## UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN

# PATHOMECHANISMUS DER SMA DURCH ANALYSE DER

## SMN-INTERAKTIONSPARTNER HNRNP-R UND HNRNP-Q

# I. INHALTSVERZEICHNIS

| 1.       | Zusammenfassung   | 8  |
|----------|---|----|
| 2.       | Summary   | 10 |
| 3.       | Einleitung  | 11 |
| 3.1.     | Die spinale Muskelatrophie                                  | 11 |
| 3.2.     | Das survival motor neuron-Gen                               | 12 |
| 3.3.     | SMN-Interaktionspartner                                     | 13 |
| 3.4.     | hnRNP-R und hnRNP-Q   | 16 |
| 3.5.     | Axonaler Transport  | 17 |
| 3.6.     | Ziel der Arbeit   | 21 |
| 4.       | Materialien und Methoden                                    | 24 |
| 4.1.     | Materialien   | 24 |
| 4.1.1.   | Chemikalien   | 24 |
| 4.1.2.   | Lösungen, Puffer und Medien                                 | 24 |
| 4.1.3.   | Medien, Lösungen und Puffer für das Two-Hybrid-System       | 24 |
| 4.1.3.1. | YPD   | 24 |
| 4.1.3.2. | Herstellung von Dropoutmedien                               | 24 |
| 4.1.3.3. | β-Galactosidasetest-Färbelösung                             | 25 |
| 4.1.3.4. | Z-Puffer  | 25 |
| 4.1.4.   | Lösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, | 25 |
|          | Westernblot und Koimmunpräzipitation                        |    |
| 4.1.4.1  | 4x Tris-SDS-Trenngelpuffer                                  | 25 |
| 4.1.4.2. | 4x Tris-SDS-Sammelgelpuffer                                 | 25 |
| 4.1.4.3. | 30% Acrylamidlösung (29:1)                                  | 26 |
| 4.1.4.4. | 5x SDS-PAGE-Gellaufpuffer                                   | 26 |
| 4.1.4.5. | 2x Probenpuffer (Laemmli)                                   | 26 |
| 4.1.4.6. | Western-Transferpuffer                                      | 26 |
| 4.1.4.7. | 10x TBST  | 26 |
| 4.1.4.8. | Lysispuffer   | 26 |
| 4.1.4.9. | RIPA-Puffer   | 26 |
| 4.1.5.   | Zellkulturen  | 27 |

| 4.1.5.1.  | Motoneuronenmedium   | 27 |  |  |
|-----------|--|----|--|--|
| 4.1.5.2.  | PC12-Wachstumsmedium   |    |  |  |
| 4.1.5.3.  | .5.3. PC12-Differenzierungsmedium  |    |  |  |
| 4.1.5.4.  | 5.4. Mowiol  |    |  |  |
| 4.1.6.    | Wirtszellen  | 28 |  |  |
| 4.1.6.1.  | Bakterien  | 28 |  |  |
| 4.1.6.2.  | Hefen  | 28 |  |  |
| 4.1.7.    | Plasmide   | 28 |  |  |
| 4.1.8.    | Molekulargewichtsstandards   | 28 |  |  |
| 4.1.9.    | Enzyme   | 29 |  |  |
| 4.1.10.   | Filme  | 29 |  |  |
| 4.1.11.   | Kits   | 29 |  |  |
| 4.1.12.   | Primer   | 29 |  |  |
| 4.1.13.   | Antikörper   | 34 |  |  |
| 4.1.13.1. | primäre Antikörper   | 34 |  |  |
| 4.1.13.2. | sekundäre Antikörper   | 35 |  |  |
| 4.1.14.   | BAC-Klone  | 35 |  |  |
| 4.1.15.   | Mauslinien   | 38 |  |  |
| 4.2.      | Methoden   | 39 |  |  |
| 4.2.1.    | Herstellung polyklonaler Antikörper gegen hnRNP-R<br>und hnRNP-Q                       | 39 |  |  |
| 4.2.2.    | Klonierung von mutierten Smn cDNAs und hnRNP-R und -Q cDNAs für Koimmunpräzipitationen | 39 |  |  |
| 4.2.3.    | Koimmunoprezipitationen  | 40 |  |  |
| 4.2.4.    | 4.     Westernblot Analysen  |    |  |  |
| 4.2.5.    | Genotypisierungen  | 41 |  |  |
| 4.2.6.    | RT-PCR   | 42 |  |  |
| 4.2.7.    | Immundetektion von Smn, hnRNP-R und tau in spinalen                                    | 42 |  |  |
|           | Motoneuronen an Rückenmarksschnitten   |    |  |  |
| 4.2.8.    | Techniken für die Kultivierung embryonaler Motoneurone                                 | 43 |  |  |
| 4.2.9.    | Fixierung, Färbung und Vermessung kultivierter Nervenzellen                            | 43 |  |  |
| 4.2.10.   | Analyse der genomischen Region   | 44 |  |  |
| 4.2.11.   | Stabile PC12-Linien mit NGF differenziert  | 45 |  |  |

| 4.2.12. | Analyse der genomischen DNA von SMA-Patienten  | 45 |
|---------|--|----|
| 5.      | Ergebnisse   | 47 |
| 5.1.    | Polyklonale Antikörper gegen hnRNP-R und hnRNP-Q   | 47 |
| 5.1.1.  | Zielsetzung  | 47 |
| 5.1.2.  | Herstellung polyklonaler Antikörper gegen hnRNP-R und -Q   | 47 |
| 5.1.3.  | Zusammenfassung  | 48 |
| 5.2.    | hnRNP-R und hnRNP-Q interagieren mit Wildtyp-Smn, aber nicht                                       | 50 |
|         | mit mutierten Isoformen, die bei Patienten mit SMA identifiziert<br>wurden                         |    |
| 5.2.1.  | Zielsetzung  | 50 |
| 5.2.2.  | hnRNP-R und –Q interagieren mit Smn, aber nicht mit<br>trunkiertem Smn                             | 50 |
| 5.2.3.  | hnRNP-R und –Q interagieren direkt mit Smn   | 51 |
| 5.2.4.  | hnRNP-R und –Q interagieren nicht mit in SMA-Patienten   | 52 |
|         | gefundenen Formen von Smn  |    |
| 5.2.5.  | Zusammenfassung  | 54 |
| 5.3.    | hnRNP-R und hnRNP-Q sind in vielen Geweben exprimiert und  | 54 |
|         | im Rückenmark von Mäusen im Laufe der Entwicklung spezifisch                                       |    |
|         | reguliert  |    |
| 5.3.1.  | Zielsetzung  | 54 |
| 5.3.2.  | hnRNP-R- und –Q-Verteilung in unterschiedlichen Geweben  | 55 |
| 5.3.3.  | hnRNP-R- und –Q-Verteilung in unterschiedlichen<br>Entwicklungsstadien des Rückenmarkes            | 56 |
| 5.3.4.  | Verteilung der hnRNP-R und hnRNP-Q RNA-Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien | 57 |
| 5.3.5.  | Zusammenfassung  | 58 |
| 5.4.    | Das hnRNP-R Protein ist in den Axonen der Motoneurone<br>lokalisiert                               | 58 |
| 5.4.1   | Zielsetzung  | 58 |
| 5.4.2   | hnRNP-R und Smn kolokalisieren in den Motoneuronen des<br>Rückenmarkes                             | 59 |
| 5.4.3.  | hnRNP-R ist in einem Neuriten angereichert   | 59 |
| 5.4.4.  | hnRNP-R ist in den Axonen von Motoneuronen lokalisiert   | 61 |

| 5.4.5. | hnRNP-R findet sich hauptsächlich in den Axonen motorischer   | 62 |
|--------|---|----|
|        | Nerven  |    |
| 5.4.6. | Zusammenfassung   | 63 |
| 5.5.   | Analyse der genomischen Regionen von hnRNP-R und hnRNP-Q      | 64 |
| 5.5.1. | Zielsetzung   | 64 |
| 5.5.2. | Durchsuchen einer BAC-Bibliothek                              | 64 |
| 5.5.3. | Zusammenfassung   | 65 |
| 5.6.   | Analyse der genomischen Regionen von hnRNP-R und hnRNP-Q      | 66 |
|        | bei SMA-Patienten ohne Mutation im SMN-Gen                    |    |
| 5.6.1. | Zielsetzung   | 66 |
| 5.6.2. | Im menschlichen hnRNP-R-Gen gibt es Polymorphismen            | 66 |
| 5.6.3. | Zusammenfassung   | 67 |
| 5.7.   | Die Editierung von GluR2 ist bei Smn-/-;hSMN2-Mäusen          | 67 |
|        | unverändert   |    |
| 5.7.1. | Zielsetzung   | 67 |
| 5.7.2. | Die GluR2-mRNA in Smn-/-;SMN2-Mäusen entspricht der des       | 68 |
|        | Wildtyps  |    |
| 5.8.   | Die Morphologie kultivierter Motoneurone von Smn-defizienten  | 69 |
|        | Mäusen ist verändert  |    |
| 5.8.1. | Zielsetzung   | 69 |
| 5.8.2. | Die Überlebensrate der kultivierten Motoneurone ist bei SMN-  | 70 |
|        | defizienten Mäusen nicht verändert                            |    |
| 5.8.3. | In Smn-defizienten Mäusen ist die Zahl der "unpolaren"        | 71 |
|        | Motoneurone erhöht  |    |
| 5.8.4. | In Smn-defizienten Mäusen ist die Morphologie der Motoneurone | 73 |
|        | verändert   |    |
| 5.8.5. | Zusammenfassung   | 76 |
| 5.9.   | Überexpression von hnRNP-R und hnRNP-Q in Nervenzellen        | 77 |
|        | führt zu vermehrtem Neuritenwachstum                          |    |
| 5.9.1. | Zielsetzung   | 77 |
| 5.9.2. | Die Überexpression von hnRNP-R und -Q in PC12-Zellen führt zu | 78 |
|        | vermehrtem Neuritenwachstum                                   |    |
|        |   |    |

| 5.9.3. | hnRNP-R benötigt seine RNA-Bindestellen um das               | 80  |  |  |
|--------|--|-----|--|--|
|        | Neuritenwachstum zu fördern                                  |     |  |  |
| 5.9.4. | Zusammenfassung  |     |  |  |
| 6.     | Diskussion   | 84  |  |  |
| 6.1.   | hnRNP-R und hnRNP-Q interagieren nur mit intaktem Smn        | 84  |  |  |
| 6.2.   | Die Expression von hnRNP-R und hnRNP-Q                       | 86  |  |  |
| 6.3.   | hnRNP-R und Smn kolokalisieren in Motoraxonen                | 86  |  |  |
| 6.4.   | Die genomischen Regionen von hnRNP-R und hnRNP-Q             | 87  |  |  |
| 6.5.   | Editierung in Smn-defizienten Mäusen                         |     |  |  |
| 6.6.   | Smn-defiziente Motoneurone haben eine veränderte Morphologie |     |  |  |
| 6.7.   | hnRNP-R und hnRNP-Q fördern das Neuritenwachstum             |     |  |  |
| 6.8.   | Funktionen von hnRNP-R und hnRNP-Q im RNA-Metabolismus       |     |  |  |
|        | und -Transport   |     |  |  |
| 6.9.   | Kurzzusammenfassung der Experimente                          | 92  |  |  |
| 7.     | Abkürzungsliste  | 94  |  |  |
| 8.     | Referenzen   | 96  |  |  |
| 9.     | Danksagung   | 106 |  |  |

# II. ABBILDUNGSLISTE

| 3.4.1. | Vergleich der Aminosäuresequenzen von hnRNP-R und hnRNP-Q  | 22 |
|--------|--|----|
| 5.1.1. | Position der Peptide zur Antikörperherstellung   | 47 |
| 5.1.2. | Kaninchenantiserentest   | 48 |
| 5.1.3. | Verteilung von hnRNP-R in den Zellkörpern von murinen spinalen<br>Motoneuronen   | 49 |
| 5.2.1. | Smn interagiert direkt mit hnRNP-R und hnRNP-Q.(Koimmunpräzipitationen von Smn mit polyklonalen Antikörpern<br>gegen hnRNP-R und hnRNP-Q.) | 52 |
| 5.2.2. | Koimmunpräzipitationen von mutiertem Smn Protein mit polyklonalen Antikörpern gegen hnRNP-R und hnRNP-Q                                    | 53 |
| 5.3.1. | Verteilung der hnRNP-R und hnRNP-Q Proteinexpression in verschiedenen Geweben  | 55 |
| 5.3.2. | Veränderung der hnRNP-R und hnRNP-Q Proteinexpression<br>während verschiedener Entwicklungsstadien im Rückenmark der<br>Maus               | 56 |
| 5.3.3. | Regulierung der hnRNP-R und hnRNP-Q RNA-Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien  | 57 |
| 5.4.1. | Subzelluläre Verteilung von hnRNP-R und Smn in Motoneuronen  | 59 |
| 5.4.2. | Subzelluläre Verteilung von hnRNP-R und Smn in kultivierten<br>embryonalen Motoneuronen  | 60 |
| 5.4.3. | Kolokalisation von hnRNP-R und dem axonalen Marker PC1C6<br>anti-phospho-tau   | 61 |
| 5.4.4. | Subzelluläre Verteilung von hnRNP-R im Ischiasnerv der adulten<br>Maus   | 62 |
| 5.4.5. | Querschnitte durch verschiedene Nervenstränge  | 63 |
| 5.5.1. | Analyse der genomischen Regionen von hnRNP-R und hnRNP-Q   | 65 |
| 5.7.1. | Q/R-Editierungsstelle in Smn-/-;SMN2-Mäusen  | 69 |
| 5.8.1. | Verwendete Mauslinien  | 70 |
| 5.8.2. | Überlebenskurve  | 71 |
| 5.8.3. | ,,Polare und unpolare" Motoneurone der Genotypen<br>Smn+/+;SMN2 und Smn-/-;SMN2  | 72 |

| 5.8.4.          | Kulturen von Smn- und Sip-1/Gemin-2-defiziente Mäuse enthalten<br>weniger polare" Motoneurone als solche von wildtynischen | 73 |
|-----------------|--|----|
| 5.8.5.          | Die Axonlängen "polarer" Smn+/-;Gemin2+/- und Smn-/-;SMN2-   | 74 |
| 5.8.6.          | Motoneurone sind reduziert       Die Dendritenlängen sind nicht unterschiedlich  | 75 |
| 5.8.7.          | Die Neuritengesamtlänge "unpolarer" Motoneurone des Genotyps   | 76 |
| 5.0.1           | Smn-/-;SMN2 ist reduziert  |    |
| 5.9.1.          | Konstrukte zur Herstellung stabiler Zelllinien   Differenzierte PC12-Zelllinien  | 78 |
| 5.9.3.          | Länge des längsten Neuriten der PC12-Linien  | 80 |
| 5.9.4.          | Neuritengesamtlängen der PC12-Linien   | 81 |
| 5.9.5.          | Neuritenanzahl der PC12-Linien   | 82 |
| 5.9.6.<br>6.1.1 | Differenzierte RRM-Zelllinien<br>Modelle der Interaktionen zwischen hnRNP-R -O und Smn                                     | 83 |
| 0.1.1.          |  | )) |

# III. TABELLENLISTE

| 3.1.1.    | Spinale Muskelatrophien  | 11 |
|-----------|--|----|
| 4.1.12.1. | Primerliste  | 33 |
| 4.1.13.1. | Liste der verwendeten primären Antikörper                      | 34 |
| 4.1.13.2. | Liste der verwendeten sekundären Antikörper                    | 35 |
| 4.1.14.1. | Liste der verwendeten BAC-Klone                                | 38 |
| 4.1.15.1. | Liste der verwendeten Mauslinien                               | 38 |
| 5.1.1.    | Nutzbarkeit der polyklonalen Antiseren gegen hnRNP-R und -Q    | 49 |
| 5.2.1.    | Yeast-Two-Hybrid Interaktionstests mit Smn und trunkiertem Smn | 51 |
| 5.7.1.    | Auf GluR2-Editierung untersuchte Stadien und Genotypen         | 68 |

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Spinale Muskelatrophie (SMA), die häufigste autosomal rezessive neuromuskuläre Erkrankung bei Kindern und jungen Erwachsenen, wird durch Mutationen in der telomeren Kopie des *survival motor neuron (SMN1)* Gens auf dem humanen Chromosom 5 verursacht. Anders als bei Mäusen, welche nur ein *Smn* Gen haben, gibt es beim Menschen eine zweite Kopie (*SMN2*). Das Genprodukt dieser zweiten Kopie wird am C-Terminus bevorzugt alternativ gespleißt. Es bringt nur eine kleine Menge des vollständigen SMN Proteins hervor. Der Grund, warum eine reduzierte Menge des ubiquitär exprimierten SMN Proteins speziell zu einer Motorneuronendegeneration führt, ohne andere Zelltypen gleichermaßen zu betreffen ist noch immer nicht bekannt.

Mit Hilfe der Yeast-Two-Hybrid Technik wurden die beiden heterogenen nukleären Ribonukleoproteine hnRNP-R und hnRNP-Q als neue SMN-bindende Proteine identifiziert. Diese beiden hochhomologen Proteine waren bereits bekannt und stehen in Verbindung mit dem RNA Metabolismus, im Speziellen: Editing, Transport und Spleißing. hnRNP-R und -Q interagieren mit Wildtyp Smn, aber nicht mit trunkierten oder mutierten Smn Formen, welche in SMA-Patienten gefunden wurden. Beide Proteine werden in den meisten Geweben exprimiert. Im Rückenmark von Mäusen ist die stärkste Expression am neunzehnten embryonalen Tag zu beobachten. Interessanterweise ist hnRNP-R hauptsächlich in den Axonen von Motoneuronen zu finden und kolokalisiert dort mit Smn. Im Mausmodell für die SMA konnte gezeigt werden, dass sich die Motoneurone von erkrankten Mäusen hinsichtlich der Morphologie ihrer Neuriten von solchen aus Wildtyp Mäusen unterscheiden. Werden hnRNP-R oder hnRNP-Q in kultivierten Nervenzellen exprimiert, so fördern sie das Wachstum von Neuriten. Bei SMA-Patienten ohne Mutation im SMN Gen konnte allerdings weder Mutation noch Deletion in hnRNP-R oder hnRNP-Q nachgewiesen

werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können entscheidend zu einem besseren Verständnis der motoneuronen spezifischen Funktion von Smn bei der SMA beitragen.

## 2. SUMMARY

Spinal muscular atrophy (SMA), the most common hereditary motor neuron disease in children and young adults is caused by mutations in or loss of the telomeric survival motor neuron (SMN1) gene on human chromosome 5. The human genome, in contrast to mouse, contains a second SMN gene (SMN2) which is transcribed into an mRNA, that is predominantly alternatively spliced at the C-terminus. Therefore, it gives rise to low levels of full-length SMN protein. The reason why reduced levels of the ubiquitously expressed SMN protein lead to specific motor neuron degeneration without affecting other cell types is still not understood. Using yeast two-hybrid techniques, hnRNP-R and the highly related hnRNP-Q were identified as novel SMN interaction partners. These highly homologous proteins were known before in the context of RNA metabolism, in particular: editing, transport and splicing. HnRNP-R and -Q interact with wildtype Smn but not with truncated or mutant Smn forms identified in SMA patients. Both proteins are expressed in most tissues. In the mouse spinal cord the expression peaks at embryonic day nineteen. Interestingly, hnRNP-R is predominantly located in axons of motor neurons where it co-localises with Smn. It could be shown in mouse models for SMA that motor neurons of affected mice differ from wildtype mice in the morphology of their neurites. When hnRNP-R or hnRNP-Q were expressed in neuronal cells they promote neurite outgrowth. However, no mutation or deletion could be found in the genes for hnRNP-R or hnRNP-Q of SMA patients without mutations in the SMN gene. The results of this thesis could help to understand the specific Smn function in motoneurons.

## 3. EINLEITUNG

## 3.1. Die spinale Muskelatrophie

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessive Erkrankung, welche sich durch progressive Motoneuronendegeneration im Vorderhorn des Rückenmarkes (Melki, 1997) und daraus resultierende proximal betonte, symmetrische Muskelschwäche und – Atrophie auszeichnet (Korinthenberg et al., 1997). Nach dem internationalen SMA-Konsortium (1992) werden drei Typen der klassischen SMA unterschieden (Tabelle 3.1.1):

| Тур | Name               | Beginn   | Bewegungsmeilensteine        | Tod     |
|-----|--------------------|----------|------------------------------|---------|
|     |                    | (Monate) |                              | (Jahre) |
| Ι   | Werdnig-Hoffmann   | <6       | Sitzen nie ohne Hilfe        | <2      |
| Π   | Intermediärer Typ  | <18      | Laufen nie ohne Hilfe        | >2      |
| III | Kugelberg-Welander | >18      | Stehen und laufen ohne Hilfe | adult   |
|     |                    |          |                              |         |

Tabelle 3.1.1.: Spinale Muskelatrophien (Nicole et al., 2002)

Die SMARD (spinal muscular atrophy with respiratory distress), eine weitere Form der spinalen Muskelatrophie unterscheidet sich dadurch von der klassischen SMA, dass es aufgrund einer Denervation des Zwerchfells relativ früh zu einer lebensbedrohlichen Atmungsinsuffizienz kommt (Mellins et al., 1974; Bertini et al., 1989; Grohmann et al., 2001). Die Ursache für die klassische spinale Muskelathropie ist fast immer eine Mutation oder Deletion des *SMN*-Genes (siehe 3.2.), für SMARD hingegen eine Mutation im Gen für das IGHMBP2 (immunoglobulin μ-binding protein 2).

