Die Untersuchung zeigte eine signifikante Zunahme des *SMN2*-Transkriptgehalts in Anwesenheit von cAMP. Dadurch kam es zu einem Anstieg der SMN-Proteinmenge im Soma, Axon und Wachstumskegel von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen. Die Verteilungsstörung des SMN-Interaktionspartners hnRNP R mit fehlender kontrolltypischer Anreicherung im distalen Axon und Wachstumskegel von *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen wurde ebenfalls durch cAMP kompensiert. *Smn*-defiziente Motoneurone zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen kleinere Wachstumskegel sowie ein Defizit an β -Aktin im distalen Axon. Zudem fehlte in *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen die bei Kontrollen ausgeprägte Zusammenlagerung von N-Typ spezifischen Ca^{2+} -Kanälen in der Präsynapse, die nach Kontakt mit der β -Kette des endplattenspezifischen Laminin-221 spontan öffnen und so einen intrazellulären Kalziumanstieg bewirken, wodurch es zu Erregbarkeitsstörungen und Axonelongationsdefekten bei *Smn*-defizienten Motoneuronen kommt. Die Behandlung der *Smn*-defizienten Motoneuronen mit cAMP führte zur Vergröße-

zung der Wachstumskegelfläche und zu einer im Verlauf des Axons zunehmenden Anfärbung mit β -Aktin. Außerdem kam es zu einer Erhöhung der Menge an $Ca_v2.2$ -Kanalprotein in den Wachstumskegeln Smn-defizienter Motoneurone, was mit einer erhöhten Erregbarkeit korrelierte und zu einer Normalisierung der Axonlänge von $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen auf Laminin-221 führte. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass Smn-defiziente Motoneurone *in vivo* Defekte im präsynaptischen Bereich der Motorendplatte aufweisen. In Zukunft können mit dem beschriebenen *in vitro* Assay weitere Substanzen, welche die *SMN2*-Transkription stimulieren, auf ihr kompensatorisches Potential getestet werden.

8 Literaturverzeichnis

Allfrey, V. G. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Can. Cancer Conf.* **1966**, 6, 313–335.

Andreassi, C.; Angelozzi, C.; Tiziano, F. D.; Vitali, T.; De Vincenzi, E.; Boninsegna, A.; Villanova, M.; Bertini, E.; Pini, A.; Neri, G.; Brahe, C. Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **2004**, 12, 59–65.

Atlas, D.; Wiser, O.; Trus, M. The voltage-gated Ca²⁺ channel is the Ca²⁺ sensor of fast neurotransmitter release. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2001**, 21, 717–731.

Avila, A. M.; Burnett, B. G.; Taye, A. A.; Gabanella, F.; Knight, M. A.; Hartenstein, P.; Cizman, Z.; Di Prospero, N. A.; Pellizzoni, L.; Fischbeck, K. H.; Sumner, C. J. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 659–671.

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.; 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.

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.

Battle, D. J.; Lau, C.; Wan, L.; Deng, H.; Lotti, F.; Dreyfuss, G. The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol. Cell* **2006**, 23, 273–279.

Battle, D. J.; Kasim, M.; Wang, J.; Dreyfuss, G. SMN-independent subunits of the SMN complex. Identification of a small nuclear ribonucleoprotein assembly intermediate. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 27953–27959.

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.

Blanc, V.; Navaratnam, N.; Henderson, J. O.; Anant, S.; Kennedy, S.; Jarmuz, A.; Scott, J.; Davidson, N. O. Identification of GRY-RBP as an apolipoprotein B RNA-binding protein that interacts with both Apobec-1 and Apobec-1 complementation factor to modulate C to U editing. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10272–10283.

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.

Boon, K. L.; Xiao, S.; McWorther, M. L.; Donn, T.; Wolf-Saxon, E.; Bohnsack, M. T.; Moens, C. B.; Beattie, C. E. Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neurotransmitter junction defects. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 3615–3625.

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.

Brichta, L.; Hofmann, Y.; Hahnen, E.; Siebzehnrubl, F. A.; Raschke, H.; Blumcke, I.; Eyupoglu, I. Y.; Wirth, B. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 2481–2489.

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

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.

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

Burghes, A. H. und Beattie, C. E. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 597–609

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

Bürglen, L.; Seroz, T.; Miniou, P.; Lefebvre, S.; Burlet, P.; Munnich, A.; Pequignot, E. V.; Egly, J.; 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.

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.

Burnett, B. G.; Muñoz, E.; Tandon, A.; Kwon, D. Y.; Sumner, C. J.; Fischbeck, K. H. Regulation of SMN protein stability. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 1107–1115.

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.

Campbell, L.; Hunter, K. M.; Mohaghegh, P.; Tinsley, J. M.; Brasch, M. A.; Davies, K. E. Direct interaction of Smn with Dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 1093–1100.

Cao, Y.Q.; Piedras-Renteria, E. S.; Smith, G. B.; Chen, G.; Harata, N. C.; Tsien, R. W. Presynaptic Ca²⁺ channels compete for channel type-preferring slots in altered neurotransmission arising from Ca²⁺ channelopathy. *Neuron*, **2004**, *43*, 387–400.

Carissimi, C.; Baccon, J.; Straccia, M.; Chiarella, P.; Maiolica, A.; Sawyer, A.; Rappsilber, J.; Pellizzoni, L. Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2348–2354.

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.

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*, 715–728.

Chan, Y. B.; Miguel-Aliaga, I.; Franks, C.; Thomas, N.; Trülsch, 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.; Parkinson, 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*, 1181–1194.

Charroux, B.; Pellizzoni, L.; Parkinson, 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.

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.

Cingolani, L. A. und Goda, Y. Actin and Action: Interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 344–356.

Coover, 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.

Cox, L. J.; Hengst, U.; Gurskaya, N. G.; Lukyanov, K. A.; Jaffrey, S. R. Intraxonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 149–159.

Crawford, T. O. From enigmatic to problematic: the new molecular genetics of childhood spinal muscular atrophy. *Neurology* **1996**, *46*, 335–340.

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

Czeizel, A. und Hamula, J. A Hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. *J. Med. Genet.* **1989**, *26*, 761–763.

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.* **1997**, *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.

Dreyfuss, G.; Matunis, M. J.; Piñol-Roma, S.; Burd, C. G. HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 289–321.

Dwarki, V. J.; Montminy, M.; Verma, I. M. Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J.* **1990**, *9*, 225–232.

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.

Feldkötter, M.; Schwarzer, V.; Wirth, R.; Wienker, T. F.; Wirth, B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *70*, 358–368.

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.

Fox, M. A.; Sanes, J. R.; Borza, D. B.; Eswarakumar, V. P.; Fässler, R.; Hudson, B. G.; John, S. W.; Ninomiya, Y.; Pedchenko, V.; Pfaff, S. L.; Rheault, M. N.; Sado, Y.; Segal, Y.; Werle, M. J.; Umemori, H. Distinct target-derived signals organize formation, maturation and maintenance of motor nerve terminals. *Cell* **2007**, *129*, 179–193.

Friesen, W. J. und 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.

Gabanella, F.; Butchbach, M. E.; Saieva, L.; Carissimi, C.; Burghes, A. H.; Pelizzoni, L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* **2007**, *2*, e921.

Gall, J. G.; Bellini, M.; Wu, Z.; Murphy, C. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell.* **1999**, *10*, 4385–4402.

Gall, J. G. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 273–300.

Gall, J. G. The centennial of the Cajal body. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 975–80.

Gavrilov, D. K.; Shi, X.; Das, K.; Gilliam, T. C.; Wang, C. H. Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat. Genet.* **1998**, *20*, 230–231.

Georgopoulos, K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 162–174.

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.

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

Greka, A.; Navarro, B.; Oancea, E.; Duggan, A.; Clapham, D. E. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat. Neurosci.* **2003**, *6*, 837–845.

Grimmler, M.; Otter, S.; Peter, C.; Müller, F.; Chari, A.; Fischer, U. Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 3099–3111.