#### 3.2. Das survival motor neuron-Gen

Der für die SMA verantwortliche genetische Defekt wurde als homozygote Mutation oder Verlust des survival motor neuron (SMNI) Genes identifiziert (Lefebvre et al., 1995). Beim Menschen liegt das SMN Gen auf Chromosom 5q13. Nur bei Homo sapiens befindet sich infolge einer Duplikation an dieser Stelle eine zweite etwas veränderte Kopie, des SMN Genes (SMN2) (Rochette et al., 2001), die ebenfalls exprimiert wird (Lefebvre et al., 1995; Wirth, 2000). Obwohl sich beide Kopien nur in fünf Basenpaaren unterscheiden, wird ein vollständiges Protein hauptsächlich vom SMN1 Gen abgelesen. Bei 70% der Transkripte des SMN2 Gens wird das siebte Exon alternativ gespleißt, was zu einer Expression eines Cterminal trunkierten SMN Proteins führt (Lefebvre et al., 1995; Lorson and Androphy, 2000; Lefebvre et al., 1997; Pellizzoni et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999). Die Stärke der 3' Spleißstelle hierfür ist deutlich reduziert (Lim and Hertel, 2001). Auf der zellulären Ebene führt die reduzierte Expression von vollständigem SMN Protein zu apoptotischem Zelltod der Motoneurone des Vorderhorns des Rückenmarkes und im Endeffekt zur SMA (Coovert et al., 1997). Hierbei soll es vermutlich nur vollständigem SMN Protein, nicht aber mutiertem möglich sein, den Beginn der Apoptose zu verhindern (Vyas et al., 2002). Ebenfalls zur Motoneuronendegeneration kommt es in Mausmodellen, bei denen die Smn-Menge reduziert (Jablonka et al., 2000), Exon 7 deletiert (Frugier et al., 2000; Cifuentes-Diaz et al., 2001) oder menschliches SMN2 auf niedrigem Level (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000) auf einem Hintergrund ohne murinem Smn (Schrank et al., 1997) oder mit mutiertem Smn (Monani et al., 2003) exprimiert wird. Eine Überexpression von Spleißfaktoren wie Htra2-ß1 (Hofmann et al., 2000) und SRp30c (Young et al., 2002) kann das Spleißen in Richtung eines Produktes begünstigen, das Exon 7 enthält. HnRNP-G und RBM sind zwei weitere Faktoren,

die dieses bewirken. Sie binden nicht spezifisch an RNA, dafür aber direkt und spezifisch an Htra2-β1 (Hofmann and Wirth, 2002)

Das vollständige SMN Genprodukt besteht aus 294 Aminosäuren. Es findet sich im Nukleus und im Zytoplasma. Im Zellkern scheint es in spezielle Strukturen, den sogenannten Gems ("gemini of coiled bodies" oder "gemini of Cajal bodies", (Liu and Dreyfuss, 1996) konzentriert zu sein. Ob es sich bei den Gems tatsächlich um eigenständige Strukturen handelt oder um die Coiled Bodies selbst, ist umstritten, da das SMN Protein direkt mit dem Coiled Body Marker Coilin interagiert (Matera and Hebert, 2001; Hebert et al., 2001). Bei SMA-Patienten finden sich weniger Gems. Wird SMN durch Adenoviren in Fibroblasten von Patienten eingebracht, werden dort wieder Gems gebildet (DiDonato et al., 2003). Es bleibt dabei allerdings ungeklärt, ob es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt.

#### 3.3. SMN-Interaktionspartner

SMN ist ein Tudordomänenprotein (Talbot et al., 1998), welches Teil von mindestens einem großen Multiproteinkomplex ist. In diesem Komplex finden sich außer SMN das Smn interacting protein 1 (Sip1/Gemin2) (Charroux et al., 1999; Fischer et al., 1997; Talbot et al., 1998), die vermutliche DEAD-box Helikase dp103/Gemin3 (Campbell et al., 2000; Charroux et al., 1999), das dp103/Gemin3 interacting protein Gemin4/GIP1 (Charroux et al., 1999; Meister et al., 2000), das "WD repeat" Protein Gemin5 (Gubitz et al., 2002), Gemin6 (Pellizzoni et al., 2002), Gemin7 (Baccon et al., 2002), Profilin (Giesemann et al., 1999) und spleißeosomale U snRNP Proteine der Smith Antigen (Sm) Klasse (Liu et al., 1996; Fischer et al., 1997; Giesemann et al., 1999; Buhler et al., 1999; Pellizzoni et al., 1999; Meister et al., 2000). Außerdem interagiert SMN in der *Xenopus laevis* Oozyte mit U snRNAs (Fischer et

al., 1997). Es wird zuerst ein Preimportkomplex mit Snurportin1 und Importinß gebildet (Narayanan et al., 2002). Nach der Assemblierung werden die U snRNPs in den Zellkern importiert, wo sie ihre Funktion beim Spleißen von pre-mRNAs ausüben (Fischer et al., 1997). Die Assoziation mit U snRNAs und Sm Proteinen deutet auf eine Rolle von SMN bei der Biogenese und Funktion von spleißeosomalen U snRNPs hin (Fischer et al., 1997; Buhler et al., 1999; Selenko et al., 2001). Reduzierte Mengen von Smn und Gemin2 führen zu einer Störung der Assemblierung der U snRNPs. Dadurch werden weniger Sm Proteine angereichert. Diese Effekte korrelieren sehr gut mit der Beobachtung, dass reduzierte Mengen an Smn und Gemin2 in Mäusen zu einer Motoneuronendegeneration führen (Jablonka et al., 2000). Zusätzlich beteiligt sich der im Kern befindliche Anteil an SMN am nuklearen premRNA Spleißen (Pellizzoni et al., 1998; Meister et al., 2000; Pellizzoni et al., 2001). Ein anderes Tudordomänenprotein, SMNrp ist ein pre-mRNA Spleißingfaktor, der für die Bildung der reifen Spleißeosomen in *Xenopus laevis* Oozyten benötigt wird (Meister et al., 2000). Kürzlich wurden außerdem microRNAs (miRNAs) in dem SMN-Multikomplex gefunden. Einige von ihnen sind neuronenspezifisch und könnten zum Auffinden von mRNAs hilfreich sein (Dostie et al., 2003).

Die Helikase RHA, welche die RNA Polymerase II bindet wurde, in Komplexen mit SMN gefunden (Pellizzoni et al., 2001b). Außerdem wurden die snoRNP Proteine Fibrillarin und GAR1 als direkte SMN Bindeproteine beschrieben (Jones et al., 2001; Pellizzoni et al., 2001). Sie enthalten, wie SmB, SmD1, SmD3, LSm4 und RHA (Friesen and Dreyfuss, 2000; Pellizzoni et al., 2001), eine RG-reiche Domäne, die notwendig ist, um an SMN binden zu können (Pellizzoni et al., 2002).

Ein neuentdeckter Defekt im Gen für das Immunoglobulin µ-binding protein 2 (IGHMBP2), einem Mitglied der DEAD-box Familie der RNA-Helikasen, ruft spinale Muskelatrophie mit eine Atmungsdefizienz (SMARD1) hervor (Grohmann et al., 2001). Die Bindung von Smn an Nucleolin-haltige Komplexe weist zusätzlich auf eine Verbindung der SMA Pathologie zu Ribonukleoproteinkomplexen hin (Lefebvre et al., 2002). Die Rolle, die von SMN bei snRNP-Zusammenbau, -Regeneration und RNA-Spleißen übernommen wird, scheint essentiell für alle Zelltypen zu sein und kann daher nicht erklären, warum in SMA-Patienten vor allem die Motoneurone betroffen sind. Daher scheinen weitere Funktionen im Zusammenhang mit der Erkrankung zumindest wahrscheinlich.

Außer dem Spleißen hat SMN vermutlich noch andere Funktionen. Ein Hinweis darauf kommt aus der Beobachtung, dass der nukleäre Transkriptionsaktivator E2 des Papillomavirus *in vitro* mit SMN interagiert (Strasswimmer et al., 1999). SMN verstärkt die E2-abhängige transkriptionale Aktivierung von Reportergenen (Strasswimmer et al., 1999). Der SMN Interaktionspartner dp103/Gemin3 wurde ursprünglich als ein Bindepartner für virale und zelluläre Transkriptionsfakoren identifiziert (Grundhoff et al., 1999). Kürzlich wurde das NS-1 Protein des Minute Virus der Maus (MVM) als Smn-Interaktionspartner identifiziert. Es kolokalisiert, wenn es in gesunden Zellen exprimiert wird, mit Smn in den Coiled Bodies und nach einem Befall der Zelle mit dem Virus in Smn-associated APAR bodies (SAAB) (Young et al., 2002). Ein weiterer Interaktionspartner des SMN Proteins, das tumorunterdrückende Protein p53 deutet darauf in, dass eventuell eine weitere Verbindung zwischen dem Motoneuronentod bei der SMA und Apoptose besteht (Young et al., 2002). Die 23kD-Isoform von FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) interagiert ebenfalls mit SMN, jedoch nicht die 18kD-Isoform, welche jedoch zum Teil mit SMN kolokalisiert (Claus et al., 2003).

#### **3.4.** hnRNP-R und hnRNP-Q

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit zwei neuen, stark verwandten Smn-Interaktionspartnern, die zur Klasse der heterogenen nuklearen Ribonukleoproteine (hnRNPs) gehören, hnRNP-R und hnRNP-Q (heterogenous nuclear ribonucleoprotein-R und -Q) (Mourelatos et al., 2001; Rossoll und Kröning et al., 2002). Die hnRNPs sind RNA-bindende Proteine, die an sehr vielen Aspekten des RNA-Stoffwechsels, wie zum Beispiel Spleißen und mRNA-Transport beteiligt sind (zusammengefasst in Krecic and Swanson, 1999; Dreyfuss et al., 2002). Homologe Sequenzen von hnRNP-R und –Q wurden bereits als menschliches hnRNP-R (Hassfeld et al., 1998) und murines gry-rbp (Acc. Nr. AF093821, GenBank) beschrieben. Die Mausgene für hnRNP-R und hnRNP-Q sind zu 82% identisch, die Proteine zu 90% (Abbildung 1). Beide Aminosäuresequenzen sind zu 98-99% identisch mit ihren humanen Orthologen. Auf eine relativ saure N-terminale Region folgen zwei gut definierte und ein degeneriertes RNA recognition motifs (RRM); der C-terminale Teil enthält ein RGG Motiv (Rossoll und Kröning et al., 2002) (Abbildung 3.4.1.). Beide Proteine haben große Ähnlichkeit mit den Apobec-1 interacting Proteinen ACF und ABBP-1 (Lau et al., 2001). hnRNP-Q wurde bereits als glycine-arginine-tyrosine-rich RNA binding protein (Gry-rbp) beschrieben, welches mit dem spleißeosomalen Komplex assoziiert ist (Neubauer et al., 1998). Fehlt hnRNP-Q in HeLa-Zellen vollständig, so wurden Defizite beim Spleißen beobachtet (Mourelatos et al., 2001). Interessanterweise wurden hnRNP-R und –Q in einem mit dem Spleißeosom assoziierten Komplex gefunden, jedoch nicht direkt in diesem (Rappsilber et al., 2002). Eine alternative Spleißingvariante dieses Proteins, genannt NASP1 (NS1-associated protein 1; (Harris et al., 1999) oder SYNCRIP (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein (Mizutani et al., 2000) wurde als Komponente des apobec-1 Editosomes identifiziert (Lau et al., 2001). Sie agiert dort als Inhibitor des ApoBmRNA-Editings (Blanc et al., 2001). SYNCRIP interagiert mit Synaptotagminen und scheint

an der Regulation der Dynamik von zytoplasmatischen mRNAs beteiligt zu sein (Mizutani et al, 2000). NSAP-1 interagiert mit dem N1 Protein des Minute-Virus. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass es an der Regulation des Spleißens und/oder dem mRNA-Transport aus dem Kern beteiligt ist (Harris et al, 1999). Alle diese Spleißisoformen wurden mittlerweile zusammengefasst unter dem Namen hnRNP-Q (hnRNP-Q1-3; Mourelatos et al., 2001). Für beide hnRNPs wurde außerdem eine Bindung an die hyperphosphorylierte, C-terminale Repeat-Domäne (PCTD) der RNA-Polymerase II gefunden. Diese auch nur CTP (C-terminale Domäne) genannte Domäne fungiert sozusagen als Plattform für den Zusammenbau und als Regulator der Transkription und der pre-mRNA Verarbeitungsmaschinerie (Maniatis and Reed, 2002). So wird also der Smn-Komplex noch einmal direkt mit der Transkription verbunden (Carty and Greenleaf, 2002).

Das *Dictyostelium discoideum* Homolog von hnRNP-R scheint bei der Sporenbildung an einem Stoffwechselweg beteiligt zu sein, der für die Länge der Fruchtkörperstiele mitverantwortlich ist (Loughran et al., 2000).

### 3.5. Axonaler mRNA-Transport

Für Zellen mit solch langen Axonen, wie die der Motoneurone ist der axonale Transport im Allgemeinen und speziell der von mRNAs von sehr grosser Bedeutung. Er wird unter anderem für die spezifische Translokalisation von Proteinen benötigt.

Im Allgemeinen werden Proteine und Lipide im Zellkörper synthetisiert und im endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat in Membranen inkorporiert beziehungsweise in Transportvesikel gepackt. Im Falle des schnellen axonalen Transports werden diese Vesikel dann im Axon zu den Endigungen transportiert. Dieser Vorgang wird anterograder axonaler Transport genannt. An der Synapse können nun synaptische Vesikel durch Exozytose Neurotransmitter freisetzen. Ein Teil der Membranen wird abgebaut. Andere Transmembranproteine, z.B. Rezeptoren für neurotrophe Faktoren, werden nach Ligandenbindung in Vesikeln über schnellen retrograden Transport durch das Axon zum Zellkörper zurückbefördert. Hier werden sie dann teilweise recycled. Der anterograde Transport wird mit Hilfe der Kinesine, der retrograde mittels des Dyneins vollzogen. Diese befördern ihre Fracht entlang der Mikrotubuli. Dieses gilt allerdings nicht für zytoplasmatische Proteine und Zytoskelettelemente. Sie werden durch langsame axoplasmatische Strömung transportiert (zusammengefasst in Kandel et al., 1995). Aktin- und Tubulinproteine werden so transportiert. Wie dieser Transport allerdings genau vor sich geht ist bisher unbekannt (Galbraith und Gallant, 2000). Auch die Neurofilamente sind ein Beispiel für langsam transportierte Proteine. Sie wandern zeitweilig schnell durch das Axon und machen dann wieder Pausen. Ein möglicher Regulationsmechanismus könnte die Phosphorylierung sein. Es wird spekuliert, dass so die Anheftung der Neurofilament an den Motor/ die Motoren beeinflusst werden kann (Miller et al, 2002). Neurofilamente können allerdings auch auf dem klassischen Kinesin-Dynein-Weg transportiert werden (Shea und Flanagan, 2001). Außerdem wird spekuliert, dass diese klassischen Axontransportproteine auch am langsamen Transport beteiligt sein könnten (Almenar-Queralt und Goldstein, 2001). Da der Transport von löslichen Proteinen und Neurofilamenten in Nervenzellfortsätzen sehr lange dauert, hält die Zelle für diese Fälle noch eine andere Variante bereit, um Proteine in Dendriten und die Endigungen von Axonen zu bringen. Sie transportiert die mRNA und synthetisiert die Proteine mit einer lokalen Translationsmaschinerie (Campenot und Eng, 2000). Lokale Translation an Synapsen scheint ein Mechanismus zu sein, um spezielle postsynaptische Domänen auszubilden, was für die Entwicklung und Plastizität von Synapsen von zentraler Bedeutung ist (Steward und Schuman, 2001; Steward und Schuman, 2003). Im Gegensatz zur lokalen dendritischen Proteinsynthese ist der axonale mRNA-Transport ein

relativ junges Forschungsfeld. Die ersten Hinweise für mRNA-Transport in neuronalen Zellen

kamen von Untersuchungen an Vasopressin- und Oxytoxintranskripten. Es konnte dort gezeigt werden, dass axonale mRNAs vom Hypothalamus zu den Nervenenden des Hypophysenhinterlappens transportiert werden (Mohr et al, 1991). Die molekularen Mechanismen für den mRNA Transport in Axonen sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt. Das Sortieren von definierten mRNAs in spezielle Regionen der Zellen wurde allerdings schon an vielen Zelltypen beobachtet, darunter im Besonderen in Neuronen (zusammengefasst von Mohr und Richter, 2001).

Bei vielen Motoneuronenerkrankungen zeigt sich ein reduziertes Axonwachstum, dass zum Beispiel bei pmn-Mäusen (progressive motor neuronopathy) mit einer defekten Mikrotubulianordnung, verursacht durch eine Mutation des *Tbce* (tubulin-specific chaperone E)-Genes (Bömmel et al., 2002; Martin et al., 2002) einhergeht oder mit Störungen im axonalen Transport, wie im Falle des KIF1a (kinesin superfamily protein 1a) begleiteten Transports (Yonekawa et al., 1998).

Neuritischer mRNA-Transport wurde auch im Zusammenhang mit anderen neurologischen Erkrankungen und an für Nervenzellen wichtigen Molekülen untersucht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das mRNA-bindende Protein FMRP (fragil X mental retardation protein) in PC12-Zellen mit der mRNA in die Neuriten transportiert wird. Eine Mutation im Gen für FMRP löst das Fragile X Syndrom aus (De Diego Otero et al., 2002). In der mRNA für das tau Protein konnte ein axonales Lokalisationselement in der 3'UTR gefunden werden. Map-2-mRNA wird hingegen auch durch ein Signal in der 3'UTR, in die Dendriten transportiert (Aronov et al., 2001).

Das Aktinskelett scheint eine besondere Rolle in allen Stadien der Axonausbildung wie bei der Initiation, dem Wachstum, der Wegfindung, der Verästelung und dabei von anderen Substanzen oder Zelltypen wieder abgestoßen zu werden, zu spielen (Luo et al., 2002). In den distalen Teilen der Axone und in den Wachstumskegeln gibt es sehr viel  $\beta$ -Aktinprotein. Zu dieser Verteilung trägt zum Großteil der spezifische Transport der  $\beta$ -Aktin-mRNA bei (Bassell et al., 1998; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2001; Kislauskis et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die 3'UTR (untranslated region) der  $\beta$ -Aktin-mRNA für diesen Transportprozess wichtig ist (Kislauskis et al., 1993). Dabei wird eine Domäne mit dem Namen Zipcode (Kislauskis et al., 1994) von spezifischen Proteinen gebunden. Das ZBP2 (Zipcode binding Protein 2) ist mit dem Zipcode assoziiert, es zeigt Homologie zu einem humanen hnRNP Protein. Es trägt zur zytoplasmatischen Lokalisation der  $\beta$ -Aktin-mRNA bei (Gu et al., 2002). ZBP1 (Zipcode binding Protein 1) bildet Transportkörner und wird unter anderem in Dendriten transportiert (Tiruchinapalli et al., 2003) Es ist ein Homolog der hnRNPs E1und E2 (Ross et al, 1997). Es wäre also nicht unwahrscheinlich, dass auch hnRNP-R und –Q am axonalen Transport beteiligt sind.

Isoformen von hnRNP-Q wurden bereits zuvor, unter dem Namen NSAP1 mit dem mRNA-Transport in Verbindung gebracht (Harris et al., 1999) und unter dem Namen SYNCRIP wurde eine mögliche Rolle im organellenbasierten mRNA-Transport am Zytoskelett diskutiert (Mizutani et al., 2000). Auch hnRNP-R ist ein mRNA-bindendes Protein (Rossoll und Kröning et al., 2002) und könnte somit am mRNA-Transport teilnehmen. Kürzlich wurde in transfizierten, kultivierten Neuronen auch SMN in Vesikeln gefunden, welche aktiv am Zytoskelett entlang transportiert werden (Zhang et al., 2003). Das SMN Protein selbst wurde bereits mit dendritischem mRNA-Transport in Verbindung gebracht. Es wurde bei elektronenmikroskopischen Studien in Dendriten von Neuronen des anterioren Horns des Rückenmarkes assoziiert mit Mikrotubuli gefunden (Bechade et al., 1999).

## 3.6. Ziel der Arbeit

Der Pathomechanismus der SMA ist bisher unbekannt. Es gibt bis jetzt noch keine Hinweise darauf, dass in den Motoneuronen von SMA-Patienten das Spleißen der mRNAs gestört ist. An alternativ gespleißter Kandidaten-mRNA konnte in Motoneuronen von Mausmodellen mit SMA Symptomen keine Störung gefunden werden (Jablonka et al., 2001). In homozygoten Coilin defizienten Mäusen, können die Coiled Bodies Smn und Sm snRNPs nicht in Gems ansammeln. Diese Mäuse entwickeln jedoch keine neuromuskulären Störungen (Tucker et al., 2001). Obwohl man mittlerweile so viel von der Funktion versteht, die Smn beim Spleißen von pre-mRNAs hat, weiß man doch noch sehr wenig darüber, warum bei SMA-Patienten speziell die Motoneurone betroffen sind.

| hnRNP-R   | MANQ-VNGNAVQLKEEEEPMDT-SSVTHTEHYKTLIEAGLPQKVAERLDEIFQTGLVAYV          | 58    |
|-----------|---|-------|
|           | ·····   |       |
| hnRNP-Q   | MATEHVNGNGTEEPMDTTSAVIHSENFQTLLDAGLPQKVAEKLDEIYVAGLVAHS               | 55    |
|           |   |       |
| hppND_D   |   | 110   |
| IIIIKNE-K | DIDEKAIDAIKEINEEGAISVIQQIKESDISHVQNKSKIICGVMKIIKQESKVQES              | 110   |
| hnRNP-0   | DLDERATEALKEFNEDGALAVLOOFKDSDLSHVONKSAFLCGVMKTYROREKOGTKVADS          | 115   |
| innin g   |   | 110   |
|           |   |       |
| hnRNP-R   | TKGPDEAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPPDSVYSGVQPGIGTEVFVGKIPRDLYE          | 178   |
|           |   |       |
| hnRNP-Q   | SKGPDEAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPPDSVYSGQQPSVGTE <u>IFVGKIPRDLFE</u>  | 175   |
|           |   |       |
|           |   |       |
| hnRNP-R   | DELVPLFEKAGPIWDLRLMMDPLSGQN <b>RGYAFITF</b> CGKEAAQEAVKLCDSYEIRPGKHLG | 238   |
| h DND O   |   | 225   |
| nnRNP-Q   | DELVPLFERAGPIWDLRLMMDPLTGLN <b>RGIAFVTF</b> CTREAAQEAVKLINNHEIRSGRHIG | 235   |
|           |   |       |
| hnRNP-R   | VCISVANNRLFVGSIPKNKTKENILEEFSKVTEGLVDVILYHQPDDKKKN <b>RGFCFLEY</b> ED | 298   |
|           |   |       |
| hnRNP-Q   | VCISVANNRLFVGSIPKSKTKEQILEEFSKVTEGLTDVILYHQPDDKKKN <b>RGFCFLEY</b> ED | 295   |
|           |   |       |
|           |   | 0.5.0 |
| hnRNP-R   | HKSAAQARRRLMSGKVKVWGNVVTVEWADPVEEPDPEVMAKVKVLFVRNLATTVTEETLE          | 358   |
| haDND O   |   | 255   |
| IIIRNP-Q  | HKIAAQARRKLMSGKVKVWGNVGIVEWADPIEDPDPEVMAKVKVLFVRNLANIVIEEILE          | 200   |
| hnRNP-R   | KSFSEFGKLERVKKLKDYAFVHFEDRGAAVKAMDEMNGKEIEGEEIEIVLAKPPDKKRKE          | 418   |
|           |   |       |
| hnRNP-Q   | KSFSQFGKLERVKKLKDYAFIHFDERDGAVKAMEEMNGKDLEGENIEIVFAKPPDQKRKE          | 415   |
|           |   |       |
|           |   |       |
| hnRNP-R   | RQAARQASRSTAYEDYYYHPPPRMPPPMRGRGRGGRGGYGYPPDYYGYEDYYDDYYGYDY          | 478   |
|           |   | 47.4  |
| nnRNP-Q   | ĸĸauĸuaaĸnumıddııııgpphmpppirgrgrggrggigippdyigiEdyid-yygidy          | 4/4   |
| hpRNP-R   |   | 537   |

Abbildung 3.4.1.: Vergleich der Aminosäuresequenzen von hnRNP-R und hnRNP-Q In dieser Abbildung werden die Aminosäuresequenzen der beiden hnRNPs miteinander verglichen. Zwei Punkte zwischen den Sequenzen kennzeichnen gleiche Aminosäuren, ein Punkt ähnliche. Die RNA recognition motifs (RRM) sind unterstrichen. Die darin befindlichen RNA-Bindesignaturen RNP-1 und RNP-2 sind fett gedruckt. Die repetitiven Sequenzen der RGG Domäne sind unterstrichen.

Die SMN-Interaktionspartner hnRNP-R und hnRNP-Q wurden nicht in dem Komplex gefunden, in dem SMN am Spleißen teilnimmt. Deshalb sollten beide Proteine und die Interaktion mit SMN genauer charakterisiert werden. Dieses sollte sowohl auf molekularer Ebene geschehen, als auch in Bezug auf die subzelluläre Verteilung und die Rolle dieser Proteine für das Wachstum von Neuriten. Parallel sollte untersucht werden, ob es auch SMA-Patienten mit Mutationen in *hnRNP-R* und/oder -Q gibt, was einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit der beiden Genprodukte für die Entstehung der Krankheit geben würde. Außerdem sollte untersucht werden, ob bei Smn-defizienten Mäusen eine Störung der mRNA-Editierung in Neuronen vorliegt. Um den Defekt in den Motoneuronen bei Mausmodellen für die SMA weiter zu charakterisieren, sollten kultivierte Neurone auf eine veränderte Morphologie hin untersucht werden.

All dies sollte einen Aufschluss geben über mögliche Prozesse, in die Smn zusätzlich zu seiner Funktion beim Spleißen involviert ist. Somit könnten diese Beobachtungen entscheidend dazu beitragen, die spezifischen pathophysiologischen Ereignisse, welche zur SMA führen, zu erhellen.

## 4. MATERIALIEN UND METHODEN

## 4.1. Materialien

#### 4.1.1. Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden in pro analysi Qualität von den folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Gibco BRL, Merck, Sigma, Roth und Clontech.

#### 4.1.2. Lösungen, Puffer und Medien

Soweit nicht anders vermerkt erfolgte die Herstellung der Lösungen, Puffer und Medien nach

Sambrook et al. (1989).

#### 4.1.3. Medien, Lösungen und Puffer für das Two-Hybrid-System

#### 4.1.3.1. YPD (Yeast Extract/ Peptone/ Dextrose)

Für 11:

11g Hefeextrakt 22g Bacto Pepton 55mg Adenin auf 900ml mit ddH<sub>2</sub>O Danach wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 100ml 20%ige sterile Glucose hinzugefügt.

#### 4.1.3.2. Herstellung von Dropout-Medien

Für 50ml:

| 0,4g     | Hefeextrakt ohne   |
|----------|--------------------|
|          | Aminosäuren        |
| je2,75mg | Tyrosin            |
|          | Uracil             |
|          | Adenin             |
| 0,11g    | Agar (für Platten) |

auf 50ml mit ddH<sub>2</sub>0

An diesem Punkt wurde für 20' bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde folgendes hinzugefügt:

5ml20%ige Glucose (steril)500μlDropoutsolution (Clontech)wenn erwünscht3AT-Lösung (1M)

Davon wurden dann sofort nach dem Mischen Platten gegossen.

#### 4.1.3.3. β-Galactosidasetest-Färbelösung

Sie sollte vor jeder Färbung frisch zubereitet werden.

| 100ml  | Z-Puffer          |
|--------|-------------------|
| 1,67ml | X-Gal (20mg/ml)   |
| 0,27ml | β-Mercaptoethanol |

#### 4.1.3.4. Z-Puffer

Für 11:

| 10,7g  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>·</sup> 2H <sub>2</sub> O |
|--------|---|
| 6,2g   | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>·</sup> 2H <sub>2</sub> O |
| 0,75g  | KC1   |
| 0,246g | MgSO <sub>4</sub> <sup>·</sup> 7H <sub>2</sub> O                |
|        |   |

Die Lösung wurde dann auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und autoklaviert.

#### 4.1.4. Lösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Westernblot und

#### Koimmunpräzipitation:

4.1.4.1. 4x Tris-SDS-Trenngelpuffer

1,5M Tris-Cl (pH 8,8) 0,4% SDS

4.1.4.2. 4x Tris-SDS-Sammelgelpuffer

0,5M Tris-Cl (pH6,8) 0,4% SDS

## 4.1.4.3. 30% Acrylamidlösung (29:1)

| 29,2% | Acrylamid                 |
|-------|---------------------------|
| 0,8%  | N,N'-Methylenbisacrylamid |

#### 4.1.4.4. 5x SDS-PAGE-Gellaufpuffer

| 125mM | Tris     |
|-------|----------|
| 1M    | Glycerin |
| 0,5%  | SDS      |

#### 4.1.4.5. 2x Probenpuffer (Laemmli)

100mMTris-Cl (pH 6,8)10%2-Mercapto-EtOH4%SDS0,2%Bromphenolblau20%Glycerol

## 4.1.4.6. Western-Transferpuffer

25mM Tris-Cl (pH 8,3) 150mM Glycin 10% Methanol

## 4.1.4.7. 10x TBST (Tris-buffered Saline mit Tween)

| 100mM | Tris-Cl (pH 8) |
|-------|----------------|
| 1,5M  | NaCl           |
| 0,5%  | Tween-20       |

#### 4.1.4.8. Lysispuffer

20mMTris pH 7.4137mMNaCl10%Glycerol1%Triton X-1002mMEDTA50mMNa-β-glycerophosphate20mMNa-PyrophosphateProteaseinhibitoren

#### 4.1.4.9. RIPA (Radioimmunoprecipitation)-Puffer

| 50mM   | Tris pH 7.5         |
|--------|---------------------|
| 150 mM | NaCl                |
| 1%     | Nonidet P-40        |
| 0,5%   | Natriumdeoxycholate |
| 0,1%   | SDS                 |

## 4.1.5. Zellkulturen

Die Materialien für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Life Technologies bezogen.

#### 4.1.5.1. Motoneuronenmedium

Neurobasalmedium

| 10%   | Pferdeserum    |
|-------|----------------|
| 500μΜ | Glutamax       |
| 2%    | B27 Supplement |

4.1.5.2. PC12-Wachstumsmedium

Dulbecco's MEM mit Glutamax

- 10% Pferdeserum
- 5% fötales Kälberserum
- 1% Penicillin/ Streptomycin

4.1.5.3. PC12-Differenzierungsmedium

Dulbecco's MEM mit Glutamax

- 4% Pferdeserum
- 2% fötales Kälberserum
- 1% Penicillin/ Streptomycin
- 50 ng/ml NGF

## 4.1.5.4. Mowiol

- <10g Mowiol
- 40ml PBS
- 20ml wasserfreies Glycerin

16 Stunden rühren und bei –20°C lagern bis zur Verwendung. Dann auf etwa 60°C erhitzen

#### 4.1.6. Wirtszellen

## 4.1.6.1. Bakterien

Für die Transformationen wurden chemisch kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$ -Bakterien verwendet. Der Genotyp ist in Sambrook et al. beschrieben.

#### 4.1.6.2. Hefen

Für alle Two-Hybrid-Tests war AH109 von Clontech der verwendete Hefestamm. Er ist beschrieben im MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual der Firma CLONTECH.

## 4.1.7. Plasmide

| pBluescript II SK <sup>-</sup> | Stratagene   |
|--------------------------------|--|
| pAS2-1                         | Bestandteil des MATCHMAKER Gal4-based Two-Hybrid Systems der |
|                                | Firma Clontech (Harper, et al., 1993)                        |
| pACT-2                         | Bestandteil des MATCHMAKER Gal4-based Two-Hybrid Systems der |
|                                | Firma Clontech (Li, et al., 1994)                            |
| pcDNA3                         | Invitrogen   |

#### 4.1.8. Molekulargewichtsstandards

| zu bestimmendes Molekül      | Molekulargewichtsstandards                                    |  |  |  |  |  |
|------------------------------|---|--|--|--|--|--|
| lineare, doppelsträngige DNA | GeneRuler <sup>™</sup> 1kb DNA Ladder, (MBI Fermentas)        |  |  |  |  |  |
|                              | GeneRuler <sup>™</sup> 100bp DNA Ladder, (MBI Fermentas)      |  |  |  |  |  |
|                              | GeneRuler <sup>™</sup> 100bp DNA Ladder Plus, (MBI Fermentas) |  |  |  |  |  |
| Proteine                     | Einzelproteine verschiedener Größen (Sigma)                   |  |  |  |  |  |

## 4.1.9. Enzyme

| Enzym              | Firma  |  |  |  |  |  |
|--------------------|--|--|--|--|--|--|
| Restriktionsenzyme | Boehringer Mannheim, Gibco BRL, Fermentas MBI, New |  |  |  |  |  |
|                    | England Biolabs NEB                                |  |  |  |  |  |
| T4-DNA-Ligase      | Gibco BRL  |  |  |  |  |  |
| Taq-Polymerase     | Genecraft  |  |  |  |  |  |

## 4.1.10. Filme

Alle Autoradiogramme wurden auf X-OMAT DS Film der Firma Kodak exponiert.

## 4.1.11. Kits

| Kit                        | Firma        |
|----------------------------|--------------|
| Plasmid-Mini/Midi/Maxi-Kit | Qiagen       |
| Gel-Extraction Kit         | Qiagen       |
| PCR-Purification Kit       | Qiagen       |
| Abi-Prism Sequencing Kit   | Perkin Elmer |
| DyeEx 2.0 Spin Kit         | Qiagen       |

## 4.1.12. Primer

| Gen     | Primername   | Sequ | enz d | es Pri | mers | von 5' | nach | 3'  | Verwendung |
|---------|--------------|------|-------|--------|------|--------|------|-----|------------|
| hnRNP-R | hnrnpr-HA-up | AGA  | GGT   | ACC    | ACC  | ATG    | GGC  | TAC | Klonierung |
| (Maus)  |              | CCC  | TAC   | GAC    | GTG  | CCC    |      |     |            |
|         | rnp-Xba-low  | ATA  | TCT   | AGA    | СТА  | CTT    | CCA  | CTG | Klonierung |
|         |              | CCC  | ATA   | AGT    | ATC  |        |      |     |            |
|         | RNP1F        | ATG  | GCT   | AAT    | CAG  | GTG    | AAT  | GGT | RT-PCR     |
|         |              | AAT  | G     |        |      |        |      |     |            |

|          | RNP282R    | AGT | ACA | GAC | AGA | GTC | CCT | TCC | RT-PCR              |
|----------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
|          |            | ТС  |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | RNPrrm2-f  | CGG | GTG | TGC | AGC | CTG | GGA | TTG | Deletionsklonierung |
|          |            | GGA | CAG | AGT | GGG | CTG | ACC | CCG |                     |
|          |            | TGG | AGG | AG  |     |     |     |     |                     |
|          | RNPrrm2-r  | CTG | GAT | CCG | GCT | CCT | CCA | CGG | Deletionsklonierung |
|          |            | GGT | CAG | CCC | ACT | CTG | TCC | CAA |                     |
|          |            | TCC | CAG | GCT |     |     |     |     |                     |
| hnRNP-R  | R-EX1-up   | ATG | CAT | TGT | CCT | ACA | AAC | TAG | PCR, Sequenzierung  |
| (Mensch) | R-Ex1-low  | CTC | ACT | TTC | ATA | ACC | AGT | CAG | PCR                 |
|          | R-Ex2-up   | CCC | CTT | TTG | TTG | CAA | TAA | CG  | PCR, Sequenzierung  |
|          | R-Ex3-low  | TTC | TAG | GAA | ACA | TGG | AAA | GAG | PCR, Sequenzierung  |
|          | R-Ex4-up   | TGT | GTG | AGA | TTT | AGT | ACT | CAA | PCR, Sequenzierung  |
|          |            | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | R-Ex4-low  | TGT | ACA | GTA | TCT | GCA | TAG | TAG | PCR                 |
|          | R-Ex5-up   | CTC | TGC | AAG | TCA | ACT | GTA | AG  | PCR, Sequenzierung  |
|          | R-Ex5-low  | TCA | CAT | ACC | AAC | TTG | GTC | AG  | PCR                 |
|          | R-Ex6-up   | GAT | TAA | GAT | CAA | TTG | TCC | TGA | PCR, Sequenzierung  |
|          |            | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | R-Ex6-low  | GGA | AGC | AAT | TTA | GAT | CAT | TCA | PCR                 |
|          |            | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | R-Ex7-up   | TTT | GGC | TTA | TAT | ATC | TGG | CTG | PCR, Sequenzierung  |
|          | R-Ex7-low  | TCC | TTG | CCA | AAC | AGT | TGA | AG  | PCR                 |
|          | R-Ex8-up   | CTA | TGC | TAT | GAA | GAC | AGG | AAG | PCR, Sequenzierung  |
|          | R-Ex8-low  | ATA | СТА | TTA | CCA | CTT | TAC | AGA | PCR                 |
|          |            | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | R-Ex9-up   | ATT | GTG | AAG | TAA | ATT | GTT | AAG | PCR, Sequenzierung  |
|          |            | ΤG  |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | R-Ex9-low  | CTG | CAT | AGC | CAT | CAT | CAT | AG  | PCR                 |
|          | R-Ex10-up  | AGA | TTA | СТА | CGG | СТА | TGA | AG  | PCR, Sequenzierung  |
|          | R-Ex10-low | TTT | GAA | GAA | TGT | AGA | TCT | AGA | PCR                 |
|          |            | G   |     |     |     |     |     |     |                     |

| hnRNP-Q  | gry-rbp-HA-up | AGA | GGT | ACC | ATG | TAC | CCC | TAC | Klonierung          |
|----------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| (Maus)   |               | GAC | GTG | CCC | GAC | TAC | GCC | ATG |                     |
|          |               | GCT | ACA | GAA | CAT | GTT |     |     |                     |
|          | gry-Eco-low   | ATA | GAA | TTC | TAC | TTC | CAC | TGC | Klonierung          |
|          |               | CCA | AAA | G   |     |     |     |     |                     |
|          | gry1F         | ATG | GCT | ACA | GAA | CAT | GTT | AAT | RT-PCR              |
|          |               | GG  |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | gry273R       | AGC | ACT | GCC | AAT | GCG | CCG | TCT | RT-PCR              |
|          |               | ТС  |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | GRYrrm2-f     | GTT | TAT | TCA | GGT | CAG | CAG | CCT | Deletionsklonierung |
|          |               | TCT | GTT | GGC | ACT | GAG | TGG | GCT |                     |
|          |               | GAT | CCT | ATT | GAA | GAT | CC  |     |                     |
|          | GRYrrm2-r     | CAG | GAT | CAG | GAT | CTT | CAA | TAG | Deletionsklonierung |
|          |               | GAT | CAG | CCC | ACT | CAG | TGC | CAA |                     |
|          |               | CAG | AAG | GCT | G   |     |     |     |                     |
| hnRNP-Q  | Q-Ex1-up      | GTT | TAA | TTT | TGC | TTA | TTG | CGT | PCR, Sequenzierung  |
| (Mensch) |               | TTG |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex1-low     | ACT | CCA | GTA | CCC | ACA | CTT | ATT | PCR                 |
|          |               | GG  |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex2-upa     | GGG | GAG | TAG | AAG | AAT | TGT | AAA | PCR, Sequenzierung  |
|          |               | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex3-lowa    | TAC | ATC | CAT | TTC | ATA | CCC | AAG | PCR, Sequenzierung  |
|          |               | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex4-up      | TAT | ATG | GGT | GTG | GTC | TAG | ΤG  | PCR, Sequenzierung  |
|          | Q-Ex5-low     | AGA | CAG | TGA | ACG | TGA | AAA | CTG | PCR, Sequenzierung  |
|          | Q-Ex6-up      | TAA | AGG | ATG | ATT | TGC | TCT | TGT | PCR, Sequenzierung  |
|          |               | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex6-low     | TAG | AAC | AAT | GCA | TGA | CGC | ACA | PCR                 |
|          |               | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex7-up      | TTG | ATC | CAC | TTC | TAT | TTG | СТА | PCR, Sequenzierung  |
|          |               | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | Q-Ex7-low     | TGG | GAA | ACA | AGA | GAC | TCT | TG  | PCR                 |
|          |               |     |     |     |     |     |     |     |                     |

|        | Q-Ex8-up    | ATC | TTA | GAA | ATG | GAA | CTC | TTT | PCR, Sequenzierung  |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
|        |             | GG  |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | Q-Ex9-low   | ACA | AGT | CTG | ATC | AAC | ACC | ΤG  | PCR, Sequenzierung  |
|        | Q-Ex10-up   | AAA | TGC | СТА | CTT | GTT | AAC | TAA | PCR, Sequenzierung  |
|        |             | G   |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | Q-Ex10-low  | TCA | GTC | TCC | AAT | TTT | ACA | GAG | PCR                 |
| Smn    | Smn 5'      | GGA | AGC | TTA | TGA | TAA | AGC | TGT | Klonierung          |
| (Maus) |             | GGC | TTC |     |     |     |     |     |                     |
|        | Smn 3'      | CGC | GGA | TCC | TTT | TAT | TTA | ATT | Klonierung          |
|        |             | CTA | AAG | GCA | TTA | ATA | AAA | ATC |                     |
|        |             | TTG |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | Ex6msmnf272 | GAG | TGG | CTG | CCA | CAC | TGG | CTA | Mutationsklonierung |
|        |             | С   |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | Ex6msmnr272 | AGT | AGC | CAG | TGT | GGC | AGC | CAC | Mutationsklonierung |
|        |             | TC  |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | Ex6/8msmnf  | CCA | CAC | TGG | СТА | CTA | TAT | GGT | Mutationsklonierung |
|        |             | TCA | GCT | CTG | TCT | CAG | G   |     |                     |
|        | Ex6/8msmnr  | CCT | GAG | ACA | GAG | CTG | AAC | CAT | Mutationsklonierung |
|        |             | ATA | GTA | GCC | AGT | GTG |     |     |                     |
|        | E134Kf      | GGA | TAT | GGA | AAC | AGA | AAG | GAG | Mutationsklonierung |
|        |             | CAA | AAC | TT  |     |     |     |     |                     |
|        | E134Kr      | AAG | TTT | TGC | TCC | TTT | CTG | TTT | Mutationsklonierung |
|        |             | CCA | TAT | CC  |     |     |     |     |                     |
|        | s262if      | TAG | CAT | AAT | GCC | CAG | GGC | ATC | Mutationsklonierung |
|        | s262ir      | GAT | GCC | CTG | GGC | ATT | ATG | СТ  | Mutationsklonierung |
|        | t274if      | GAG | TGG | СТА | CCA | CAT | TGG | CTA | Mutationsklonierung |
|        |             | С   |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | t274ir      | AGT | AGC | CAG | TGT | GGC | AGC | CAC | Mutationsklonierung |
|        |             | TC  |     |     |     |     |     |     |                     |
|        | Ex7msmnf279 | GGC | TAC | TAT | ATG | GGT | TTC | AG  | Mutationsklonierung |
|        | Ex7msmnr279 | CTG | AAA | ACC | ATA | TAG | TAG | CC  | Mutationsklonierung |
|        | Ex4/6msmnf  | AGG | ATT | AGG | ACC | AGG | AAA | GAT | Mutationsklonierung |
|        |             | AAT | CCC | GCC | ACC | CCC | TCC |     |                     |

|          | Ex4/6msmnr  | AGG | GGG | TGG | CGG | GAT | TAT | CTT | Mutationsklonierung |
|----------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
|          |             | TCC | TGG | TCC | TAA | TCC | ΤG  |     |                     |
|          | GMS10       | CTC | GGG | ATA | TTG | GGA | TTG |     | Genotypisierung     |
|          | MSMN10a     | GTT | GTG | GCA | TTC | TTC | TTT | TGG | Genotypisierung     |
|          |             | С   |     |     |     |     |     |     |                     |
| SMN      | 541C960-f   | GTA | ATA | ACC | AAA | TGC | AAT | GTG | Genotypisierung     |
| (Mensch) |             | AA  |     |     |     |     |     |     |                     |
|          | 541C1120-f  | СТА | CAA | CAC | CCT | TCT | CAC | AG  | Genotypisierung     |
| β-Aktin  | β-actin-s   | GTG | GGC | CGC | CCT | AGG | CAC | CAG | RT-PCR              |
|          | β-actin-as  | CTC | TTT | AAT | GTC | ACG | CAC | GAT | RT-PCR              |
|          |             | TTC |     |     |     |     |     |     |                     |
| LacZ     | GNA3a       | GGT | AAC | GCC | AGG | TTT | TCC |     | Genotypisierung     |
| EBFP     | EBFP-1exp   | GGT | GAA | CAG | CTC | CTC | GCC | CTT | Genotypisierung     |
|          |             | GCT | CAC | CAT | G   |     |     |     |                     |
| Sip-     | prom6-exp   | CTC | GAG | GCC | GTG | TGT | AGG | ATT | Genotypisierung     |
| 1/Gemin2 |             | AAG | GTT | AAA | ATA | CTG | ACT | AG  |                     |
|          | Intron1-rev | CTG | GAC | ATT | GGG | CTG | CTT | CGA | Genotypisierung     |
|          |             | TCC | TAC | AAT | TAA |     |     |     |                     |
| GluR2    | GluR2-Q/R-F | CGA | GTG | GCA | CAC | TGA | GGA | AT  | RT-PCR              |
|          | GluR2-Q/R-R | CTC | TTT | AGT | GGA | GCC | AGA | GTC | RT-PCR,             |
|          |             | TAA |     |     |     |     |     |     | Sequenzierung       |

Tabelle 4.1.12.1.: Primerliste

## 4.1.13. Antikörper

## 4.1.13.1. primäre Antikörper

| Antigen       | Spezies | monoklonal | Konzen-  | Herkunft     | Verwendung            |
|---------------|---------|------------|----------|--------------|-----------------------|
|               |         | polyklonal | tration  |              |                       |
|               |         | 1 7        |          |              |                       |
| hnRNP-R       | Kanin-  | polyklonal | 1:1000   | diese Arbeit | Westernblot;          |
|               | chen    |            |          |              | Koimmunpräzipitation, |
|               |         |            |          |              | Immunhistochemie      |
| hnRNP-Q       | Kanin-  | polyklonal | 1:1000   | diese Arbeit | Westernblot;          |
|               | chen    |            |          |              | Koimmunpräzipitation  |
| Smn           | Maus    | monoklonal | 250µg/ml | Dianova      | Westernblot           |
|               |         |            | 1 μg/ml  |              | Immunhistochemie      |
| Aktin         | Maus    | monoklonal | 1:1000   | Chemicon     | Westernblot           |
| FLAG-Epitop   | Maus    | monoklonal | 10 µg/ml | Sigma        | Westernblot           |
| HA-Epitop     | Maus    | monoklonal | 10 µg/ml | Babco        | Westernblot           |
| (HA.11)       |         |            |          |              |                       |
| phosporylier- | Maus    | monoklonal | 10 µg/ml | Boehringer   | Immunhistochemie      |
| tes tau-1     |         | (Klon      |          | Mannheim     |                       |
|               |         | PC1C6)     |          |              |                       |
| tau           | Kanin-  | polyklonal | 1:500    | Sigma        | Immunhistochemie      |
|               | chen    |            |          |              |                       |
| Map-2         | Maus    | monoklonal | 5µg/ml   | Chemicon     | Immunhistochemie      |
| muriner p75   | Ratte   | monoklonal | 2,3µg/ml | Chemicon     | Motoneuronenkultur    |
| Neurotrophin  |         |            |          |              |                       |
| rezeptor      |         |            |          |              |                       |

Tabelle 4.1.13.1.: Liste der verwendeten primäre Antikörper

## 4.1.13.2. sekundäre Antikörper

| Antikörper/ Konjugat         | Konzentration | Herkunft           | Verwendung       |
|------------------------------|---------------|--------------------|------------------|
| Kaninchen/ Cy3 <sup>TM</sup> | 1:200         | Dianova            | Immunfluoreszenz |
| Maus/ Cy2 <sup>TM</sup>      | 1:200         | Dianova            | Immunfluoreszenz |
| Maus/ Alexa                  | 1:200         | Roche Mol. Biochem | Immunfluoreszenz |
| Kaninchen/ HRP               | 1:10000       | Jackson Labs       | Chemoluminizenz  |
| Maus/ HRP                    | 1:10000       | Jackson Labs       | Chemoluminizenz  |

## Tabelle 4.1.13.2.: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

Alle sekundären Antikörper wurden in Ziegen hergestellt.