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.; Wilmshurst, J. M.; Wienker, T. F.; Sendtner, M.; Rudnik-Schöneborn, S.; Zerres, K.; Hübner, C. Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 75–77.

Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **1997**, *389*, 349–352.

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.

Gurvich, N.; Tsygankova, O. M.; Meinkoth, J. L.; Klein, P. S. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1079–1086.

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.

Hannan, A. J.; Gunning, P.; Jeffrey, P. L.; Weinberger, R. P. Structural compartments within neurons: developmentally regulated organization of microfilament isoform mRNA and protein. *Mol. Cell. Neurosci.* **1998**, *11*, 289–304.

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.

Hao, T.; Fuller, H. R.; Lam, T.; Le, T. T.; Burghes, A. H.; Morris, G. E. Absence of gemin5 from SMN complexes in nuclear Cajal bodies. *BMC Cell Biol.* **2007**, *8*, 28.

Harlow, M. L.; Ress, D.; Stoschek, A.; Marshall, R. M.; McMahan, U. J. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* **2001**, *409*, 479 – 484.

Hill, M. A. und 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, J.; Nakashima, K.; Kuwabara, T.; Mejia, E.; Gage, F. H. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16659–16664.
- 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.
- Hunter, D. D.; Porter, P. E.; Bullock, J. W.; Adams, S. P.; Merlie, J. P.; Sanes, J. R. Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell* **1989**, *59*, 905–913.
- Hunter, D. D.; Cashman, N.; Morris-Valero, R.; Bullock, J. W.; Adams, S. P.; Sanes, J. R. An LRE(Leucine-Arginine-Glutamate)-dependent mechanism for adhesion of neurons to s-laminin. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 3960–3971.
- Huppelsberg, J.; Walter, K. Kurzlehrbuch Physiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* **2003**. S. 246.
- Ino, M.; Yoshinaga, T.; Wakamori, M.; Miyamoto, N.; Takahashi, E.; Sonoda, J.; Kagava, T.; Oki, T.; Nagasu, T.; Nishizawa, Y.; Tanaka, I.; Imoto, K.; Aizawa, S.; Koch, S.; Schwartz, A.; Niidome, T.; Sawada, K.; Mori, Y. Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Ca_v2.2) of N-type calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 5323–5328.
- 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.; 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.

Jablonka, S.; Beck, M.; Lechner, B. D.; Mayer, C.; Sendtner, M. Defective Ca²⁺-channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 139–149.

Jenuwein, T. und Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **2001**, *293*, 1074–1080.

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.

Jun, K.; Piedras-Rentería, E. S.; Smith, S. M.; Wheeler, D. B.; Lee, S. B.; Lee, T. G.; Chin, H.; Adams, M. E.; Scheller, R. H.; Tsien, R. W.; Shin, H. S. Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 15245–15250.

Kariya, S.; Park, G.; Maeno-Hikichi, Y.; Leykekhman, O.; Lutz, K.; Arkovitz, M. S.; Landmesser, L. T.; Monani, U. R. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 2552–2569.

Kernochan, L. E.; Russo, M. L.; Woodling, N. S.; Huynh, T. N.; Avila, A. M.; Fischbeck, K. H.; Sumner, C. J. The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1171–1182.