### 4.1.14. BAC-Klone

| Gen     | Filter | Feld | Platte | Position | Bibliothek                  |
|---------|--------|------|--------|----------|-----------------------------|
| hnRNP-R | 1      | 1    | P16    | 43       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 1      | 2    | H22    | 26       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 1      | 3    | L13    | 15       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 1      | 6    | E17    | 36       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 2    | B16    | 68       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 3    | M21    | 63       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 2    | N2     | 80       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 4    | G10    | 70       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 4    | G22    | 58       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 5    | G9     | 59       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|         | 2      | 5    | K10    | 83       | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 2  | 6 | J10 | 54  | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
|----|---|-----|-----|-----------------------------|
| 3  | 2 | O16 | 110 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 3  | 5 | N23 | 111 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 3  | 6 | H24 | 132 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 4  | 1 | E1  | 157 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 4  | 2 | G22 | 158 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 4  | 2 | K13 | 171 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 4  | 6 | D14 | 156 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 4  | 6 | G18 | 150 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 5  | 2 | N22 | 212 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 5  | 4 | B11 | 238 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 5  | 4 | 02  | 226 | Mouse ES-129/svJ (Release1) |
| 6  | 5 | A3  | 263 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 6  | 5 | G11 | 281 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 6  | 5 | K4  | 251 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 6  | 6 | C4  | 276 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 6  | 6 | D24 | 246 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 7  | 4 | N12 | 322 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 7  | 5 | L8  | 293 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 8  | 2 | P2  | 350 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 8  | 3 | J15 | 375 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 10 | 3 | G23 | 471 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
| 10 | 3 | 122 | 477 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |

|          | 10 | 3 | 116 | 450 | Mouse FS 120/svI (Release2)  |
|----------|----|---|-----|-----|------------------------------|
| hnDND () | 10 | 3 | J10 | 439 | Wibuse ES-129/SvJ (Release2) |
| IIIKNI-Q | 1  | 3 | G9  | 27  | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 1  | 4 | A14 | 34  | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 1  | 6 | G17 | 24  | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 3  | 5 | P6  | 137 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 4  | 2 | E14 | 170 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 4  | 3 | К3  | 189 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 4  | 3 | L20 | 177 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 4  | 6 | N2  | 180 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 5  | 3 | P12 | 231 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 5  | 5 | E23 | 233 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 5  | 6 | L2  | 198 | Mouse ES-129/svJ (Release1)  |
|          | 6  | 6 | M5  | 246 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 6  | 6 | J21 | 288 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 6  | 4 | N21 | 256 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 6  | 5 | I17 | 275 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 7  | 2 | C22 | 308 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 7  | 6 | B1  | 318 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 7  | 5 | C21 | 329 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 8  | 2 | E14 | 368 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 8  | 6 | N17 | 342 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 8  | 1 | B16 | 340 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |
|          | 8  | 5 | L6  | 347 | Mouse ES-129/svJ (Release2)  |

|  | 8  | 5 | J14 | 377 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
|--|----|---|-----|-----|-----------------------------|
|  | 10 | 4 | L24 | 454 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |
|  | 10 | 1 | K14 | 463 | Mouse ES-129/svJ (Release2) |

### Tabelle 4.1.14.1.: Liste der verwendeten BAC-Klone

Benamung der BAC-Klone siehe Genome Systems Inc., Missouri, USA

### 4.1.15. Mauslinien

| Name             | Deletion/ Transgen  | Herkunft   |
|------------------|---|--|
| C57Bl/6          | -   | Charles River, Sulzfeld                          |
| CD-1             | -   | Charles River, Sulzfeld                          |
| Smn+/-           | Deletion des <i>Smn</i> -Genes auf dem C57Bl/6-Hintergrund    | (Schrank et al., 1997)                           |
| Gemin2+/-        | Deletion des <i>Gemin2</i> -Genes auf dem C57Bl/6-Hintergrund | (Jablonka et al., 2001)                          |
| Smn+/-;Gemin2+/- | Verkreuzung von Smn+/-und Gemin-2+/-                          | (Schrank et al., 1997;<br>Jablonka et al., 2001) |
| Smn-/-;SMN2      | Smn-/- als Hintergrund/ humanes SMN2                          | (Monani et al., 2001)                            |

### Tabelle 4.1.15.1.: Liste der verwendeten Mauslinien

### 4.2. Methoden

#### 4.2.1. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen hnRNP-R und hnRNP-Q

Je zwei Kaninchen wurden mit spezifischen Peptiden für hnRNP-R oder hnRNP-Q (hnRNP-R Aminosäure 1-18 MANQVNGNAVQLKEEEEP, und hnRNP-Q Aminosäure 1-18 MATEHVNGNGTEEPMDTT) in komplettem (erste Immunisierung) und inkomplettem (weitere Injektionen) Freund's Adjuvans immunisiert. Die verwendeten Peptidsequenzen sind identisch mit denen der humanen Sequenz für hnRNP-R und -Q. Jeweils zehn Tage nach der Injektion der Peptide wurde Blut aus den Ohren der Kaninchen entnommen, das Serum präpariert und durch Westernblots getestet.

# 4.2.2. Klonierung von mutierten Smn cDNAs und hnRNP-R und -Q cDNAs für Koimmunopräzipitationen

Bei SMA-Patienten wurden einige Mutationen im *SMN* Gen identifiziert, im Besonderen in der C-terminalen Domäne (S262I, T274I, Y272C, G279V, ΔExon7, ΔExon5, ΔExon5 und 7) und der Tudor Domäne (E134K) (Lefebvre et al., 1995; Rodrigues et al., 1995; Bussaglia et al., 1995; DiDonato et al., 1997; Hahnen et al., 1997; Talbot et al., 1997; Wirth et al., 1999). Es wurden Konstrukte mit entsprechenden Mutationen in der murinen Smn cDNA-Sequenz generiert. Deletionen und Punktmutationen wurden durch PCR-basiertes Spleißen durch Überhangverlängerung mit verschiedenen mutationsverursachenden Primern eingefügt: Smn 5', Smn 3', Ex6msmnf272, Ex6msmnr272, Ex6/8msmnf, Ex6/8msmnf, Ex4/6msmnr. Die Smn cDNA, welche dem Stück von Exon 2b bis Exon 7 entspricht, wurde in die *Hin*DIII- und *Bam*HI-Stellen des pBluescript Vektors ligiert. Diese cDNA wurde als Ausgangspunkt für die weiteren PCRs verwendet. Die fertigen cDNAs und Expressionsvektoren wurden

sequenziert, um den korrekten Einbau der betreffenden Deletion oder Punktmutation zu bestätigen und PCR Artefakte auszuschließen. HnRNP-R und -Q wurden amplifiziert und via Linker-PCR in pcDNA3 kloniert (hnrnpr-HA-up, rnp-Xba-low, gry-rbp-HA-up, gry-Eco-low).

### 4.2.3. Koimmunopräzipitationen

Je 100µl Antiserum wurden mit Protein A- oder G-Agarose in Lysispuffer präinkubiert. Nach dreimaligem Waschen inkubierte die resultierende Suspension mit 100µg Proteinextrakt über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Koimmunopräzipitate dreimal mit Lysispuffer gewaschen und dann in Laemmlipuffer denaturiert. Die Extrakte wurden in einem 10% igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) transferiert. Mit diesen Blots wurden dann Westernblot Analysen mit monoklonalem Antikörper gegen Smn oder gegen das FLAG-Epitop durchgeführt.

### 4.2.4. Westernblot Analysen

Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Muskel, Hirn und Rückenmark von adulten, wildtypischen C57Bl/6 Mäusen und Rückenmark dieser Mäuse zu verschiedenen Entwicklungsstadien wurden entnommen. Die Gewebe wurden in RIPA-Puffer homogenisiert. Lysate aus Zelllinien wurden in Laemmlipuffer aufgenommen. Die Konzentration der Proteine im Extrakt konnte mittels des Bio-Rad Protein Assay Kits (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt werden. Jeder Proteinextrakt wurde mit dem gleichen Volumen 2x Laemmli vermischt. Die Proben wurden zwei Minuten lang gekocht und dann bei -20°C gelagert. Die Extrakte wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Elektroblotten auf Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell,

Dassel, Germany) überführt. Unspezifische Bindestellen auf der Membran wurden für 30 min mit 5%igem fettfreiem Instantmilchpulver in TBST blockiert. Die Erstantikörper, wie der monoklonale murine IgG1 gegen Smn, das polyklonale Kaninchenantiserum gegen hnRNP-R und hnRNP-Q wurden in TBST verdünnt. Die Membran wurde für eine Stunde bei Zimmertemperatur mit dem Antikörper inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen. Ziege anti-Maus und Ziege anti-Kaninchen HRP-konjugierte Antikörper wurden mit TBST als Zweitantikörper verwendet. Die Membran wurde wieder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal gewaschen. Dann wurden die immunreaktiven Banden mittels des ECL Chemoluminizenz Reagenzes (Amersham, Braunschweig, Germany) nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht. Die Blots wurden zur Detektion der Chemoluminizenz auf Röntgenfilme aufgelegt. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt. Das Entfernen der Antikörper vom Blot und dessen erneute Verwendung erfolgten nach den Angaben des Herstellers (Amersham, Braunschweig, Germany).

### 4.2.5. Genotypisierungen

Zur Genotypisierung der Smn+/- Linie wurde eine Gabel-PCR mit dem gemeinsamen Primer GMS10 aus dem 5'-Bereich des *Smn*-Genes und für das Wildtypallel dem Primer MSMN10a aus Exon2, sowie dem Primer GNA3a aus der LacZ-Kassette für das Fehlen von *Smn* durchgeführt. Zur Genotypisierung der Gemin2+/- Linie wurde ebenfalls die Gabel-PCR verwendet, und zwar mit dem gemeinsamen Primer prom6-exp aus dem Promotorbereich des *Gemin2*-Genes und für den Wildtyp Intron1-rev, sowie EBFP-1exp für das Fehlen von *Gemin2*. Das humane SMN2-Transgen wurde mit einer PCR unter Verwendung des Primerpaares 541C960-f und 541C1120-f nachgewiesen.

#### 4.2.6. **RT-PCR**

(A) Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Muskel, Hirn und Rückenmark von adulten, wildtypischen C57Bl/6 Mäusen und Rückenmark wurde von Mäusen an verschiedenen Entwicklungsstadien entnommen. Die RNA wurde mit Hilfe der TRIZOL-Methode (Life Technologies) präpariert. Die PCRs wurden mit den folgenden Primerpaaren durchgeführt:  $\beta$ -actin-s und  $\beta$ -actin-as, RNP1F und RNP282R, gry1F und gry273R.

(B) Gehirne von Embryonen am zehnten, elften und zwölften Tag nach der Befruchtung und Neugeborenen aus einer Verpaarung von *Smn+/-;hSMN2* X *Smn+/-;hSMN2* Mäusen wurden entnommen und anschließend genotypisiert. Aus den Hirnen der Genotypen *Smn-/-;hSMN2* und *Smn+/+;hSMN2* wurde mittels der TRIZOL-Methode (Life Technologies) RNA gewonnen. Mittels reverser Transkription wurde kodierende DNA (cDNA) hergestellt. Hierzu wurden gemischte Hexamere als Primer verwendet. Die PCRs wurden mit dem Primerpaar GluR2-Q/R-F, GluR2-Q/R-R (nach Carlson et al., 2000) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Primer GluR2-Q/R-R sequenziert.

### 4.2.7. Immunodetektion von Smn, hnRNP-R und tau in spinalen Motoneuronen an Rückenmarksschnitten

Das lumbale Rückenmark von zwölf Monate alten C57Bl/6 Mäusen wurde entnommen und in Tissuetec (Sakura, Zoeterwonde, Netherlands) eingefroren. Gefrierschnitte (10µm) wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur zum Blockieren der unspezifischen Bindungen mit TBST, welches 10% BSA enthielt, blockiert. Danach wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Antikörper gegen murines Smn in einer Konzentration von 1µg/µl oder einem monoklonalen Antikörper gegen phosporyliertes tau-1 oder polyklonalem Peptidantiserum gegen hnRNP-R inkubiert. Die Proben wurden dreimal mit TBST gewaschen, mit den Zweitantikörpern inkubiert, wiederum dreimal mit TBST gewaschen, und in DABCO (Merck, Darmstadt, Germany) eingebettet. Die Immunreaktivität wurde danach mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica sichtbar gemacht. Die Werte für den Lichteinfall und die Spannung waren bei der Analyse zusammengehöriger Schnitte identisch. Die Experimente wurden mindesten zweimal wiederholt, die gezeigten Daten stammen aus einem repräsentativen Experiment.

### 4.2.8. Techniken für die Kultivierung embryonaler Motoneurone

Trächtige Mäuse (14 Tage nach der Empfängnis) wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen aus dem Uterus entnommen. Sie wurden vor der weiteren Präparation dekaptiert. Der ventrolaterale Teil des lumbalen Rückenmarks wurde entnommen und in HBSS (Life Technologies) überführt. Nach der Trypsinbehandlung (0,05%, 10 Minuten), wurden die Gewebe zu einer Zellsuspension trituriert (Wiese et al., 1999). Die spinalen Motoneurone der Embryonen wurden durch das Aufbringen auf mit Antikörpern gegen den murinen p75 Neurotrophinrezeptor beschichtete Platten affinitätsgereinigt (Wiese et al., 2001). Die Zellen wurden in einer Dichte von 2000-3000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 4-Vertiefungskulturschalen (Greiner, Germany) plattiert. Diese waren vorher mit Polyornithin und Laminin beschichtet worden (Wiese et al., 1999). Die Zellen wuchsen dann in Motoneuronenmedium bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Das Medium wurde am nächsten Tag und dann jeden zweiten Tag gewechselt.

### 4.2.9. Fixierung, Färbung und Vermessung kultivierter Nervenzellen

Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Motoneurone beziehungsweise differenzierten PC12-Zellen (Phäochromozytoma-Zellen aus der Ratte) mit Methanol/ Aceton (1:1) fixiert, blockiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen Smn (1µg/ml) (Dianova, Hamburg,

Germany), Phospho-tau und/oder polyklonalem hnRNP-R Antiserum oder polyklonalen Antikörpern gegen Phospho-tau und monoklonalen Antikörpern gegen Map-2 inkubiert, dreimal mit TBST gewaschen, mit Zweitantikörpern inkubiert, dreimal mit TBST gewaschen, und in Mowiol eingebettet. Die Einstellungswerte für den Lichteinfall und die Spannung am konfokalen Lichtmikroskop die waren für Analyse zusammengehöriger Motoneuronenkulturen identisch. Die Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt, die gezeigten Daten stammen aus einem repräsentativen Experiment. Die Längenmessung der Neuriten erfolgte anschließend mit Hilfe des Programms Scion-Image. Die Daten der Messungen entsprechen den Mittelwerten aller Wiederholungen. Alle Daten von stabil transfizierten PC12-Zellen stammen von mindestens zwei unabhängigen Zelllinien.

### 4.2.10. Analyse der genomischen Region

Die vollständigen cDNAs von hnRNP-R und hnRNP-Q (Klonierung siehe "Klonierung von mutierten Smn cDNAs und hnRNP-R und -Q cDNAs für Koimmunopräzipitationen") wurden aus pcDNA3 ausgeschnitten und mit  $\alpha$ CTP<sup>32</sup> radioaktiv markiert. Mit diesen Sonden wurden dann je zwei BAC Filtersätze (Genome Systems Inc., Missouri, USA) hybridisiert. Die so gefundenen, hnRNP-R beziehungsweise hnRNP-Q enthaltenden Klone sind unter 4.1.14. aufgeführt. Aus diesen Bakterienklonen wurden die BACs isoliert und mit Restriktionsenzymen, welche nicht in der kodierenden Region von hnRNP-R und -Q schneiden (EcoRI für hnRNP-R und XbaI für hnRNP-Q), verdaut und Southernblots wurden hergestellt. Diese wurden nun wiederum mit den cDNA-Sonden hybridisiert.

#### 4.2.11. Stabile PC12-Linien mit NGF differenziert

*hnRNP-R* und *-Q* wurden amplifiziert und via Linker-PCR in pcDNA3 kloniert (hnrnpr-HAup, rnp-Xba-low, gry-rbp-HA-up, gry-Eco-low). Auf der Basis dieser Konstrukte wurden durch PCR-basiertes Spleißen durch Überhangverlängerung in die cDNAs von hnRNP-R und hnRNP-Q Deletionen der beiden intakten RNA recognition motifs (RRM, Rossoll und Kröning, 2002) mit Hilfe verschiedener deletionsverursachender Primer eingefügt: RNPrrm2f, RNPrrm2-r, GRYrrm2-f, GRYrrm2-r). PC12-Zellen wurden mittels Lipofectamin 2000 (Life Technologies) mit diesen cDNA-Konstrukten transfiziert und auf ihre G418-Resistenz selektioniert. Je 48-72 resistente Klone wurden hochgezogen und aus ihnen Zelllysate hergestellt. Diese Lysate wurden via Westernblot mit einem monokonalen Antikörper gegen das HA-Epitop (1µg/ml, Babco, Kalifornien, USA) auf die Expression der Konstrukte getestet. Von jedem Konstrukt konnten mehrere unabhängige Linien gewonnen werden. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 4-Vertiefungskulturschalen (Greiner, Germany) auf Glasplättchen plattiert. Diese waren vorher mit Polyornithin beschichtet worden. Die Zellen wuchsen dann einen Tag in Vollmedium; ab dem nächsten Tag wurde das Vollmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt. Dieses Differenzierungsmedium wurde dann an jedem zweiten Tag erneuert.

### 4.2.12. Analyse der genomischen DNA von SMA-Patienten

Auf genomischer DNA von SMA-Patienten ohne Mutationen in den Genen für *SMN* und *IGHMBP2* (zur Verfügung gestellt von Katja Grohmann, Virchow Kliniken, Berlin) und genomische Kontroll-DNA wurden für jedes Exon von *hnRNP-R* und *-Q* inklusive der flankierenden Intronbereiche PCRs mit den folgenden Primerpaaren durchgeführt: R-EX1-up und R-Ex1-low, R-Ex2-up und R-Ex3-low, R-Ex4-up und R-Ex4-low, R-Ex5-up und R-Ex5-low, R-Ex6-up und R-Ex7-up und R-Ex7-low, R-Ex8-up und R-Ex8-low, R-Ex9-up und R-Ex9-low, R-Ex1-up und R-Ex1-low, Q-Ex1-up und R-Ex8-low, Q-Ex1-up und R-Ex8-low, Q-Ex1-up und Q-Ex1-low, Q-Ex2-up und R-Ex8-low, Q-Ex1-up und Q-Ex1-low, Q-Ex2-up und R-Ex8-low, R-Ex8-up und Q-Ex1-low, Q-Ex2-up und R-Ex8-low, Q-Ex1-up und Q-Ex1-low, Q-Ex2-up und R-Ex8-low, Q-Ex1-up und Q-Ex1-low, Q-Ex2-up und R-Ex8-low, Q-Ex1-low, Q-Ex1

Q-Ex3-lowa, Q-Ex4-up und Q-Ex5-low, Q-Ex6-up und Q-Ex6-low, Q-Ex7-up und Q-Ex7low, Q-Ex8-up und Q-Ex9-low, Q-Ex10-up und Q-Ex10-low. Zum Teil befinden sich zwei Exone auf einem PCR Produkt, wenn der Abstand der Exone voneinander dieses zuließ. Die so erhaltenen PCR Produkte wurden dann mit den folgenden Primern sequenziert: R-EX1-up, R-Ex2-up, R-Ex3-low, R-Ex4-up, R-Ex5-up, R-Ex6-up, R-Ex7-up, R-Ex8-up, R-Ex9-up, R-Ex10-up, Q-Ex1-up, Q-Ex2-upa, Q-Ex3-lowa, Q-Ex4-up, Q-Ex5-low, Q-Ex6-up, Q-Ex7-up, Q-Ex8-up, Q-Ex9-low, Q-Ex10-up. Die sich erhaltenen Sequenzen wurden mit den genomischen Regionen beider Gene aus den Datenbanken verglichen. Hierzu wurde die Software SeqMan verwendet.

### 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Polyklonale Antikörper gegen hnRNP-R und hnRNP-Q

### 5.1.1. Zielsetzung

Antikörper sind immer ein wertvolles Instrument zur Charakterisierung der biochemischen und physiologischen Eigenschaften eines Proteins. In diesem Falle sollten sie hergestellt werden, um die zelluläre Rolle von hnRNP-R und –Q zu charakterisieren.

### 5.1.2. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen hnRNP-R und -Q

Aufgrund der hohen Homologie von hnRNP-R und –Q wurden N-terminale Peptide gewählt, die sich hinsichtlich ihrer Sequenz deutlich voneinander unterscheiden. Es handelt sich hierbei jeweils um die ersten 18 Aminosäuren (Abbildung 5.1.).

Abbildung 5.1.1.: Position der Peptide zur Antikörperherstellung Gezeigt sind die ersten Aminosäuren der Proteine hnRNP-R und –Q. Die grau unterlegten Aminosäuren sind als Peptide für die Immunisierung von Kaninchen verwendet worden.