- Kiebler, M. A. und DesGroseillers, L. Molecular insights in to mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **2000**, *25*, 19–28.
- Kittel, R. J.; Hallermann, S.; Thomsen, S.; Wichmann, C.; Sigrist, S. J.; Heckmann, M. Active zone assembly and synaptic release. *Biochem. Soc.* **2006**, *34*, 939–941.
- Klinke, R.; Pape, H.; Silbernagl, S. Physiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* **2005**. S. 80–85.
- Knight, D.; Tolley, L. K.; Kim, D. K.; Lavidis, N. A.; Noakes, P. G. Functional analysis of neurotransmission at β 2-laminin deficient terminals. *J. Physiol. (Lond.)* **2003**, *546*, 789–800.
- Kolb, S. J.; Battle, D. J.; Dreyfuss, G. Molecular functions of the SMN complex. *J. Child Neurol.* **2007**, *22*, 990–994.
- Kong, L.; Wang, X.; Choe, D. W.; Polley, M.; Burnett, B. G.; Bosch-Marcé, M.; Griffin, J. W.; Rich, M. M.; Sumner, C. J. Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 842–851.
- Kunze, K. Praxis der Neurologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* **1999**. S. 313–318.
- Kuo, M. H. und Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **1998**, *20*, 615–626.
- Le, T. T.; Pham, L. T.; Butchbach, M. E. R.; Zhang, H. L.; Monani, U. R.; Covert, D. D.; Gavriliina, T. O.; Xing, L.; Bassell, G. J.; Burghes, A. H. M. SMND7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 845–857.
- Lefebvre, S.; Bürglen, L.; Reboullet, S.; Clermont, O.; Burlet, P.; Viollet, L.; Benichou, B.; Cruaud, C.; Millasseau, P.; Zeviani, M.; et al. 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.
- Li, S.; Edgar, D.; Fassler, R.; Wadsworth, W.; Yurchenco, P. D. The role of Laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell* **2003**, *4*, 631–624.
- Liu, Q. und 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.* **1998**, *19*, 63–66.
- 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. und 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.
- Lorson, M. A.; Dickson, A. M.; Shaw, D. J.; Todd, A. G.; Young, E. C.; Morse, R.; Wolstencroft, C.; Lorson, C. L.; Young, P. J. Identification and characterization of a nuclear localization signal in the SMN associated protein, Gemin4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *375*, 33–37.
- Lüllmann-Rauch, R. Histologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* **2003**. S. 17, 18, 149–152.
- Lund, L. M.; Machado, V. M.; Mc Quarrie, I. G. Increased beta-actin and tubulin polymerization in regrowing axons: relationship to the conditioning lesion effect. *Exp. Neurol.* **2002**, *178*, 206–312.

- Luo, L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 601–635.
- Majumder, S.; Varadharaj, S.; Ghoshal, K.; Monani, U.; Burghes, A. H.; Jacob, S. T. Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14803–14811.
- Masuhr, K. F.; Neumann, M. Neurologie. *Hippokrates Verlag GmbH*, Stuttgart **1998**. S. 213.
- Matera, A. G. Cajal bodies. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R503.
- McGovern, V.; Gavrilina, T. O.; Beattie, C. E.; Burghes, A. H. M. Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 2900–2909.
- 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.; Lagerbauer, B.; Zobawa, M.; Lottspeich, F.; Fischer, U. Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 1977–1986.
- 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.
- 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.

Mizutani, A.; Fukuda, M.; Iyata, K.; Shiraishi, Y.; Mikoshiba, K. SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9823–9831.

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

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.* **1999**, *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.; Gavrillina, 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.

Monti, B.; Marri, L.; Contestabile, A. NMDA receptor-dependent CREB activation in survival of cerebellar granule cells during in vivo and in vitro development. *Eur. J. Neurosci.* **2002**, *16*, 1490–1498.

Montminy, M. R. und Bilezikjian, L. M. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* **1987**, *328*, 175–178.

- Morales, M.; Colicos, M. A.; Goda, Y. Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* **2000**, *27*, 539–550.
- Mortier, W. Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* **1994**. S. 52–79.
- 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.
- Munsat, T. L. und Davies, K. E. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul. Disord.* **1992**, *2*, 423–428.
- Murray, L. M.; Comley, L. H.; Thomson, D.; Parkinson, N.; Talbot, K.; Gillingwater, T. H. Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 949–962.
- Neubauer, G.; King, A.; Rappsilber, J.; Calvio, C.; Watson, M.; Ajuh, P.; Sleeman, J.; Lamond, A.; Mann, M. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat. Genet.* **1998**, *20*, 46–50.
- Nicole, S.; Cifuentes-Diaz, C.; Frugier, T.; Melki, J. Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* **2002**, *26*, 4–13.
- Nilsen, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* **2003**, *25*, 1147–1149.
- Nishimune, H.; Sanes, J. R.; Carlson, S. S. A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* **2004**, *423*, 990–995.
- Noakes, P. G.; Gautam, M.; Mudd, J.; Sanes, J. R.; Merlie, J. P. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin β 2. *Nature* **1995**, *374*, 258–262.