Diese Peptide wurden zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen injiziert. Die Peptidantiseren wurden auf Westernblots von HEK293-Zellen getestet und detektierten Banden der erwarteten molekularen Größen. Die Spezifität und Sensivität der Seren variiert hierbei zwischen den Serumentnahmen (Abbildung 5.1.2.).

|   | hnRNP-R                       |          |           |           |                  |                 |           | hnRNP-Q   |          |           |           |          |                |                  |           |           |          |                        |                  |                  |           |           |          |           |           |          |                |
|---|-------------------------------|----------|-----------|-----------|------------------|-----------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|-----------|-----------|----------|------------------------|------------------|------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| ſ | Kani                          | nc hei   | n #4      | 283       |                  | _               |           | Ka        | anincl   | nen #4    | 295       |          |                |                  | Ka        | ninch     | en#4     | 1297                   | — r              |                  |           | K         | aninch   | en #42    | 299       |          | _              |
|   | -                             | _        | -         | -         | -                |                 | -         | -         | -        | -         |           |          |                |                  | -         | -         | -        |                        | 1                |                  |           |           |          |           |           |          |                |
|   | Präimmunse num-<br>4. Se num- | 6.Serum- | 5. Serum- | 7. Serum- | le tztes Se rum- | Präimmunse rum- | 4. Serum- | 5. Serum- | 6.Serum- | 7. Serun- | 8. Serun- | 9.Serun- | letztes Serum- | Präimm unse rum- | 4. Serum- | 5. Serum- | 6.Serum- | 7. Serun-<br>8. Serun- | le tztes Se nun- | Präimm unse num- | 4. Serum- | 5. Serun- | 6.Serum- | 7. Serun- | 8. Serun- | 9.Serun- | letztes Serum- |

### Abbildung 5.1.2.: Kaninchenantiserentest

Aus HEK293 Zellen wurden Lysate hergestellt, diese in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und davon Westernblots hergestellt. Diese Blots wurden dann entlang der Laufrichtung in Streifen geschnitten und wie beschriftet mit den einzelnen Seren geprobt. Alle Seren, mit Ausnahme der Präimmunseren detektierten mehr oder weniger gut die Proteine hnRNP-R oder –Q. Die Bande für hnRNP-R liegt bei 82 kD, die für hnRNP-Q bei 74kD und 69kD.

### 5.1.3. Zusammenfassung

Es konnten polyklonale Antiseren gegen hnRNP-R und –Q hergestellt werden, welche in Zelllysaten die jeweils richtige Bandengröße detektieren. Beide hnRNPs konnten ebenfalls auf Westernblots von Mausgeweben nachgewiesen und durch Präadsorption mit den entsprechenden Peptiden blockiert werden (Abbildung 5.3.1. und 5.3.2.). Auf diesen Gewebeblots zeigte sich allerdings– anders als bei HEK293-Zellen – nur eine Bande für hnRNP-Q, was darauf hindeutet, dass in Mausgewebe nur eine hnRNP-Q-Isoform exprimiert wird, in menschlichen Zellen hingegen zwei.

Leider eignet sich nur eines der Seren gegen hnRNP-R auch gut für immunhistochemische Untersuchungen (Abbildung 5.1.3.). Mit den anderen drei Seren beobachteten wir zuviel unspezifische Hintergrundfärbung, die auf einem Westernblot, wie auf Immunhistochemien zwar auch zu sehen ist, aufgrund der unterschiedlichen Laufhöhen aber nicht als störend empfunden wird (Tabelle 5.1.1.).



# Abbildung 5.1.3.: Verteilung von hnRNP-R in den Zellkörpern von murinen spinalen Motoneuronen

hnRNP-R wurde in spinalen Motoneuronen im adulten Rückenmark detektiert. Die Präadsorbtionskontrolle (rechts) mit hnRNP-R-Peptid zeigt einen deutlichen Unterschied zur Färbung (links).

|                      | hnR                | NP-R               | hnRNP-Q            |                    |  |  |  |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|--|--|
|                      | Kaninchen<br>#4283 | Kaninchen<br>#4295 | Kaninchen<br>#4297 | Kaninchen<br>#4299 |  |  |  |
| Westernblot          | +++                | +++                | +++                | +                  |  |  |  |
| Koimmunpräzipitation | +++                | +++                | +++                | +                  |  |  |  |
| Immunhistochemie     | +                  | +++                | -                  | -                  |  |  |  |

### Tabelle 5.1.1.: Nutzbarkeit der polyklonalen Antiseren gegen hnRNP-R und -Q

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Gebrauchsmöglichkeiten der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antiseren. Alle vier eignen sich für Westernblots und Koimmunpräzipitationen, jedoch ist nur das Antiserum #4295 gegen hnRNP-R auch gut für immunhistochemische Untersuchungen zu verwenden.

### 5.2. hnRNP-R und hnRNP-Q interagieren mit Wildtyp-Smn, aber nicht mit mutierten Isoformen, die bei Patienten mit SMA identifiziert wurden

### 5.2.1. Zielsetzung

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die von Wilfried Rossoll mittels des Yeast-Two-Hybrid-Verfahrens gefundenen Interaktionen von hnRNP-R und –Q mit Smn zu bestätigen und genauer zu charakterisieren.

### 5.2.2. hnRNP-R und –Q interagieren mit Smn, aber nicht mit trunkiertem Smn

Um die durch Wilfried Rossoll mit dem Yeast-Two-Hybrid Verfahren gefundene Interaktion von hnRNP-R und –Q mit Smn zu bestätigen, wurde die gesamte cDNA von hnRNP-R und –Q als "prey" (englisch für Beutetier) für direkte Interaktionstests in den Vector pACT-2 kloniert. Als "bait" (englisch für Köder) wurden, wie bei der ursprünglichen Yeast-Two-Hybrid Suche, die Exone 2b-7 des Smn-Genes verwendet. In den Exonen 1 und 2a befindet sich die Sip-1/Gemin-2-Bindestelle (Liu et al, 1997). Dieser Bereich wurde also für die Suche nach neuen Smn-Interaktionspartnern entfernt, um nicht nur den starken Interaktionspartner Sip-1/Gemin-2 zu fischen. Um die Bindestelle der hnRNPs an Smn zu lokalisieren, wurden außerdem zwei Teilstücke von Smn, Exon 2b-3 und Exon 4-7 in den Vector pAS2-1 kloniert. Es ergab sich, dass wie erwartet beide hnRNPs an SMN Exon 2b-7 binden können. Zunächst überraschend konnten sie aber weder an Exon 2b-3, noch an Exon 4-7 binden (Tabelle 2.1.). Möglicherweise findet die Interaktion in der Mitte des Proteins statt, oder es wird für die Bindung das ganze Protein benötigt.

|               | pACT-2 | hnRNP-R | hnRNP-Q |
|---------------|--------|---------|---------|
| pAS2-1        | -      | -       | -       |
| Smn Exon 2b-7 | -      | +++     | +++     |
| Smn Exon 2b-3 | -      | -       | -       |
| Smn Exon 4-7  | -      | -       | -       |

**Tabelle 5.2.1.: Yeast-Two-Hybrid Interaktionstests mit Smn und trunkiertem Smn** Hefezellen wurden mit Smn, Smn Exon 2b-3, oder Smn Exon 4-7 in pAS2-1 und hnRNP-R oder –Q in pACT-2 transfiziert. Um direkte Interaktionen festzustellen, wurde dann eine LacZ-Färbung vorgenommen. Hierbei zeigte sich eine Interaktion von hnRNP-R und –Q nur mit Smn, nicht aber mit den einzelnen Teilen.

### 5.2.3. hnRNP-R und –Q interagieren direkt mit Smn

Um mit einer unabhängigen zweiten Methode zu verifizieren, dass hnRNP-R und hnRNP-Q tatsächlich direkt mit Smn interagieren, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit cDNAs für *hnRNP-R*, *hnRNP-Q*, murines *Smn* und *GFP* als Negativkontrolle transfiziert. Die Zelllysate wurden für Immunpräzipitationen mit beiden Peptidantiseren verwendet. Im Westernblot konnte Smn in Immunpräzipitaten von Zellen nachgewiesen werden, die zuvor mit *Smn* transfiziert worden waren. Die Interaktion zwischen Smn und hnRNP-R und -Q war auch zu sehen, wenn hnRNP-R/ -Q nicht überexprimiert wurden, was darauf hindeutet, dass die endogene Menge an hnRNP-R und hnRNP-Q in HEK293-Zellen für den Nachweis der Interaktion ausreicht (Abbildung 5.2.1.).



Abbildung5.2.1.:SmninteragiertdirektmithnRNP-RundhnRNP-Q.(KoimmunpräzipitationenvonSmnmitpolyklonalenAntikörperngegenhnRNP-RundhnRNP-Q.)AusHEK 293Zellen, die transient mitExpressionsplasmiden für hnRNP-R, hnRNP-Q, Smn undGFP(alsNegativkontrolle)transfiziertwurden, wurdenLysatehergestellt.Smnließsichmit

hnRNP-R und –Q kopräzipitieren. Relativ große Mengen an Smn konnten auch mit Antikörpern gegen hnRNP-R und hnRNP-Q präzipitiert werden, ohne dass hnRNP-R oder –Q überexprimiert wurden.

# 5.2.4. hnRNP-R und –Q interagieren nicht mit in SMA-Patienten gefundenen Formen von Smn

Weiterhin wurde getestet, ob mutierte Formen von Smn Protein, die denen in SMA-Patienten entsprechen, ebenfalls mit hnRNP-R oder –Q interagieren. Dazu wurden HEK293-Zellen mit cDNAs für murines *Smn* und mutierte murine Formen von *Smn Protein*, welche eine FLAG-Epitop tragen transient transfiziert. Diese Mutationen entsprechen den humanen Mutationen E134K, S262I, T274I , Y272C, G279V,  $\Delta$ exon7,  $\Delta$ exon5,  $\Delta$ exon5 und 7 (Lefebvre et al., 1995; Rodrigues et al., 1995; Bussaglia et al., 1995; DiDonato et al., 1997; Hahnen et al., 1997; Talbot et al., 1997; Wirth et al., 1999). Um die Sensibilität des Experiments zu erhöhen und auch schwache Interaktionen zu detektieren, wurden hnRNP-R oder hnRNP-Q ebenfalls überexprimiert.



### Abbildung 5.2.2.: Koimmunpräzipitationen von mutiertem Smn Protein mit polyklonalen Antikörpern gegen hnRNP-R und hnRNP-Q

Lysate von transfizierten HEK 293 Zellen wurden für Koimmunpräzipitationen mit *hnRNP-Q* oder *hnRNP-R* und *Smn* oder einer der mutierten *Smn*-Formen verwendet, die bei SMA Patienten gefunden wurden. Alle Smn Proteine waren mit FLAG markiert. Das Präzipitat wurde für Westernblot Analysen verwendet

(A) Die Immunpräzipitationen wurden mit polyklonalen hnRNP-R oder –Q Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis des kopräzipierten Smn oder der mutierten Proteine wurde mit Antikörpern gegen FLAG durchgeführt. Die mutierten Smn Proteine konnten nicht mit hnRNP-R oder hnRNP-Q Antikörpern kopräzipitiert werden

(**B**) Die Zelllysate wurden durch Westernblots auf die Expression der mutierten SMN Proteine mit Antikörpern gegen FLAG getestet.

Westernblots dieser Proteinextrakte mit einem Antikörper gegen FLAG wurden durchgeführt um die Menge an exprimierten mutierten Smn Proteinen zu bestimmen (Abbildung 5.2.2.). Die Zelllysate wurden für Immunpräzipitationen mit beiden Antiseren verwendet. In Westernblots konnte Smn nur in solchen Immunpräzipitaten nachgewiesen werden, die mit wildtypischem *Smn* transfiziert worden waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hnRNP-R und –Q nicht mit mutierten Smn Proteinen interagieren (Abbildung 5.2.2.).

### 5.2.5 Zusammenfassung

Sowohl hnRNP-R, als auch hnRNP-Q können mit Smn interagieren. Beide interagieren, nicht jedoch mit verkürzten Domänen, die aus Exon 1b-3 beziehungsweise Exon 4-7 bestehen. Außerdem interagieren beide nicht mit Smn, das nach dem Vorbild SMA-auslösender menschlicher Smn Proteine mutiert wurde.

## 5.3. hnRNP-R und hnRNP-Q sind in vielen Geweben exprimiert und im Rückenmark von Mäusen im Laufe der Entwicklung spezifisch reguliert

### 5.3.1. Zielsetzung

Ziel der nächsten Experimente war es, die physiologische Bedeutung von hnRNP-R und –Q besser zu charakterisieren. Es sollte herausgefunden werden, in welchen Geweben die beiden Proteine und ihre RNAs exprimiert werden und die Frage geklärt werden, ob die Expression von hnRNP-R und –Q während der Entwicklung des Nervensystems der Maus reguliert wird.

### 5.3.2. hnRNP-R- und -Q-Verteilung in unterschiedlichen Geweben

Die Expression beider Gene wurde auf Westernblots von Extrakten verschiedener neuronaler und nichtneuronaler Gewebe der adulten Maus getestet. Für hnRNP-R zeigte sich die stärkste Bande im Gehirn, geringere Mengen wurden im Rückenmark, dem Herzen, der Lunge, der Leber und der Milz nachgewiesen. HnRNP-Q fand sich in allen getesteten Geweben. Die größten Mengen konnten in der Lunge, der Leber und dem Gehirn, die geringsten in der Niere und dem Muskel detektiert werden (Abbildung 5.3.1.). hnRNP-R und hnRNP-Q sind also – wie Smn – in vielen Geweben zu finden.



# Abbildung 5.3.1.: Verteilung der hnRNP-R und hnRNP-Q Proteinexpression in verschiedenen Geweben

Westernblot Analyse der hnRNP-R und hnRNP-Q Proteine in verschiedenen Geweben der adulten Maus. Gewebelysate wurden in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, geblottet und mit Seren gegen hnRNP-R und -Q geprobt. Die polyklonalen Antikörper zeigten einzelne Banden (82 kD für hnRNP-R, 74 kD für hnRNP-Q). Die Proteinmenge in den verschiedenen Spuren wurde bestimmt durch Entfernen der Antikörper vom Blot und erneuter Inkubation mit Antikörpern gegen β-Aktin. Als Kontrolle für die Spezifität der hnRNP-R und -Q Antikörper wurden die Blots außerdem mit präadsorbierten polyklonalen Antikörpern getestet.

### 5.3.3. hnRNP-R- und –Q-Verteilung in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Rückenmarkes

Da bei der SMA ausschließlich Motoneurone des Rückenmarks betroffen sind, wurde die Regulierung von hnRNP-R- und –Q Protein in diesem Gewebe in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Das Rückenmark wurden am vierzehnten und neunzehnten Embryonaltag beziehungsweise nach der Geburt an den Tagen zwei und fünfzehn, sowie von adulten, zwölf Monate alten Mäusen isoliert. Die Gewebelysate wurden mit beiden Antiseren getestet. Beide hnRNPs sind während der Entwicklung reguliert, wobei die höchste Expression während der späten Embryogenese zu beobachten ist und nach der Geburt stark abfällt (Abbildung 5.3.2.).



# Abbildung 5.3.2.: Veränderung der hnRNP-R und hnRNP-Q Proteinexpression während verschiedener Entwicklungsstadien im Rückenmark der Maus

Westernblot Analyse der hnRNP-R und -Q Proteinmengen in embryonalem und postnatalem Maus Rückenmark. Die polyklonalen Antikörper zeigten einzelne Banden (82 kD für hnRNP-R, 74 kD für hnRNP-Q). Für Negativkontrollen wurden weitere Blots mit präadsorbierten polyklonalen Antikörpern getestet. Die Proteinmenge in den verschiedenen Spuren wurde bestimmt durch Strippen des Blottes und erneutes Inkubieren mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin (42 kD, unten). Die stärksten hnRNP-R und -Q Signale wurden am neunzehnten Embryonaltag und am zweiten Tag nach der Geburt detektiert. Nach dem zweiten Tag wurde die Intensität des Signales geringer; die niedrigste Menge fand sich in adulten, zwölf Monate alten Mäusen.

### 5.3.4. Verteilung der hnRNP-R und hnRNP-Q RNA-Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien

Um zu sehen, ob diese Veränderungen durch transkriptionale oder posttranskriptionale Mechanismen verursacht werden, wurden RT-PCRs mit RNAs aus verschiedenen Geweben und Rückenmark zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien durchgeführt. Hierzu wurden Primer aus den kodierenden Regionen der *hnRNP-R* und *hnRNP-Q* Gene verwendet (Abbildung 5.3.3).



Abbildung 5.3.3.: Regulierung der hnRNP-R und hnRNP-Q RNA-Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien

RT-PCR Analyse von hnRNP-R und hnRNP-Q RNA in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien. hnRNP-R und hnRNP-Q cDNA Plasmide (je 100 fg) wurden als interne Kontrolle der Spezifität der PCR Reaktion benutzt und RT-PCR mit β-Aktin Primern wurde als Kontrolle für vergleichbare RNA-Mengen pro PCR-Reaktion durchgeführt.

#### 5.3.5. Zusammenfassung

Das Resultat zeigt, dass beide Proteine weitgehend ubiquitär exprimiert werden. Die RNA-Mengen für *hnRNP-R und -Q* schienen im sich entwickelnden und postnatalen Rückenmark gleich zu sein, was darauf hindeutet, dass die Reduktion der hnRNP-R- und –Q-Menge durch posttranslationale Mechanismen verursacht wird. Es ist möglich, dass die Interaktion mit Smn, welches ebenfalls auf Proteinebene im postnatalen Rückenmark reduziert wird, für die Stabilität von hnRNP-R und –Q notwendig ist. Diese Beobachtungen wurden bereits früher für SIP-1/Gemin2 beschrieben (Wang und Dreyfuss, 2001; Jablonka et al., 2001).

### 5.4. Das hnRNP-R Protein ist in den Axonen der Motoneurone lokalisiert

#### 5.4.1. Zielsetzung

Da sowohl Smn, als auch hnRNP-R und –Q in sehr vielen Geweben exprimiert werden und alle drei im Rückenmark während der Entwicklung reguliert werden, war es das Ziel der folgenden Experimente herauszufinden, ob Smn in den Motoneuronen mit hnRNP-R und –Q kolokalisiert. Da bei der SMA besonders die Axone der Motoneurone von einer Mutation in *SMN* betroffen sind würde eine Kolokalisation in diesen Zellen auf eine funktionelle Beziehung zwischen den Proteinen in Bezug auf die Krankheit hinweisen. Um dieses im Detail zu untersuchen, wurde die Lokalisation der Proteine in Neuronen des Rückenmarkes *in situ* und in Zellkultur untersucht. Unglücklicherweise trat mit beiden hnRNP-Q Antiseren ein signifikanter Hintergrund in den Färbungen von Gewebeschnitten sogar nach der Präadsorption auf, sodass sie leider nicht für diese Untersuchungen verwendet werden konnten.

### 5.4.2 hnRNP-R und Smn kolokalisieren in den Motoneuronen des Rückenmarkes

Rückenmarksschnitte von adulten Mäusen wurden mit dem Peptidantiserum gegen hnRNP-R und monoklonalen Antikörpern gegen Smn doppelt gefärbt. Es wurde eine spezifische hnRNP-R Färbung der Motoneurone im Zellkern, dem Zytoplasma und den Neuriten beobachtet (Abbildung 5.4.1.). hnRNP-R kolokalisierte mit Smn im Zytoplasma und den Neuriten. Im Gegensatz zu Smn, welches sich in gem-ähnlichen Strukturen im Zellkern konzentriert, färbte hnRNP-R diese nuklearen Strukturen nicht (Abbildung 5.4.1.).



Abbildung 5.4.1.: Subzelluläre Verteilung von hnRNP-R und Smn in Motoneuronen hnRNP-R und Smn finden sich in den Zellkörpern und Neuriten von murinen spinalen Motoneuronen. Smn konnte zusätzlich im Kern in Strukturen nachgewiesen werden, die wie Gems aussehen. hnRNP-R war nicht in gem-ähnlichen Strukturen angereichert.

#### 5.4.3. hnRNP-R ist in einem Neuriten angereichert

Um zu definieren, ob hnRNP-R mehr in Axonen oder Dendriten vorkommt, wurden kultivierte embryonale spinale Motoneurone gefärbt. Die Motoneurone wurden aus Mausembryonen am vierzehnten Embryonaltag entnommen und sieben Tage lang kultiviert. Die fixierten Zellen wurden dann mit dem anti-hnRNP-R Serum und monoklonalen Antikörpern gegen Smn gefärbt. Als Kontrolle wurde präadsorbiertes hnRNP-R Antiserum verwendet (Abbildung 5.4.2.). Diese Experimente bestätigten die Ergebnisse der zellulären Färbung an Rückenmarksschnitten *in vivo*. Interessanterweise erschien in der hnRNP-R-Färbung an kultivierten Motoneuronen ein Neurit stärker markiert, während bei der Smn-Färbung, alle Neurite gleich stark gefärbt waren.



# Abbildung 5.4.2.: Subzelluläre Verteilung von hnRNP-R und Smn in kultivierten embryonalen Motoneuronen

SMN war im Zellkern in gem-ähnlichen Strukturen, im Zytoplasma und den Neuriten nachweisbar. hnRNP-R fand sich im Zellkern, aber nicht in gem-ähnlichen Strukturen, im Zytoplasma und besonders deutlich in einem Neurit.

### 5.4.4. hnRNP-R ist in den Axonen von Motoneuronen lokalisiert

Um herauszufinden, ob es sich bei dem stärker gefärbten Neurit um das Axon handelt, wurde eine Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Axonmarker Phospo-tau-1 (Klon PC1C6) durchgeführt. Dieses Experiment zeigte, dass hnRNP-R hauptsächlich in den Axonen konzentriert ist (Abbildung 5.4.3.).



Abbildung 5.4.3.: Kolokalisation von hnRNP-R und dem axonalen Marker PC1C6 antiphospho-tau In rot ist die hnRNP-R Färbung eines sieben Tage lang kultivierten spinalen Motoneurons gezeigt. In grün wird Phospo-tau-1 im Zytoplasma und im Axon sichtbar. In der

Zusammenstellung erscheint das Axon gelb. HnRNP-R wird also, wie Phospo-tau-1 spezifisch im Axon exprimiert.

Um diese axonale Lokalisation von hnRNP-R *in vivo* zu verifizieren, wurden Querschnitte durch den Ischiasnerv mit dem Antiserum gegen hnRNP-R und monoklonalen anti-Smn Antikörpern gefärbt. In den Axonen wurde eine starke, spezifische hnRNP-R-Färbung beobachtet, in den Schwannzellen jedoch nicht (Abbildung 5.4.4.).



Abbildung 5.4.4.: Subzelluläre Verteilung von hnRNP-R im Ischiasnerv der adulten Maus Querschnitte des Ischiasnervs wurden doppelt gefärbt gegen hnRNP-R (A, E, I) und Smn (B, F, J). hnRNP-R war nachweisbar in den Axonen. Smn wurde in niedrigen Mengen ebenfalls im Axon und den umgebenden Zellen gefunden. Die entsprechenden Zusammenstellungen finden sich in C, G, K und die Spezifitätskontrollen mit präadsorbierten hnRNP-R Antiseren sind in D, H, L gezeigt.

### 5.4.5. hnRNP-R befindet sich hauptsächlich in den Axonen motorischer Nerven

Um herauszufinden, ob hnRNP-R bevorzugt in den Axonen von vorwiegend motorischen oder sensorischen Nervensträngen exprimiert wird, wurden auch Färbungen anderer Nerven durchgeführt: der Nervus fazialis und der Nervus phrenicus, die fast ausschließlich motorische Fasern enthalten und der Nervus perinealis, einem hauptsächlich sensorischen Nerv (Abbildung 5.4.5.). Im motorischen Nervus fazialis und Nervus phrenicus war eine starke Färbung zu sehen, im sensorischen Nervus perinealis waren jedoch nur einzelne Fasern gefärbt. Dieses weist darauf hin, dass hnRNP-R hauptsächlich in Axonen motorischer Nerven vorkommt.



Abbildung 5.4.5.: Querschnitte durch verschiedene Nervenstränge

Die Abbildung zeigt Querschnitte durch den Nervus phrenicus (**A**, **a**), den Nervus fazialis (**B**, **b**), den Ischiasnerv (**C**, **c**) und den sensorischen Nervus perinealis (**D**, **d**). Alle Schnitte wurden gleich behandelt und parallel im gleichen Experiment gefärbt. **A-D** zeigen die Detektion des hnRNP-R-Antiserums, **a-d** die dazugehörigen Präadsorbtionskontrollen. Eine starke Färbung fand sich in den vorwiegend motorischen Nerven (N. phrenicus und fazialis). Im Ischiasnerv erschienen nur einzelne Fasern stark gefärbt, während sie im sensorischen Nervus perinealis nur sehr schwach gefärbt waren.

### 5.4.6. Zusammenfassung

hnRNP-R ist in den Motoneuronen des Rückenmarkes der Maus mit Smn kolokalisiert. Es findet sich jedoch nicht in gem-ähnlichen Strukturen. Anders als Smn wird hnRNP-R im Axon stärker angefärbt, als in den Dendriten. Diese axonale Lokalisation ist in motorischen Nerven wesentlich kräftiger, als in sensorischen. Dieses weist darauf hin, dass hnRNP-R eine wichtige Rolle in motorischen Axonen spielt, welche bei Patienten mit SMA besonders stark betroffen sind.

### 5.5. Analyse der genomischen Regionen von hnRNP-R und hnRNP-Q

### 5.5.1. Zielsetzung

Ziel dieser Experimente war es, mehr über die genomische Struktur der *hnRNP-R* und *hnRNP-Q* Gene zu erfahren. Es wird für die spätere Herstellung einer sogenannten Knockout-Maus wichtig sein, die Intron/Exon-Struktur der beiden Gene zu kennen und zu wissen, ob es *hnRNP-R* und *hnRNP-Q* Pseudogene gibt.

### 5.5.2. Durchsuchen einer BAC-Bibliothek

Um BACs zu finden, auf denen sich genomische Sequenzen eines der beiden Gene befinden, wurden als erste jeweils zwei BAC-Filtersätze mit einer radioaktiven Probe der gesamten cDNA von hnRNP-R oder hnRNP-Q getestet. Es wurden für hnRNP-R 35 solche Klone gefunden und für hnRNP-Q 25 (siehe Tabelle 4.1.14.1.). Diese Klone wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI für hnRNP-R und XbaI für hnRNP-Q verdaut und es wurden Southernblots hergestellt. Diese wurden mit Sonden – welche die gesamte cDNA von hnRNP-RR und hnRNP-Q enthielten – hybridisiert, um abzuschätzen, ob sich die gesamte kodierende Region der Gene auf einem Fragment findet oder auf mehreren. Außerdem wurde dadurch getestet, ob sich verschiedene Bandenmuster ergeben, was auf das Vorkommen von Gen-Duplikationen oder Pseudogenen hindeutet. Für hnRNP-R konnten die BACs in drei Gruppen eingeteilt werden. Dieses weist auf das Vorhandensein von zwei Pseudogenen hin. Eine Gruppe wies fünf Banden auf, die beiden anderen jeweils nur eine (Abbildung 5.5.1.A). Für hnRNP-Q fand sich nur eine Gruppe mit je einer Bande (Abbildung 5.5.1.B).

### 5.5.3 Zusammenfassung

Diese Untersuchungen liefern erste Hinweise darauf, dass es für hnRNP-R zwei Pseudogene gibt, für hnRNP-Q jedoch nicht. Außerdem scheint das murine hnRNP-R, wie auch das humane, eine komplexe Intron/Exon-Struktur zu haben.



**Abbildung 5.5.1:** Analyse der genomischen Regionen von *hnRNP-R* und *hnRNP-Q* Southernblots von EcoRI- (*hnRNP-R*) und XbaI- (*hnRNP-Q*) verdauten BAC-Klonen wurden mit der radioaktiv markierten cDNA von *hnRNP-R* (**A**) oder *hnRNP-Q* (**B**) geprobt.

Im Falle von *hnRNP-R* ergaben sich drei verschiedene Bandenmuster, welche exemplarisch in (**A**) dargestellt sind. Die geschätzte Kilobasenanzahl der jeweiligen Banden beträgt für Gruppe 1: 1,9 kB; 3,6 kB; 5,7 kB; 8 kB und 2 kB; Gruppe 2: 6 kB; Gruppe 3: 12 kB. Für *hnRNP-Q* wurde nur eine Sorte BAC-Klone gefunden. Die Bande ist etwa 13 Kilobasen groß. Ein Beispiel hierfür findet sich in (**B**).

## 5.6. Analyse der genomischen Regionen von *hnRNP-R* und *hnRNP-Q* bei SMA-Patienten ohne Mutation im *SMN*-Gen

### 5.6.1. Zielsetzung

Nur 95% aller SMA-Patienten tragen eine Mutation im *Smn*-Gen (Rudnik-Schöneborn et al., 1996). Da bei diesen Patienten ein anderer genetischer Defekt vorliegen muss und hnRNP-R und –Q mit Smn interagieren, könnte es sein, dass einige von ihnen eine Mutation in einem der beiden hnRNPs aufweisen. Ein wie in SMA-Patienten mutiertes Smn kann nicht an hnRNP-R oder –Q binden. Daher ist es möglich, dass eine Mutation, die diese Bindung von Seiten des hnRNPs verhindert, denselben Phänotyp hervorrufen könnte.

### 5.6.2 Im menschlichen *hnRNP-R-*Gen gibt es Polymorphismen

Um zu sehen, ob auch eine Mutation in *hnRNP-R* oder *hnRNP-Q* zur SMA führen kann, wurde die genomische DANN von 15 Patienten, welche sowohl ein intaktes *SMN* Gen als auch ein intaktes Gen für *IGHMBP2* aufwiesen, untersucht. Es wurden sämtliche Exone von *hnRNP-R* und -Q einschließlich der angrenzenden Intronsequenzen, welche für ein korrektes Spleißen notwendig sind, sequenziert. Für *hnRNP-R* konnte ein Polymorphismus im fünften Exon gefunden werden, der jedoch nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz oder einer Änderung in Spleißstellen führt. Er befindet sich stets gleichzeitig an den Positionen G557A (E185E) und G610A (Q203Q). Im Gen für *hnRNP-Q* konnte keine Veränderung gefunden werden (keine Abbildung).

Bei den untersuchten SMA-Patienten konnte keine Mutation in hnRNP-R oder hnRNP-Q gefunden werden, die im jeweiligen Protein aktiv würde. Trotzdem ist natürlich nicht auszuschließen, dass SMA durch Mutationen in hnRNP-R oder -Q verursacht werden könnte und nur bei den von mir untersuchten 15 Patienten keine solche Mutation zu finden war.

# 5.7. Die Editierung von GluR2 ist bei *Smn-/-;hSMN2*-Mäusen unverändert

### 5.7.1. Zielsetzung

HnRNP-Q wurde als Komponente des apobec-1 Editosomes identifiziert (Lau et al., 2001). Es agiert dort als Inhibitor des ApoB-mRNA-Editings (Blanc et al., 2001). Die am besten bekannte mRNA, welche spezifisch im Nervensystem editiert wird, ist die des AMPA-Rezeptors Untereinheit GluR-B/ GluR2. Durch ihre Editierung wird die Calciumpermeabilität des Rezeptors beeinflusst (Higuchi et al., 2000). Eine weitere Interaktion von SMN mit dem Glutamatrezeptor des N-methyl-D-aspartate (NMDA) Untertyps wurde von Andreassi *et al.*, 2002 aufgezeigt. Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erhöht die Menge an SMN in primären Neuronen (Andreassi et al., 2002). Es bestand also die Möglichkeit, dass diese Editierung durch eine gestörte Interaktion von Smn und hnRNP-Q in Smn-defizienten Mäusen nicht richtig vollzogen werden kann.

### 5.7.2. Die GluR2-mRNA in Smn-/-;SMN2-Mäusen entspricht der des Wildtyps

Um zu testen, ob in *Smn -/-; SMN2* Mäusen die Editierung dieser GluR2-mRNA gestört ist, wurde RT-PCR mit RNAs aus Hirnen am ersten Tag nach der Geburt, dem zwölften und elften Embryonaltag durchgeführt (Tabelle 5.7.1.).

|                | Smn-/-;SMN2  | Smn+/+;SMN2 (Wildtyp) |
|----------------|--------------|-----------------------|
| Postnataltag 1 | Adenin       | Adenin                |
| Embronaltag 12 | Adenin       | Adenin                |
| Embronaltag 11 | Adenin       | Adenin                |
| Embronaltag 10 | keine Angabe | keine Angabe          |

Tabelle 5.7.1: Auf GluR2-Editierung untersuchte Stadien und GenotypenDie Tabelle zeigt die untersuchten Stadien und Genotypen und gibt an, ob an der Q/R-Editierungsstelle ein Adenin oder Inosin liegt.

Es wurden Primer aus der kodierenden Region des GluR2 verwendet, welche zu beiden Seiten der Q/R-Editierungsstelle lagen (Carlson et al., 2000). Anschließend wurden die PCR-Produkte mit den 3'->5'-Primer (antisenseprimer) sequenziert, um zu sehen, ob Adenin zu Inosin editiert wurde. Inosin würde anders als Adenin, welches nur mit Uracil (bzw. Thymin) paart auch mit Adenin oder Cytosin paaren. In allen untersuchten Entwicklungsstadien war das nicht der Fall und es war in der Sequenz stets eindeutig ein T für den reinen Adeningegenspieler Thymin zu lesen (Abbildung 5.7.1.). Die Inhibition der Editierung ist also durch die geringere Menge an SMN nicht gestört worden. Eine Untersuchung am zehnten Embryonaltag war wegen maternaler Kontamination der Genotypisierungs-PCR leider nicht möglich.



Abbildung 5.7.1.: Q/R-Editierungsstelle in Smn-/-;SMN2-Mäusen Zu sehen ist ein Abschnitt der RT-PCR-Sequenz der Umgebung der Q/R-Editierungsstelle des GluR2. Mit Pfeil markiert ist die Editierungsstelle, welche entsprechend dem Adenin der Sequenz, wie beim Wildtyp ein Thymidin zeigt. Diese Sequenz wurde von einem 12 Tage alten Embryo angefertigt.

## 5.8. Die Morphologie kultivierter Motoneurone von Smn-defizienten Mäusen ist verändert

### 5.8.1. Zielsetzung

Es ist bekannt, dass die Motoneurone in SMA-Patienten und auch im Mausmodell zuerst auswachsen und dann mit Eintritt der Erkrankung degenerieren. Das Ziel der folgenden Experimente war es Hinweise darauf zu bekommen, ob sich diese Smn-defizienten embryonalen Motoneurone bezüglich ihres Überlebens oder ihrer Morphologie von denen wildtypischer Mäuse unterscheiden und wenn ja: wodurch. Hierzu wurden aus Mauslinien mit verschieden starken Smn-Defizienzen und von Sip-1/Gemin-2-defizienten Mäusen Embryonen am vierzehnten Embryonaltag verwendet.

### 5.8.2. Die Überlebensrate der kultivierten Motoneurone ist bei SMN-defizienten Mäusen nicht verändert.

Am vierzehnten Embryonaltag wurden Motoneuronkulturen angelegt. Es wurden sechs verschiedene Genotypen analysiert: Aus Verkreuzungen von Smn+/- (Schrank et al., 1997) X Gemin2+/- (Jablonka et al., 2002) die Genotypen Smn+/+;Gemin2+/+ (Wildtyp), Smn+/-;Gemin2+/+ (Smn+/-), Smn+/+;Gemin2+/- (Gemin2+/-), Smn+/-;Gemin2+/- (Smn+/-;Gemin2+/-) und aus Verkreuzungen von Smn+/-;SMN2 X Smn+/-;SMN2 (Monani et al., 2000) die Genotypen Smn+/+;SMN2 und Smn-/-;SMN2. (Abbildung 5.8.1.) Die kultivierten Motoneurone aller sechs Genotypen zeigten in An- und Abwesenheit der neurotrophen Faktoren CNTF und BDNF die gleichen Überlebensraten (Abbildung 5.8.2.).

### Aufgangslinien :

### Abbildung 5.8.1.: verwendete Mauslinien

Verkreuzungen von *Smn+/-;SMN2* X *Smn+/-;SMN2* (lila; (Monani et al., 2000)) ergeben die Genotypen *Smn+/+;SMN2* (grau) und *Smn-/-;SMN2* (rot) und Verkreuzungen von *Smn+/-* (gelb; (Schrank et al., 1997)) *X Gemin2+/-* (blau;(Jablonka et al., 2001)) die Genotypen *Smn+/+;Gemin2+/+* (schwarz; Wildtyp), *Smn+/-;Gemin2+/+* (gelb; Smn+/-), *Smn+/+;Gemin2+/-*(blau; Gemin2+/-), *Smn+/-;Gemin2+/-* (grün; Smn+/-;Gemin2+/-)




#### Abbildung 5.8.2.: Überlebenskurve

Gezeigt sind die Überlebenskurven alles sechs analysierten Motoneuronengenotypen, ohne neurotrophe Faktoren (ohne Faktor, leere Kreise) und mit Zugabe von CNTF und BDNF zur Kultur (mit Faktor, gefüllte Kreise). Die beiden wildtypischen Genotypen sind in grau und schwarz, die genetisch manipulierten farbig dargestellt (siehe auch Legende Abbildung 5.8.1.). Die Überlebenskurven unterscheiden sich in diesen sieben Tagen zwischen den Genotypen nicht. Am siebten Tag haben mit Faktor etwa 70% der Neurone überlebt, ohne jedoch nur etwa 12%. Alle weiteren Untersuchungen und Abbildungen unter 5.8. beziehen sich auf den siebten Kulturtag mit Zugabe von CNTF und BDNF.

#### 5.8.3. In Smn-defizienten Mäusen ist die Zahl der "unpolaren" Motoneurone erhöht

In Motoneuronenkulturen finden sich neben Motoneuronen mit einem deutlich von den Dendriten unterscheidbaren Axon auch solche, bei denen diese Unterscheidung nicht möglich ist. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sich auch nach einer Doppelfärbung gegen Map-2 und Phospho-tau nicht ausmachen lässt, bei welchem Neuriten es sich um das Axon handelt. Erstere werden im Folgenden als "polare" Motoneurone bezeichnet, solche, bei denen man nicht zwischen Axon und Dendriten unterscheiden kann, als "unpolare" (Abbildung 5.8.3.).



Genotyps Smn-/-;SMN2 auftreten.

In Kulturen von wildtypischen Motoneuronen und beim Genotyp *Smn+/+;SMN2* finden sich etwa 10% solche "unpolare" Motoneurone. Bei den anderen vier Genotypen ist der Anteil der "polaren" Motoneuronen an der Kultur statistisch signifikant reduziert. Mit Abstand am stärksten in den *Smn-/-;SMN2*-Kulturen (nach t-Test: Smn+/- p=0,0007, Gemin2+/- p=0,0120, Smn+/-;Gemin2+/- p=0,0343; *Smn-/-;SMN2* p<0,0001) (Abbildung 5.8.4.).



weniger "polare" Motoneurone als solche von wildtypischen Die Abbildung zeigt den Anteil "polarer" Motoneurone in den Kulturen. Bei Wildtyp-Motoneuronenkulturen und beim Genotyp Smn+/+;SMN2 finden sich etwa 10% "unpolare" Motoneurone. Bei den anderen vier Genotypen ist der Anteil der "polaren" Motoneuronen an der Kultur statistisch signifikant reduziert (nach t-Test: Smn+/- p=0,0007, Gemin2+/- p=0,0120, Smn+/-;Gemin2+/- p=0,0343; Smn-/-;SMN2 p<0,0001).

#### 5.8.4. In Smn-defizienten Mäusen ist die Morphologie der Motoneurone verändert

Die Axonlänge der "polaren" Motoneurone ist in den Kulturen der Genotypen Smn+/-;Gemin2+/- und Smn-/-;SMN2 reduziert (nach t-Test: Smn+/-;Gemin2+/- p=0,0119 und Smn-/-;SMN2 p=0,0091) (Abbildung 5.8.5.).



Abbildung 5.8.5.: Die Axonlängen "polarer" Smn+/-;Gemin2+/- und Smn-/-;SMN2-Motoneurone sind reduziert Bei den "polaren" Zellen unterscheiden sich Smn+/-;Gemin2+/- und Smn-/-;SMN2 in ihrer Axonlänge vom Wildtyp (nach t-Test: Smn+/-;Gemin2+/- p=0,0119; Smn-/-;SMN2 p=0,0091). Die Längen der Smn+/- und der Sip-1/Gemin-2+/- Axone sind nicht signifikant kürzer, als die des Wildtypes.

Innerhalb der Gruppe der "polaren" Motoneurone finden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Dendritenlänge (Abbildung 5.8.6.).



#### Abbildung 5.8.6.: Die Dendritenlängen sind nicht unterschiedlich Die Dendritenlängen aller sechs Genotypen unterscheiden sich nicht signifikant von denen bei wildtypischen Motoneuronenkulturen und beim Genotyp Smn+/+;SMN2

Betrachtet man die Gesamtlänge aller Neuriten in "unpolaren" Motoneuronen, so finden sich beim Genotyp *Smn-/-;SMN2* signifikant kürzere Neuriten (nach t-Test p<0,0001). Diese Tendenz lässt sich auch bei den Genotypen Smn+/-, Gemin2+/- und Smn+/-;Gemin2+/beobachten. Sie ist dort allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 5.8.7.). Auch bei den "unpolaren" *Smn-/-;SMN2*-Motoneuronen finden sich wieder solche mit nicht wildtypischem Aussehen (Abbildung 5.8.3.D-F). Dieses zeigt, dass die Morphologie von Motoneuronen, welche zu wenig Smn Protein enthalten, bereits vor dem Auftreten eines Phänotyps der Mäuse verändert ist.



## Abbildung 5.8.7.: Die Neuritengesamtlänge unpolarer Motoneurone des Genotyps *Smn-/-;SMN2* ist reduziert

Die Gesamtlänge aller Neuriten bei unpolaren Motoneuronen ist nur beim Genotyp *Smn-/-;SMN2* signifikant reduziert (nach t-Test p<0,0001).

#### 5.8.5. Zusammenfassung

Motoneuronenkulturen von allen sechs verwendeten Mauslinien zeigten sowohl die gleichen Überlebensraten, als auch die gleichen Dendritenlängen. Alle *Smn*-defizienten Mauslinien unterschieden sich allerdings vom Wildtyp im Anteil der "unpolaren" Neurone an der Kultur, wobei nur beim Genotyp *Smn-/-;SMN2* auch die Neuritengesamtlänge der "unpolaren" Motoneurone reduziert war. Die Axonlängen waren bei diesem und beim Genotyp Smn+/-; Gemin2+/- signifikant reduziert. Die Veränderungen betreffen also hauptsächlich den einzigen Genotyp der bei den Mäusen einen deutlich sichtbaren Krankheitsphänotyp hervorruft: Smn-/-;SMN2.

## 5.9. Überexpression von hnRNP-R und hnRNP-Q in Nervenzellen führt zu vermehrtem Neuritenwachstum

#### 5.9.1. Zielsetzung

Da also Smn an der Ausbildung der Morphologie von Nervenzellen teilhat, war es interessant zu erfahren, ob auch hnRNP-R und hnRNP-Q das Neuritenwachstum beeinflussen. Da es, anders als für Smn für diese beiden Gene noch keine Knockout Mäuse gibt, wurde ein anderes System zur Erforschung des Auswachsens von Neuriten gewählt. PC12-Zellen wachsen, wenn sie mit NGF behandelt werden, Neuriten aus. Bringt man nun, via Expressions-Plasmid, ein Gen in diese Zellen ein, so kann man dessen Einfluss auf das Neuritenwachstum beobachten.

# 5.9.2. Die Überexpression von hnRNP-R und -Q in PC12-Zellen führt zu vermehrtem Neuritenwachstum

Die hnRNP-R und -Q cDNAs in pcDNA3 (Abbildung 5.9.1.A) und pcDNA3 als Kontrolle wurden stabil in PC12-Zellen transfiziert (Abbildung 5.9.2.).



#### Abbildung 5.9.1.: Konstrukte zur Herstellung stabiler Zelllinien

Beispielhaft für beide hnRNPs ist hier die in pcDNA3 klonierte hnRNP-R Genstruktur gezeigt. (A) zeigt das komplette hnRNP-R Gen mit den beiden RNA recognition motifs (RRM1 und 2) dem putativen RRM3 und der RGG-Domäne, an welche Smn bindet. (B) zeigt das RRM1 und 2deletierte Konstrukt RRRM, in welchem die zwei funktionsfähigen RRMs fehlen. Das Produkt dieses Konstruktes sollte also nicht in der Lage sein, RNA zu binden.

Die so entstandenen Zelllinien und untransfizierte PC12-Zellen wurden sieben Tage lang mit

NGF differenziert und dann mit einem polyklonalen Antikörper gegen Phospho-tau gefärbt.



#### Abbildung 5.9.2.: Differenzierte PC12-Zelllinien

Die Abbildung zeigt beispielhaft einige Zellen einer verwendeten PC12-Zelllinie. Die Zellen wurden angefärbt mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phospho-tau. Deutlich zu sehen ist, dass in den beiden Zelllinien ohne Überexpression von hnRNPs (oben) die Neuriten wesentlich kürzer sind als in denen, die mit hnRNP-R oder –Q transfiziert wurden.

An diesen Färbungen wurden die Längen der Neuriten gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass diejenigen Zellen, welche mit der cDNA von hnRNP-R oder –Q transfiziert worden waren, signifikant längere Neuriten ausbilden (Abbildung 5.9.3) und eine größere Neuritengesamtlänge haben (Abbildung 5.9.4) als jene, die nur mit pcDNA3 oder gar nicht transfiziert wurden. Die Anzahl der Neuriten ist dabei unverändert (Abbildung 5.9.5.).



#### Abbildung 5.9.3.: Länge des längsten Neuriten der PC12-Linien

Die Abbildung zeigt die Neuritenlängen des jeweils längsten Neuriten an PC12-Zellen und stabilen Zelllinien nach Transfektion mit pcDNA3 und mit pcDNA3 mit der cDNA von hnRNP-R oder –Q, sowie der Linien QRRM und RRRM (pcDNA3 mit der cDNA von hnRNP-R oder –Q mit deletierten RRM-Domänen). Die längsten Neuriten sind in den stabilen Linien mit hnRNP-Wildtyp-cDNA und der Linie QRRM signifikant länger, als in den beiden Kontrolllinien (nach t-Test p=0,0010).