- Ogawa, C.; Usui, K.; Ito, F.; Itoh, M.; Hayashizaki, Y.; Suzuki, H. Role of survival motor neuron complex components in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14609–14617.
- Oprea, G. E.; Kröber, S.; McWorther, M. L.; Rossoll, W.; Müller, S.; Krawczak, M.; Bassell, G. J.; Beattie, C. E.; Wirth, B. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* **2008**, *320*, 524–527.
- Otter, S.; Grimmler, M.; Neuenkirchen, N.; Chari, A.; Sickmann, A.; Fischer, U. A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5825–5833.
- 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.
- Pagani, R.; Song, M.; McEnery, M.; Qin, N.; Tsien, R.W.; Toro, L.; Stefani, E.; Uchitel, O. D. Differential expression of $\alpha 1$ and β subunits of voltage dependent Ca²⁺ channels at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse. *Neuroscience* **2004**, *123*, 75–85.
- 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.; 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.
- Patton, B. L.; Miner, J. H.; Chiu, A. Y.; Sanes, J. R. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 1507–1521.
- Patton, B. L.; Chiu, A. Y.; Sanes, J. R. Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature* **1998**, *393*, 698–701.

Paushkin, S.; Charroux, B.; Abel, L.; Parkinson, R. A.; Pellizzoni, L.; Dreyfuss, G. The survival motor neuron protein of *Schizosacharomyces 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 assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 305–312.

Pazin, M. J. und Kadonaga, J. T. What`s up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **1997**, *89*, 325–328.

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.* **1978**, *15*, 409–413.

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.* **1999**, *96*, 11167–11172.

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

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.* **2001b**, *152*, 75–85.

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.
- Pellizzoni, L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* **2007**, 8, 340–345.
- Photowala, H.; Freed, R.; Alford, S. Location and function of vesicle clusters, active zones and Ca²⁺ channels in the lamprey presynaptic terminal. *J. Physiol.* **2005**, 569, 119–135.
- Poeck, K.; Hacke, W. Neurologie. *Springer-Verlag Berlin* **2001**, S. 663–667.
- Porter, B. E.; Weis, J.; Sanes, J. R. A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron* **1995**, 14, 549–559.
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*; de Gruyter: Berlin, 258. Auflage, **1998**, S. 1057–1058.
- Raker, V. A.; Plessel, G.; Lührmann, R. The SnRNP core assembly pathway: Identification of stable core protein heteromeric complexes and an SnRNP sub-core particle in vitro. *EMBO J.* **1996**, 15, 2256–2269.
- Roberts, D. F.; Chavez, J.; Court, S. D. The genetic component in child mortality. *Arch. Dis. Child.* **1970**, 45, 33–38.
- 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.
- 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.; Lefebvre, C.; Kang, X.; Salih, M.; Aubry, H.; Tamai, K.; Guan, X.; Ioannou, P.; Crawford, T. O.; de Jong, P. J.; Surth, L.; Ikeda, J.; Korneluk, R. G.; MacKenzie, A. The gene for neuronal apoptosis inhibitor 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.

Sanes, J. R.; Engvall, E.; Butkowski, R.; Hunter, D.D. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 1685–1699.

Sanes, J. R. und Lichtman, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 389–442.

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.

Santafé, M. M.; Garcia, N.; Lanuza, M. A.; Uchitel, O. D.; Tomás, J. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience* **2001**, *102*, 697–708.

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.

- Scheiffele, P. Cell-cell signalling during synapse formation in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, *26*, 485–508.
- Schneggenburger, R. und Neher, E. Presynaptic calcium and control of vesicle function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2005**, *15*, 266–274.
- 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, 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. und 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. und Wilkinson, M. F. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* **2000**, *102*, 135–138.
- Son, Y. J.; Patton, B.; Sanes, J. R. Induction of presynaptic differentiation in cultured neurons by extracellular matrix components. *Eur. J. Neurosci.* **1999**, *11*, 3457–3467.
- Spafford, J. D. und Zamponi, G. W. Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 308–314.

- Spitzer, N. C. Electrical activity in early neuronal development. *Nature* **2006**, *444*, 707–712.
- Struhl, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanism. *Genes. Dev.* **1998**, *12*, 599–606.
- Sumner, C. J.; Huynh, T. H.; Markowitz, J. A.; Perhac, J. S.; Hill, B.; Coovert, D. D.; Schussler, K. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann. Neurol.* **2003**, *54*, 647–654.
- Sumner, C. J. Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J. Child Neurol.* **2007**, *22*, 979–989.
- Tsai, L. K.; Tsai, M. S.; Lin, T. B.; Hwu, W. L.; Li, H. Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *24*, 286–295.
- Tsai, L. K.; Tsai, M. S.; Ting, C. H.; Li, H. Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 1243–1254.
- Urbano, F. J.; Rosato-Siri, M. D.; Uchitel, O. D. Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions. *Mol. Membr. Biol.* **2002**, *19*, 293–300.
- Urbano, F. J.; Piedras-Rentería, E. S.; Jun, K.; Shin, H.; Uchitel, O. D. Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3491–3496.
- Van Bergeijk, J.; Haastert, K.; Grothe, C.; Claus, P. Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2006**, *67*, 244–247.
- 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.
- Wang, J. und Dreyfuss, G. Characterization of functional domains of the SMN protein *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45387–45393.

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

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

Wirth, B.; Schmidt, T.; Hahnen, E.; Rudnik-Schöneborn, S.; Krawczak, M.; Müller-Myhsok, B.; Schönling, J.; Zerres, K. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy (SMA): mutational mechanisms, parental origin, mutation rate and implications for prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *61*, 1102–1111.

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.

Yao, J.; Sasaki, Y.; Wen, Z.; Bassell, G. J.; Zheng, J. Q. An essential role for β -actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 1265–1273.

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.* **2000**, *9*, 2869–2877.

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

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, 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, Z.; Lotti, F.; Dittmar, K.; Younis, I.; Wan, L.; Kasim, M.; Dreyfuss, G. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* **2008**, *133*, 585–600.

Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich einigen Personen einen herzlichen Dank, ohne deren Hilfe und Unterstützung das Gelingen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sibylle Jablonka für die interessante Aufgabenstellung und die Aufnahme in die „Laborgemeinschaft“. Mit viel Geduld und wertvollen Ratschlägen betreute Frau Jablonka meine Arbeit und trug mit fundiertem Fachwissen und Engagement in besonderem Maße zum Gelingen der vorliegenden Dissertation bei. Daneben hatte sie stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Michael Sendtner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor der Klinischen Neurobiologie und die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ein weiteres Wort des Dankes geht an Frau Dr. med. vet. Bettina Holtmann für die Betreuung der Mauslinie. Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Christine Schneider für die Hilfe bei der Motoneuronzellkulturen, für ihre tatkräftige Unterstützung und unermüdliche Geduld. Von ihr lernte ich im Labor zu arbeiten und eine Vielzahl von Techniken durchzuführen.

Danke sage ich auch für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die harmonische Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Klinische Neurobiologie. Frau Carolin Mann danke ich für die zahlreichen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Gespräche, die für Abwechslung im Laboralltag gesorgt haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den Menschen, die mein Studium und letztendlich diese Doktorarbeit ermöglicht haben. Herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich nicht nur in finanzieller Hinsicht unterstützt haben, sondern in allen Belangen immer eine Stütze für mich gewesen sind und meinen Weg begleitet haben. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Schwester Ute Mayer für die kritische Korrektur meiner Arbeit. Für die immer wieder aufbauenden Gespräche möchte ich es nicht versäumen, meiner Patentante Rita Dehn zu danken. Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Großeltern, die mich während des Studiums stets unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Christine Rita Mayer
Geburtsdatum/-ort 24.04.1982 in Alzenau in Ufr.

Studium

10/2002 – 05/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
08.09.2004 Ärztliche Vorprüfung
28.05.2009 Zweite Ärztliche Prüfung

Approbation

23.06.2009 Approbation als Ärztin

Würzburg, den 2.10.2009