#### 5.9.3. hnRNP-R benötigt seine RNA-Bindestellen um das Neuritenwachstum zu fördern

Um zu sehen, ob dieser Effekt das Vorhandensein der beiden intakten RNA recognition motifs (RRM, Rossoll und Kröning et al., 2002) erfordert, wurden PC12-Zellen mit hnRNP-R oder –Q cDNAs ohne die beiden RRMs (RRRM und QRRM) stabil transfiziert (Abbildung

5.9.1.B). Auch diese Zelllinien wurden sieben Tage lang mit NGF differenziert, mit dem Antikörper gegen Phospho-tau gefärbt (Abbildung 5.9.6.) und dann vermessen. Hierbei zeigte sich, dass die Transfektion des QRRM-Plasmides zu einem gesteigerten Auswachsen der Neuriten, wie bei Transfektion mit Wildtyp-Plasmid führte, das Einbringen von RRRM-Plasmid jedoch im Vergleich zu pcDNA3-Transfektion keine Veränderung brachte (Abbildung 5.9.2.-4.). Die Neuritenzahl war in beiden Fällen nicht verändert.



#### Abbildung 5.9.4.: Neuritengesamtlängen der PC12-Linien

Die Abbildung zeigt die Neuritengesamtlängen an PC12-Zellen und stabilen Zelllinien nach Transfektion mit pcDNA3 und mit pcDNA3 mit der cDNA von hnRNP-R oder –Q, sowie der Linien QRRM und RRRM (pcDNA3 mit der cDNA von hnRNP-R oder –Q mit deletierten RRM-Domänen). Die Neuritengesamtlängen sind in den stabilen Linien mit hnRNP-Wildtyp-cDNA und der Linie QRRM signifikant länger, als in den beiden Kontrolllinien (nach T-Test p<0,0001).



#### Abbildung 5.9.5.: Neuritenanzahl der PC12-Linien

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Zählung der Neuritenanzahl an allen sechs PC12-Zelllinien. Die durchschnittliche Anzahl an Neuriten unterscheidet sich zwischen den Zelllinien nicht.

#### 5.9.4. Zusammenfassung

hnRNP-R und hnRNP-Q fördern in PC12-Zellen das durch NGF induzierte Auswachsen der Neuriten. HnRNP-Q vermag dieses auch ohne RNA-Bindedomäne zu tun, hnRNP-R jedoch nicht.



#### Abbildung 5.9.6.: Differenzierte RRM-Zelllinien

Die Abbildung zeigt beispielhaft einige Zellen der beiden RRM-Zelllinien. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Phospho-tau angefärbt. Deutlich ist zu sehen, dass in den Zellen mit hnRNP-Q-Überexpression die Neuriten wesentlich länger sind, als in denen, die mit hnRNP-R transfiziert wurden.

#### 6. DISKUSSION

Durch vorangegangene genetische Studien ist es gesichert, dass Mutationen oder Deletionen im SMN1 Gen in der überwiegend größten Zahl der Fälle die primäre Ursache für die SMA sind (zusammengefasst in Jablonka und Sendtner, 2003). Trotzdem bleibt unklar, warum eine Reduktion der Menge an funktionellem Smn Protein zu einer spezifischen Degeneration der Motoneurone führt. Da der Krankheitsphänotyp erst postnatal auftritt, wird es sich vermutlich nicht um einen frühen Entwicklungsdefekt handeln. Neben anderen Möglichkeiten könnte Smn zusätzlich zu seiner Rolle beim Spleißen und der transkriptonellen Regulation andere motoneuronenspezifische Aktivitäten haben, die in anderen Zelltypen nicht so wichtig sind. Diese Aktivitäten könnten im Smn Protein selbst liegen, oder an der Interaktion mit anderen Proteinen, die dann ihrerseits wichtige funktionelle Rollen in Motoneuronen spielen. Interessanterweise ist Smn nicht nur in nuklearen Strukturen der Motoneurone zu finden, sondern auch im Zytoplasma und speziell in den Axonen (Jablonka et al., 2000; Pagliardini et al., 2000; Jablonka et al., 2001). Da Motoneurone sehr lange Zellen mit einem sehr polarisierten Axon sind, ist eine naheliegende Vermutung, dass Probleme innerhalb der Transportprozesse dieses Neuriten auftreten. Dies könnte erklären, warum gerade die Motoneurone so stark betroffen sind. Deshalb konzentriert sich diese Arbeit auf neue Interaktionspartner, die mit Smn in den Axonen der spinalen Motoneurone kolokalisieren.

#### 6.1. hnRNP-R und hnRNP-Q interagieren nur mit intaktem Smn

Von Wilfried Rossoll wurden mittels des Yeast-Two-Hybrid Systems zwei Smn-bindende Proteine aus der Familie der hnRNP Proteine gefunden: hnRNP-R und hnRNP-Q interagieren mit Smn nicht nur im Yeast-Two-Hybrid System sondern auch in der Koimmunpräzipitation. Diese Interaktion lässt sich nur für wildtypisches Smn Protein feststellen, jedoch nicht für mutierte Smn Proteine, die den in humanen SMA-Patienten gefundenen Mutationen E134K, S262I, T274I, Y272C, G279V, dexon7, dexon5, dexon5 und 7 entsprechen (Lefebvre et al., 1995; Rodrigues et al., 1995; Bussaglia et al., 1995; DiDonato et al., 1997; Hahnen et al., 1997; Talbot et al., 1997; Wirth et al., 1999) oder Smn Proteinen ohne die Region, welche von Exon 5 und/oder 7 kodiert werden, entsprechen. hnRNP-R und -Q verhalten sich also in dieser Hinsicht wie andere Smn-Partner, wie zum Beispiel die Sm Proteine oder RHA (Lorson et al., 1998; Buhler et al., 1999; Pellizzoni et al., 1999; Pellizzoni et al., 2001), die ebenfalls nicht an mutierte oder trunkierte Smn Proteine binden. Im C-terminalen Teil von hnRNP-R und –Q befindet sich eine Arginin-Glyzin-reiche Region, welche dem RGG Motiv in anderen Smn-bindenden Proteinen entspricht (Friesen et al., 2000). In dieser Domäne findet sich die Smn Interaktionsstelle (Mourelatos et al., 2001). Es wird interessant sein zu sehen, ob posttranslationale Methylierung der Arginine für eine gute Bindung an Smn nötig ist, wie das für SmD1 und SmD3 gezeigt wurde (Friesen et al., 2000). Die Bindung an hnRNP-Q koppelt SMN vermutlich an die RNA-Polymerase II (Carty et al., 2002). Diese Bindung wird also durch die in Patienten gefundenen Mutationen in SMN ebenfalls zerstört. Ob auch diese fehlende Verbindung zum Entstehen der Krankheit beiträgt ist noch ungeklärt. Es ist nicht ganz eindeutig, ob hnRNP-R wirklich direkt an Smn bindet. Die Daten von Mourelatos, 2001 besagen, dass dem nicht so ist, jedoch zeigen sowohl die hier vorgestellten Ergebnisse (Rossoll und Kröning et al., 2002), als auch die von Carty und Greenleaf, 2002 ein direkte Interaktion in der Koimmunpräzipitation. Vorstellbar wäre eine Bindung von hnRNP-R an Smn nicht direkt, sondern zum Beispiel über hnRNP-O1 (Mourelatos et al., 2001). Gegen diese Möglichkeit spricht, dass eine Bindung von hnRNP-R an Smn im Yeast-Two-Hybrid System festgestellt wurde (Rossoll und Kröning et al., 2002) und es in Hefe kein Homolog zu hnRNP-Q gibt, das als Brücke hätte fungieren können.

Beide Proteine haben außerdem zwei RRM Domänen, welche zuvor als RNA Interaktionsmotive identifiziert wurden (zusammengefasst in (Shamoo et al., 1995), und eine dritte putative RRM Domäne. Eine RNA-Bindung konnte sowohl für hnRNP-R (Rossoll und Kröning et al., 2002) als auch für hnRNP-Q (Mourelatos et al., 2001) nachgewiesen werden.

#### 6.2. Die Expression von hnRNP-R und hnRNP-Q

Beide hnRNP Proteine werden, wie das Smn Protein ubiquitär in verschiedenen adulten Geweben exprimiert. Natürlich findet sich auch ihre mRNA in all diesen Geweben. Beide Proteine werden im Rückenmark dem Entwicklungsstadium der Maus entsprechend reguliert. Interessanterweise zeigen beide die stärkste Expression um den neunzehnten Embryonaltag. In dieser Phase der Entwicklung ist das Axonwachstum der Maus am stärksten. Es findet sich also schon bei der schlichten Betrachtung der Proteinexpression ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen hnRNP-R und –Q und Axonwachstum. Auf mRNA-Ebene findet sich diese entwicklungsstadiumsabhängige Regulation nicht. Die Regulation der Proteinmenge muss also posttranskriptionell erfolgen.

#### 6.3. hnRNP-R und Smn kolokalisieren in Motoraxonen

Als erster Schritt zur physiologischen Charakterisierung von hnRNP-R und hnRNP-Q wurden ihre Expressionsmuster in Bezug auf Entwicklung und Gewebe untersucht und festgestellt, dass beide sowohl auf der mRNA-, als auch auf Proteinebene weitgehend weiträumig exprimiert werden. Die höchste Expression von hnRNP-R und –Q während der Entwicklung des Rückenmarkes fand sich während der späten Embryogenese, um den neunzehnten Embryonaltag. Interessanterweise scheint diese Reduktion der hnRNP-R und –Q Proteinlevel nach der Geburt durch posttranskriptionale und/oder posttranslationale Mechanismen bedingt zu sein, wie das auch schon vorher für SIP-1/Gemin2 beobachtet wurde (Jablonka et al., 2001). Dieses legt nahe, dass die Interaktion mit Smn die Stabilität der interagierenden Proteine kontrollieren könnte. hnRNP-R kolokalisiert mit Smn im Zytoplasma von Motoneuronen, auch im Axon. Es wurde im Zytoplasma und in Axonen von Motoneuronen durch Kofärbung mit PC1C6 phospho-tau-1 Antikörpern nachgewiesen. Das Färben anderer peripherer Nerven bestätigte die Präsenz von relativ großen Mengen an hnRNP-R in Motoraxonen. hnRNP-R wurde auch im Zellkern gefunden, jedoch ist es nicht in Gems konzentriert. Obwohl sowohl hnRNP-R, als auch -Q im Zusammenhang mit dem Spleißeosom identifiziert worden sind (Rappsilber et al., 2002), bleibt es weiterhin unklar, ob hnRNP-R ein Bestandteil jenes Komplexes ist, in dem Smn spezifische Funktionen beim premRNA Spleißen und der Regeneration des spleißeosomalen Komplexes ausübt (Pellizzoni et al., 1999).

#### 6.4. Die genomischen Regionen von hnRNP-R und hnRNP-Q

Die Untersuchungen zur genomischen murinen Struktur von hnRNP-R und -Q liefern erste Hinweise darauf, dass es für hnRNP-R 2 Pseudogene gibt, für hnRNP-Q jedoch nicht. Dieses wird für die zukünftige Herstellung von Knockout-Mäusen wichtig sein.

Die Suche nach hnRNP-R und -Q Mutationen bei SMA-Patienten führte zu keiner Veränderung, die die Struktur oder Funktion der Proteine, auch nicht beim Spleißen verändern würden. Es konnte lediglich eine stille Mutation (Polymorphismus) im hnRNP-R Gen gefunden werden. Trotzdem ist natürlich nicht auszuschließen, dass Mutationen in

*hnRNP-R* oder -Q SMA verursachen können und nur bei den von mir untersuchten Patienten keine solchen Mutationen zu finden waren.

#### 6.5. Editierung in Smn-defizienten Mäusen

Da hnRNP-Q an der Inhibition der Editierung beteiligt ist (Blanc et al., 2001; Lau et al., 1997) und die GluR2-mRNA in Mäusen editiert wird, wurde untersucht, ob es in Smn-defizienten Mäusen auch zu einer gestörten Editierung des GluR2 kommt. In allen untersuchten Stadien konnte allerdings keine Änderung der Editierung im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden. Es scheint also kein direkter Zusammenhang zwischen einer geringen Smn-Menge in Zellen und der GluR2-Editierung zu bestehen. So sind also auch Störungen der Zusammensetzung und Funktion von AMPA-Rezeptoren nicht für den Krankheitsphänotyp verantwortlich.

#### 6.6. Smn-defiziente Motoneurone haben eine veränderte Morphologie

Ist in Motoneuronen zuwenig Smn vorhanden, ändert sich deren Morphologie. Viele zeigen Defiziente beim gezielten "polaren" Auswachsen. Bei Änderungen der spontanen Kalziummenge unterscheiden sich Wachstumskegel und Axone, jedoch nicht die Zellkörper Smn defizienter Motoneurone von wildtypischen. Es sind hiervon nur die schnellen Reaktionen betroffen, jedoch nicht die langsamen Wellen. Außerdem sind Dauer und Amplitude des Anstiegs der Calciummenge in Smn-defizienten Motoneuronen ebenfalls erhöht, was darauf hinweist, dass das Öffnen der voltage gated calcium channels (VGCC) in

den Mutanten verzögert ist (persönliche Mitteilung Marcus Beck). Einen weiteren Hinweis auf eine gestörte Motoneuronmorphologie geben Mäuse mit einer homozygoten Deletion des siebten Smn Exons in Neuronen. In ihren synaptischen Endungen finden sich Veränderungen des Zytoskelettes (Cifuentes-Diaz et al., 2002). SMN wurde in den Wachstumskegel und filopodienartigen Strukturen in Nerven- und Gliazellen gefunden (Fan und Simard, 2002). Hierzu liegen allerdings nur Experimente mit Wildtyp-SMN vor, sodass offen bleibt, ob sich Mutationen oder Deletionen in SMN auf dessen Aktivitäten in den Wachstumskegeln auswirken. All dieses weist auf einen Defekt der Smn-defizienten Motoneurone hin, und zwar nicht beim Überleben, sondern beim korrekten Auswachsen der Axone. Es ist also wahrscheinlich, dass die Motoneurone mit reduziertem Smn-Gehalt erst sekundär am Funktionsverlust sterben. Auch bei SMA-Patienten wachsen die Axone der Motoneurone erst aus und gehen dann später wieder verloren, wenn die Kinder bereits geboren sind und die Motoneurone Kontakt mit den Muskeln aufgenommen haben.

#### 6.7. hnRNP-R und hnRNP-Q fördern das Neuritenwachstum

Sowohl hnRNP-R als auch –Q fördern das Neuritenwachstum in kultivierten Nervenzellen. Die Deletion der RNA-Bindestellen in hnRNP-R beeinflusst diesen Effekt nicht, jedoch stellt dieselbe Deletion in hnRNP-Q den Effekt komplett ab. Das lässt vermuten, dass – wie bereits unter 6.1. diskutiert (Mourelatos et al., 2001) – hnRNP-R, im Gegensatz zu –Q, nicht direkt an Smn bindet und nur über hnRNP-Q mit Smn verbunden ist. Eine Aufhebung der Bindung zwischen hnRNP-Q und Smn würde zu einem Verlust der Interaktion beider hnRNPs mit Smn führen, wohingegen hnRNP-R auch für diesen Effekt nicht direkt an Smn gebunden sein muss. Es könnte zum Beispiel über die RNA-Polymerase II PCTD (Carty et al., 2002) mit Smn verbunden bleiben (Abbildung 6.1.1.).

## 6.8. Funktionen von hnRNP-R und hnRNP-Q im RNA-Metabolismus und -Transport

hnRNP-O wurde ursprünglich als glycine-arginine-tyrosine-rich putative RNA binding protein entdeckt (Blanc et al., 2001) (grv-rbp; Acc.Nr. AF093821). Es ist eine alternative Spleißvariante des NSAP1 (NS1-associated protein 1), welches als Interaktionspartner eines multifunktionellen Proteins identifiziert wurde, das für die virale Replikation des "minute virus" der Maus benötigt wird (Harris et al., 1999). Außerdem wurde NSAP1 mit spezifischem mRNA-Transport in Verbindung gebracht (Harris et al., 1999). hnRNP-O/gryrbp wurde auch in Proteinkomplexen gefunden, die an translationell gekoppeltem "mRNA turnover" beteiligt sind (Grosset et al., 2000) und beim mRNA Spleißen ein Rolle spielen (Neubauer et al, 1998). Außerdem wurde hnRNP-Q auch von anderen als ein mit SMN interagierendes Protein identifiziert (Mourelatos et al., 2001). Deletion von hnRNP-O aus HeLa-Kernextrakten inhibiert das Spleißen von Kandidaten-pre-mRNAs. Also könnte die Interaktion zwischen SMN und hnRNP-O auch eine Rolle beim pre-mRNA Spleißen spielen (Mourelatos et al., 2001). Eine alternative Spleißvariante von hnRNP-Q wurde als Synaptotagmin-binding protein SYNCRIP beschrieben (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein; (Mizutani et al., 2000), was eine mögliche Rolle im organellenbasierten mRNA-Transport entlang des Zytoskelettes aufzeigt. Diese kürzeren Isoformen von hnRNP-Q enthalten nicht den Glutamin- und Asparagin-reichen C-Terminus, der sich in hnRNP-R und hnRNP-Q der vollen Länge findet. Kürzlich wurde gezeigt, dass das hnRNP-Q Protein ein Bestandteil des apobec-1 Editosomes ist (Blanc et al., 2001; Lau et al., 2001). All diese Daten deuten darauf hin, dass hnRNP-R und -Q spezifisch mRNAs binden, die in mRNA-Verarbeitung einschließlich der Editierung und mRNA-Transport und außerdem als Regulatoren wirken könnten, die die Bindung an Ribosome und die RNA-

Translation modifizieren. Solche Funktionen scheinen sehr wichtig für Neurone mit langen Fortsätzen zu sein, im Besonderen für Motoneurone, in denen spezifische mRNAs über große Distanzen transportiert werden müssen. Die Länge eines Motoraxons kann das 5000fache des Durchmessers eines Zellkörpers betragen, was die Wichtigkeit eines Kontrollmechanismusses für den mRNA-Transport zu weit entfernten Teilen der Zelle, wie Wachstumskegeln oder Motorendplatten unterstreicht (Gallant, 2002; Mohr und Richter, 1993). Tatsächlich finden sich sowohl Smn, als auch hnRNP-R konzentriert und kolokalisiert im distalen Axon von isolierten embryonalen Motoneuronen. Diese Erkenntnis stimmt auch mit früheren überein, die besagen, dass das Smn Protein sich unabhängig von Gemin2 in Motoraxonen finden lässt (Jablonka et al., 2001). Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass Smn mit den Mikrotubuli der Motoraxone während der postnatalen Entwicklung assoziiert ist (Pagliardini et al., 2001). Bei vielen Motoneuronenerkrankungen zeigt sich ein reduziertes Axonwachstum, das zum Beispiel bei pmn-Mäusen (progressive motor neuronopathy) mit einer defekten Mikrotubulianordnung verursacht durch eine Mutation des Tbce (tubulinspecific chaperone E)-Genes (Bömmel et al., 2002; Martin et al., 2002) einhergeht, oder mit Störungen im axonalen Transport, wie im Falle des KIF1a (kinesin superfamily protein 1a) begleiteten Transports (Yonekawa et al., 1998). Auch die mRNA des β-Aktins findet sich in den Wachstumskegeln der Axone (Bassell et al., 1998). Wie sich im Folgenden herausstellte, ist ein Komplex aus hnRNP-R und Smn an der Lokalisation dieser mRNA in den Axonen beteiligt. Ein Komplex aus Smn und hnRNP-R oder auch hnRNP-Q/SYNCRIP könnte den mRNA-Transport zum Beispiel entlang der Mikrotubuli modulieren (Mizutani et al., 2000).

#### 6.9. Kurzzusammenfassung der Experimente

In der Koimmunpräzipitation binden hnRNP-R und -Q an wildtypisches Smn, jedoch nicht an trunkiertes oder mutiertes. Beide hnRNP-Genprodukte werden weitgehend ubiquitär exprimiert. Im Rückenmark der Maus ist die Expression beider Proteine im Laufe der Entwicklung reguliert und erreicht den höchsten Level am neunzehnten Embryonaltag. Das hnRNP-R Protein wird hauptsächlich in den motorischen Axonen exprimiert und, allerdings weit weniger, auch in sensorischen. Das stützt die Theorie, dass der Smn/hnRNP-R-Komplex eher in den langen motorischen als in den kurzen sensorischen Axonen – zum Beispiel für den Transport von mRNA – benötigt wird.

Die Erkenntnis, dass Smn und hnRNP-R in den Axonen der Motoneurone kolokalisieren, könnte helfen, eine mögliche motoneuronenspezifische Funktion von Smn – zum Beispiel beim axonalen Transport oder beim Editieren – zu verstehen. Am SMA-Mausmodell (Monani et al., 2000) ist das Editieren einer Kandidaten-mRNA jedoch nicht verändert, wohl aber die Morphologie der Motoneurone des Rückenmarks. Überexpression von hnRNP-R und hnRNP-Q in Nervenzellen führt zu einem vermehrten Auswachsen der Neuriten, was auf eine Funktion dieser Proteine beim Neuritenwachstum hindeutet. Weitere Forschungen über die funktionelle Beziehung zwischen Smn und hnRNPs könnten also helfen die Frage zu beantworten, warum speziell Motoneurone so empfindlich auf reduzierte Mengen des ubiquitär exprimierten SMN Proteins reagieren. Obwohl bei SMA-Patienten bisher noch keine Mutationen der *hnRNP-R* und –*Q* Gene gefunden wurden, könnte das zu einem besseren Verständnis der Mechanismen führen, die der axonalen Degeneration und dem Zelltod der Motoneurone bei SMA-Patienten zugrundeliegen.



#### 6.1.1. Modelle der Interaktionen zwischen hnRNP-R, -Q und Smn

Die Modelle zeigen zwei Vorschläge, wie die gezeigten Komponenten aneinander binden könnten. (A) und (B) unterscheiden sich lediglich dadurch, das es, wie im Text diskutiert, nicht ganz sicher ist, ob hnRNP-R indirekt (A), oder direkt (B) an Smn bindet. Da nicht klar ist, ob die Proteine des Smn-Multiproteinkomplexes in den Gems gleichzeitig mit den beiden hnRNPs an Smn binden, sind sie auf dem Bild, wie zum Beispiel auch die anderen Smn-, hnRNP-R- oder – Q-bindenden Proteine nicht enthalten. Die mRNA ist in magenta gezeigt. Die RNA-Polymerase II mit dem PCTD in grün.

### 7. ABKÜRZUNGSLISTE

A Adenin

ABBP-1 apobec-1 Binding Protein

ACF apobec-1 interacting Proteinen

**AMPA**  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionische Säure

**ApoB** Apolipoprotein B

**BDNF** Brain-derived neurotrophic factor

**bp** Basenpaare

**BSA** bovines Serumalbumin

C Cytosin

**cDNA** kodierende DNA

**CNTF** ciliary neurotrophic factor

**C-Terminus** Carboxy-Terminus

**CTP** C-terminale Domäne

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**E#** Embryonaltag #

**E.coli** Escherichia Coli

FCS fötales Kälberserum

#### FGF-2

Fibroblast Growth Factor-2

**G** Guanin

GAR glycine/arginine-rich

**gDNA** genomische DNA

Gem "gemini of coiled bodies" oder "gemini of Cajal bodies"

GFP green fluoreszent protein

**GIP1** Gemin binding protein

**GluR** Glutamatrezeptor

**gry-rbp** glycine-arginine-tyrosine-rich RNA binding protein

**HeLa** Helene Lange

hnRNP heteogenes Ribonukleoprotein

hSMN humanes SMN

∎ Inosin

**IGHMBP2** immunoglobulin m-binding protein 2

**kD** Kilodalton

**KIF1a** kinesin superfamily protein 1a

Map-2 Microtubule-Associated Protein-2

**miRNA** microRNA

#### MVM

Minute Virus der Maus

#### NASP1

NS1-associated protein 1

**NGF** Neurite growth factor

**NMDA** N-methyl-D-aspartate

**P#** Tag # nach der Geburt

PC12 Phäochromozytoma-Zellen aus der Ratte

**PCR** Polymerasekettenreaktion

**PCTD** hyperphosphorylierte, C-terminale Repeat-Domäne

**pmn** progressive motor neuronopathy

**RHA** RNA helicase A

**RIPA** Radioimmunoprecipitation

**RNA** Ribonukleinsäure

**RRM** RNA recognition motifs

SAAB Smn-associated APAR bodies

**Sip-1** Smn interacting protein 1

**Sm** Smith Antigen

SMA Spinale Muskelatrophie

**SMARD** spinal muscular atrophy with respiratory distress

SMN, Smn survival motor neuron SMNrp SMN-related protein snRNA small nuclear ribonuclicacid snRNP/ snoRNP small nuclear ribonucleoprotein SYNCRIP Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein Т Thymin Tbce tubulin-specific chaperone E TBS Tris-buffered Saline TBST Tris-buffered Saline mit Tween U Uracil VGCC voltage gated calcium channels YPD Yeast Extract/ Peptone/ Dextrose Z-Puffer gängiger Name dieses Puffers, Herkunft des "Z" unklar

#### 8. Referenzen

- 1. Aronov,S., Aranda,G., Behar,L. and Ginzburg,I. (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci.*, **21**, 6577-6587.
- 2. Almenar-Queralt, A. and Goldstein, L.S. (2001). Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport. *Curr Opin Neurobiol.*, **11**, 550-557.
- 3. Andreassi, C., Patrizi, A.L., Monani, U.R., Burghes, A.H., Brahe, C. and Eboli, M.L. (2002). Expression of the survival of motor neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Neurogenetics.*, **4**, 29-36.
- 4. Baccon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002). Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31957-31962.
- 5. Bassell,G.J., Zhang,H., Byrd,A.L., Femino,A.M., Singer,R.H., Taneja,K.L., Lifshitz,L.M., Herman,I.M. and Kosik,K.S. (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.*, **18**, 251-265.
- 6. Bertini, E., Gadisseux, J.L., Palmieri, G., Ricci, E., di Capua, M., Ferriere, G. and Lyon, G. (1989). Distal infantile spinal muscular atrophy associated with paralysis of the diaphragm: a variant of infantile spinal muscular atrophy. *Am. J. Med. Genet.*, **33**, 328-335.
- Bechade, C., Rostaing, P., Cisterni, C., Kalisch, R., La Bella, V., Pettmann, B. and Triller, A. (1999). Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci.*, 11 293-304.
- 8. Blanc, V., Navaratnam, N., Henderson, J.O., Anant, S., Kennedy, S., Jarmuz, A., Scott, J. and Davidson, N.O. (2001). Identification of GRY-RBP as an apolipoprotein B RNAbinding protein that interacts with both apobec-1 and apobec-1 complementation factor to modulate C to U editing. *J. Biol. Chem.* **276**, 10272-10283.
- 9. Bommel,H., Xie,G., Rossoll,W., Wiese,S., Jablonka,S., Boehm,T. and Sendtner,M. (2002). Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease. *J. Cell Biol.*, **159**, 563-569.
- 10. Buhler, D., Raker, V., Luhrmann, R. and Fischer, U. (1999). Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 2351-2357.
- 11. Bussaglia, E., Clermont, O., Tizzano, E., Lefebvre, S., Burglen, L., Cruaud, C., Urtizberea, J.A., Colomer, J., Munnich, A. and Baiget, M. (1995). A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat. Genet.*, **11**, 335-337.

- 12. Campbell,L., Hunter,K.M., Mohaghegh,P., Tinsley,J.M., Brasch,M.A. and Davies,K.E. (2000). Direct interaction of Smn with dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1093-1100.
- 13. Campenot, R.B. and Eng, H. (2000). Protein synthesis in axons and its possible functions. *J Neurocytol.*, **29**, 793-798.
- 14. Carlson,N.G., Howard,J., Gahring,L.C. and Rogers,S.W. (2000). RNA editing (Q/R site) and flop/flip splicing of AMPA receptor transcripts in young and old brains. *Neurobiol. Aging*, **21**, 599-606.
- 15. Carty,S.M. and Greenleaf,A.L. (2002). Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing. *Mol. Cell Proteomics.*, **1**, 598-610.
- 16. Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M. and Dreyfuss, G. (1999). 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.*, **147**, 1181-1194.
- 17. Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F.D., Lacene, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M.H. and Melki, J. (2001). Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell Biol.*, **152**, 1107-1114.
- Cifuentes-Diaz, C., Nicole, S., Velasco, M.E., Borra-Cebrian, C., Panozzo, C., Frugier, T., Millet, G., Roblot, N., Joshi, V. and Melki, J. (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1439-1447.
- 19. Claus, P., Doring, F., Gringel, S., Muller-Ostermeyer, F., Fuhlrott, J., Kraft, T. and Grothe, C. (2003). Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 479-485.
- Coovert, 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. and Burghes, A.H. (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1205-1214.
- 21. De Diego Otero,Y., Severijnen,L.A., van Cappellen,G., Schrier,M., Oostra,B. and Willemsen,R. (2002). Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol.*, **22**, 8332-8341.
- 22. DiDonato,C.J., Ingraham,S.E., Mendell,J.R., Prior,T.W., Lenard,S., Moxley,R.T., Florence,J. and Burghes,A.H. (1997). Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Ann. Neurol.*, **41**, 230-237.
- 23. DiDonato, C.J., Parks, R.J. and Kothary, R. (2003). Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum. Gene Ther.*, **14**, 179-188.

- 24. Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A. and Dreyfuss, G. (2003). Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA.*, **9**, 180-186.
- 25. Dreyfuss,G., Kim,V.N. and Kataoka,N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 195-205.
- 26. Fan,L. and Simard,L.R. (2002). Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1605-1614.
- 27. Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997). The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, **90**, 1023-1029.
- 28. Friesen, W.J. and Dreyfuss, G. (2000). Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J. Biol. Chem.* **275**, 26370-26375.
- 29. Frugier, T., Tiziano, F.D., Cifuentes-Diaz, C., Miniou, P., Roblot, N., Dierich, A., Le Meur, M. and Melki, J. (2000). Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 849-858.
- 30. Galbraith, J.A. and Gallant, P.E. (2000). Axonal transport of tubulin and actin. J *Neurocytol.*, **29**, 889-911.
- 31. Gallant, P.E. (2002). Axonal protein synthesis and transport. J. Neurocytol. 29, 779-782.
- 32. Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M. and Jockusch, H. (1999). A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37908-37914.
- 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. and Hubner,C. (2001). Mutations in the gene encoding immunoglobulin &mgr;-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat. Genet.* 29, 75-77.
- 34. Grosset, C., Chen, C.Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H. and Shyu, A.B. (2000). A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell*, **103**, 29-40.
- 35. Grundhoff,A.T., Kremmer,E., Tureci,O., Glieden,A., Gindorf,C., Atz,J., Mueller-Lantzsch,N., Schubach,W.H. and Grasser,F.A. (1999). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19136-19144.
- 36. Gu,W., Pan, F, Zhang,H., Bassell,G.J. and Singer R.H. (2002). A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol.* **156**, 41-51

- 37. Gubitz,A.K., Mourelatos,Z., Abel,L., Rappsilber,J., Mann,M. and Dreyfuss,G. (2002). Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5631-5636.
- 38. Hahnen, E., Schonling, J., Rudnik-Schöneborn, S., Raschke, H., Zerres, K. and Wirth, B. (1997). Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 821-825.
- 39. Harris, C.E., Boden, R.A. and Astell, C.R. (1999). A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.*, **73**, 72-80.
- 40. Hassfeld,W., Chan,E.K., Mathison,D.A., Portman,D., Dreyfuss,G., Steiner,G. and Tan,E.M. (1998). Molecular definition of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R) using autoimmune antibody: immunological relationship with hnRNP P. *Nucleic. Acids. Res.*, **26**, 439-445.
- 41. Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B. and Matera, A.G. (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.*, **15**, 2720-2729.
- 42. Higuchi, M., Maas, S., Single, F.N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R. and Seeburg, P.H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **406**, 78-81.
- 43. Hofmann,Y., Lorson,C.L., Stamm,S., Androphy,E.J. and Wirth,B. (2000). Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9618-9623.
- 44. Hofmann,Y. and Wirth,B. (2002). hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2037-2049.
- 45. Hsieh-Li,H.M., Chang,J.G., Jong,Y.J., Wu,M.H., Wang,N.M., Tsai,C.H. and Li,H. (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **24**, 66-70.
- 46. Jablonka, S., Schrank, B., Kralewski, M., Rossoll, W. and Sendtner, M. (2000). Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 341-346.
- Jablonka,S., Bandilla,M., Wiese,S., Buhler,D., Wirth,B., Sendtner,M. and Fischer,U. (2001). Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 497-505.
- 48. Jablonka, S. and Sendtner, M. (2003). Molecular and cellular basis of spinal muscular atrophy. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* **4**, 144-149.

- 49. Jones,K.W., Gorzynski,K., Hales,C.M., Fischer,U., Badbanchi,F., Terns,R.M. and Terns,M.P. (2001). Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J. Biol. Chem.*, **276** 38645-38651
- 50. Kandel,E.R., Schwartz,J.H. and Jessel,T.M. (1995). Essentials of Neural Science and Behavior *Appleton & Lange Verlag*
- 51. Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H. and Taneja, K.L. (1993). Isoform-specific 3'untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol.*, **123**, 165-172.
- 52. Kislauskis, E.H., Zhu, X. and Singer, R.H. (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol.* **127**, 441-451.
- 53. Kislauskis, E.H., Zhu, X. and Singer, R.H. (1997). beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol.* 136, 1263-1270.
- 54. Korinthenberg, R., Sauer, M., Ketelsen, U.P., Hanemann, C.O., Stoll, G., Graf, M., Baborie, A., Volk, B., Wirth, B., Rudnik-Schoneborn, S. and Zerres, K. (1997). Congenital axonal neuropathy caused by deletions in the spinal muscular atrophy region. *Ann. Neurol.*, **42**, 364-368.
- 55. Krecic, A.M. and Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 363-371.
- 56. Lau, P.P., Chang, B.H. and Chan, L. (2001). Two-hybrid cloning identifies an RNAbinding protein, GRY-RBP, as a component of apobec-1 editosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 977-983.
- 57. Lau, P.P., Zhu, H.J., Nakamuta, M. and Chan, L. (1997). Cloning of an Apobec-1binding protein that also interacts with apolipoprotein B mRNA and evidence for its involvement in RNA editing. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1452-1455.
- Lefebvre,S., Burglen,L., Reboullet,S., Clermont,O., Burlet,P., Viollet,L., Benichou,B., Cruaud,C., Millasseau,P., Zeviani,M. and et al (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene [see comments]. *Cell*, 80, 155-165.
- 59. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrandy, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G. and Melki, J. (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*, **16**, 265-269.
- Lefebvre,S., Burlet,P., Viollet,L., Bertrandy,S., Huber,C., Belser,C. and Munnich,A. (2002). A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 1017-1027.
- 61. Lim,S.R. and Hertel,K.J. (2001). Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45476-45483.

- 62. Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.*, **15**, 3555-3565.
- 63. Liu,Q., Fischer,U., Wang,F. and Dreyfuss,G. (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, **19**, 1013-1021.
- 64. Lorson, C.L. and Androphy, E.J. (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 259-265.
- 65. Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A.H. and Androphy, E.J. (1998). SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.*, **19**, 63-66.
- 66. Loughran, G., Pinter, K., Newell, P.C. and Gross, J.D. (2000). Identification of STKAdependent genes in Dictyostelium discoideum. *Differentiation*, **66**, 71-80.
- 67. Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **18**, 601-635.
- 68. Maniatis, T. and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, **416**, 499-506.
- 69. Martin,N., Jaubert,J., Gounon,P., Salido,E., Haase,G., Szatanik,M. and Guenet,J.L. (2002). A missense mutation in Tbce causes progressive motor neuronopathy in mice. *Nat. Genet.*, **32**, 443-447.
- 70. Matera,A.G. and Hebert,M.D. (2001). The survival motor neurons protein uses its ZPR for nuclear localization. *Nat. Cell Biol.* E93-E95.
- Meister, G., Buhler, D., Laggerbauer, B., Zobawa, M., Lottspeich, F. and Fischer, U. (2000). Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum. Mol. Genet. 2000. Aug. 12.*; 9. (13.):1977. -86., 9, 1977-1986.
- 72. Melki, J. (1997). Spinal muscular atrophy. Curr. Opin. Neurol., 10, 381-385.
- 73. Mellins,R.B., Hays,A.P., Gold,A.P., Berdon,W.E. and Bowdler,J.D. (1974). Respiratory distress as the initial manifestation of Werdnig-Hoffmann disease. *Pediatrics*, **53**, 33-40.
- 74. Miller, C.C., Ackerley, S., Brownlees, J., Grierson, A.J., Jacobsen, N.J. and Thornhill, P. (2002) Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci.*, **59**, 323-30.
- 75. Mizutani, A., Fukuda, M., Ibata, K., Shiraishi, Y. and Mikoshiba, K. (2000). SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J. Biol. Chem.* **275**, 9823-9831.
- 76. Mohr, E., Fehr, S. and Richter, D. (1991). Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo-hypophyseal tract of rats. *EMBO J.*, **10**, 2419-2424.

- 77. Mohr,E. and Richter,D. (1993). Dendritic and axonal mRNA trafficking. *Regul. Pept.*, **45**, 21-24.
- 78. Mohr,E. and Richter,D. (2001). Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *Int J Biochem Cell Biol.*, **33**, 669-679.
- Monani,U.R., Pastore,M.T., Gavrilina,T.O., Jablonka,S., Le,T.T., Andreassi,C., DiCocco,J.M., Lorson,C., Androphy,E.J., Sendtner,M., Podell,M. and Burghes,A.H. (2003). 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.*, 160, 41-52.
- Monani,U.R., Sendtner,M., Coovert,D.D., Parsons,D.W., Andreassi,C., Le,T.T., Jablonka,S., Schrank,B., Rossol,W., Prior,T.W., Morris,G.E. and Burghes,A.H. (2000). 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.* 9, 333-339.
- 81. Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N. and Dreyfuss, G. (2001). SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J.* **20**, 5443-5452.
- 82. Narayanan, U., Ospina, J.K., Frey, M.R., Hebert, M.D. and Matera, A.G. (2002). SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1785-1795.
- 83. Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. and Mann, M. (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat. Genet.*, **20**, 46-50.
- 84. Nicole, S., Diaz, C.C., Frugier, T. and Melki, J. (2002). Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve*, **26**, 4-13.
- 85. Pagliardini,S., Giavazzi,A., Setola,V., Lizier,C., Di Luca,M., DeBiasi,S. and Battaglia,G. (2000). Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 47-56.
- 86. Pellizzoni,L., Baccon,J., Charroux,B. and Dreyfuss,G. (2001). The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr. Biol.* **11**, 1079-1088.
- 87. Pellizzoni,L., Baccon,J., Rappsilber,J., Mann,M. and Dreyfuss,G. (2002). Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7540-7545.
- 88. Pellizzoni,L., Charroux,B. and Dreyfuss,G. (1999). SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 11167-11172.
- 89. Pellizzoni,L., Charroux,B., Rappsilber,J., Mann,M. and Dreyfuss,G. (2001). A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J. Cell Biol.*, **152**, 75-85.
- Pellizzoni,L., Kataoka,N., Charroux,B. and Dreyfuss,G. (1998). A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell*, 95, 615-624.
- 91. Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I. and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.*, **12**, 1231-1245.
- 92. Rochette, C.F., Gilbert, N. and Simard, L.R. (2001). SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum. Genet.*, **108**, 255-266.
- 93. Rodrigues, N.R., Owen, N., Talbot, K., Ignatius, J., Dubowitz, V. and Davies, K.E. (1995). Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 631-634.
- 94. Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L. and Singer, R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol.*, **17**, 2158-2165.
- Rossoll,W., Kröning,A.K., Ohndorf,U.M., Steegborn,C., Jablonka,S. and Sendtner,M. (2002). 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.*, 11, 93-105.
- 96. Rudnik-Schöneborn, S., Forkert, R., Hahnen, E., Wirth, B. and Zerres, K. (1996) Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics.*, **27**, 8-15.
- 97. Schrank, B., Gotz, R., Gunnersen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G. and Sendtner, M. (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 9920-9925.
- 98. Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U. and Sattler, M. (2001). SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 27-31.
- 99. Shamoo, Y., Abdul-Manan, N. and Williams, K.R. (1995). Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up. *Nucleic. Acids. Res.*, **23**, 725-728.
- 100. Shea, T.B. and Flanagan, L.A. (2001). Kinesin, dynein and neurofilament transport. *Trends Neurosci.*, **24**, 644-648.
- 101. Steward,O. and Schuman,E.M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci.*, **24**, 299-325.
- 102. Steward,O. and Schuman,E.M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*, **40**, 347-359.
- 103. Strasswimmer, J., Lorson, C.L., Breiding, D.E., Chen, J.J., Le, T., Burghes, A.H. and Androphy, E.J. (1999). Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1219-1226.

- 104. Talbot,K., Miguel-Aliaga,I., Mohaghegh,P., Ponting,C.P. and Davies,K.E. (1998). Characterization of a gene encoding survival motor neuron (SMN)- related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 2149-2156.
- 105. Talbot,K., Rodrigues,N.R., Ignatius,J., Muntoni,F. and Davies,K.E. (1997). Gene conversion at the SMN locus in autosomal recessive spinal muscular atrophy does not predict a mild phenotype. *Neuromuscul. Disord.*, **7**, 198-201.
- 106. Tiruchinapalli,D.M., Oleynikov,Y., Kelic,S., Shenoy,S.M., Hartley, A., Stanton,P.K., Singer,R.H. and Bassell,G.J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci.*, 23, 3251-61.
- 107. Tucker,K.E., Berciano,M.T., Jacobs,E.Y., LePage,D.F., Shpargel,K.B., Rossire,J.J., Chan,E.K., Lafarga,M., Conlon,R.A. and Matera,A.G. (2001). Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J. Cell Biol.* **154**, 293-307.
- 108. Vyas, S., Bechade, C., Riveau, B., Downward, J. and Triller, A. (2002). Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2751-2764.
- 109. Wang,J. and Dreyfuss,G. (2001). A cell system with targeted disruption of the SMN gene: functional conservation of the SMN protein and dependence of Gemin2 on SMN. *J. Biol. Chem.* 9599-9605.
- 110. Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B. and Sendtner, M. (1999). The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1668-1676.
- 111. Wiese, S., Pei, G., Karch, C., Troppmair, J., Holtmann, B., Rapp, U.R. and Sendtner, M. (2001). Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat. Neurosci.*, **4**, 137-142.
- Wirth,B. (2000). An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* 15, 228-237.
- 113. Wirth,B., Herz,M., Wetter,A., Moskau,S., Hahnen,E., Rudnik-Schoneborn,S., Wienker,T. and Zerres,K. (1999). 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.*, 64, 1340-1356.
- 114. Yonekawa,Y., Harada,A., Okada,Y., Funakoshi,T., Kanai,Y., Takei,Y., Terada,S., Noda,T. and Hirokawa,N. (1998). Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. J. Cell Biol., 141, 431-441.
- 115. Young,P.J., Day,P.M., Zhou,J., Androphy,E.J., Morris,G.E. and Lorson,C.L. (2002). A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2852-2859.

- Young,P.J., DiDonato,C.J., Hu,D., Kothary,R., Androphy,E.J. and Lorson,C.L. (2002). SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 577-587.
- 117. Young, P.J., Jensen, K.T., Burger, L.R., Pintel, D.J. and Lorson, C.L. (2002). Minute virus of mice NS1 interacts with the SMN protein, and they colocalize in novel nuclear bodies induced by parvovirus infection. *J. Virol.*, **76**, 3892-3904.
- 118. Zhang,H.L., Singer,R.H. and Bassell, G.J. (1999). Neurotrophin regulation of betaactin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol.*, **147**, 59-70.
- 119. Zhang,H.L., Eom,T., Oleynikov,Y., Shenoy,S.M., Liebelt,D.A., Dictenberg,J.B., Singer,R.H. and Bassell,G.J. (2001). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*, **31**, 261-75.
- 120. Zhang,H.L., Pan,F., Hong, D., Shenoy, S.M., Singer, R.H. and Bassell, G.J. (2003). Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci.* 23, 6627-6637.

## 9. Danksagung

Ich möchte Professor Sendtner dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in einer Gruppe anzufertigen, in der eine so gute Zusammenarbeit herrscht und in der Experimente nicht an finanziellen Mitteln scheitern. Professor Heisenberg möchte ich dafür danken, dass er nicht nur die Betreuung der Arbeit übernommen hat, sondern sich auch Zeit für mich genommen hat. Der ganzen Arbeitsgruppe von Professor Sendtner danke ich zusätzlich für die vielen wissenschaftlichen und auch nichtwissenschaftlichen Gespräche und natürlich im Speziellen dem "Mittwochsabendkränzchen" für die interessanten Diskussionen in entspannter Atmosphäre. Ganz besonders möchte ich Wilfried für die Superbetreuung danken. Ich habe sehr viel von Dir gelernt, nicht trotz sondern weil Du einem eher sagst: "Steht im Maniatis", als alles vorzukauen. Außerdem möchte ich Sasha, Sibylle, Stefan, Steffi, Uli, Woula und Yasu noch einmal einzeln erwähnen und ihnen für die gute Labornachbarschaft und alles was dazu gehört danken. Auch Danni und Susanne möchte ich danken. Mit Euch schmecken mir sogar der Früchtetee und die Erbsen in Schleimsoße. Natürlich danke ich auch Paul. Du warst mir ein Rückhalt auch wenn etwas nicht so glatt lief. Zum Glück hast Du dann ja für diese schwierige Aufgabe Verstärkung gekriegt. Danke auch Dir Felix. Vielen Dank Inge, dass ich überhaupt mal Zeit hatte an dieser Arbeit zu schreiben und danke Arthur, dass Du immer so tapfer fragst was ich da eigentlich mache. Auch möchte ich Carsten herzlich danken, dass er meine Arbeit korrekturgelesen hat, obwohl er laut eigenen Aussagen schon beim ersten Satz ausgestiegen ist.