

„Reinigung und funktionelle Charakterisierung
des SMN-Komplexes von *Drosophila melanogaster*“

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

vorgelegt von

Matthias Kroiß
aus Würzburg

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Utz Fischer

Gutachter : Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. SPINALE MUSKELATROPHIE ALS PARADIGMA MOLEKULARER MEDIZINISCHER FORSCHUNG	6
1.1.1. <i>Genetische Grundlagen der SMA</i>	6
1.1.2. <i>Eine Rolle von SMN bei der Biogenese spleißosomaler UsnRNPs</i>	7
1.1.3. <i>Das SMN-Protein ist Teil eines makromolekularen Komplexes</i>	9
1.1.4. <i>Funktionelle Domänen des SMN-Proteins</i>	11
1.2. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER ALS MODELLORGANISMUS DER SPINALEN MUSKELATROPHIE</i>	11
1.3. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	14
2. MATERIALIEN UND METHODEN	15
2.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	15
2.2. BIOINFORMATIK	15
2.2.1. <i>Evolutionsbiologie</i>	15
2.2.2. <i>Laborsoftware</i>	16
2.3. GENTECHNISCHE METHODEN	16
2.3.1. <i>DNA-Präparation</i>	18
2.3.2. <i>Präparative Polymerasekettenreaktion</i>	18
2.3.3. <i>Restriktionshydrolyse von DNA</i>	18
2.3.4. <i>Ligation von DNA</i>	19
2.3.5. <i>DNA-Agarosegelelektrophorese</i>	19
2.3.6. <i>Transformation von E.coli-Stämmen</i>	19
2.3.7. <i>PCR-Kolonie-Screening</i>	20
2.3.8. <i>Generierung von Expressionskonstrukten für E.coli</i>	20
2.3.9. <i>Erzeugung des pMTagIt-Vektors zur Expression in Schneider2-Zellen</i>	21
2.3.10. <i>Präparation von Total-RNA aus Schneider2-Zellen</i>	22
2.3.11. <i>Reverse Transkription (RT)</i>	23
2.3.12. <i>Transkription in vitro radioaktiv markierter UsnRNAs</i>	23
2.3.13. <i>Denaturierende RNA-PAGE</i>	24
2.3.14. <i>Elution von DNA und RNA aus denaturierenden Gelen</i>	24
2.3.15. <i>Northern-Blot und Hybridisierung</i>	25
2.3.16. <i>Native RNA-PAGE/EMSA</i>	26
2.4. ZELLKULTURTECHNIKEN	26
2.4.1. <i>Kultur von Drosophila Schneider2-Zellen</i>	26
2.4.2. <i>Herstellung stabil transfizierter Schneider2-Zelllinien</i>	27

2.5.	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	29
2.5.1.	SDS-PAGE.....	29
2.5.2.	Coomassie-Färbung.....	30
2.5.3.	Silberfärbung.....	30
2.5.4.	Western-Blot und Amidoschwarz-Färbung.....	31
2.5.5.	Immunoblot-Analyse.....	31
2.5.6.	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	32
2.5.7.	Affinitätsreinigung von His ₆ -Tag-Fusionsproteinen.....	33
2.5.8.	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper anti-dSMN und anti-dGemin2.....	34
2.5.9.	Affinitätsreinigung des monoklonalen Antikörpers 7B10.....	35
2.5.10.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
2.5.11.	Glycerolgradientenzentrifugation.....	35
2.6.	IMMUNFLUORESCENZMIKROSKOPIE.....	36
2.7.	PROTEINTANDEMMASSENSPEKTROMETRIE (PROTEIN-MS/MS).....	36
3.	ERGEBNISSE.....	38
3.1.	EIN KOMPLEX AUFGEBAUTER SMN-KOMPLEX KENNZEICHNET METAZOEN.....	39
3.2.	DIPTEREN BESITZEN EINEN SEKUNDÄR VEREINFACHTEN SMN-KOMPLEX.....	41
3.3.	dSMN UND dGEMIN2 SIND IN <i>DROSOPHILA</i> ZYTOPLASMATISCHE PROTEINE.....	41
3.4.	REINIGUNG DES <i>DROSOPHILA</i> -SMN-KOMPLEXES.....	42
3.4.1.	Konzeption eines neuen Affinitätssepitops für <i>Drosophila</i>	43
3.4.2.	TagIt-dSMN kosedimentiert mit und bindet dGemin2.....	46
3.4.3.	Massenspektrometrische Analyse des dSMN-Komplexes.....	48
3.4.4.	Dhh1 ist keine stabile Komponente des dSMN-Komplexes.....	50
3.4.5.	Rigor mortis bildet keinen Komplex mit dSMN.....	51
3.4.6.	Der dSMN-Komplex enthält UsnRNAs.....	52
3.4.7.	Gereinigter dSMN-Komplex katalysiert die UsnRNP-Zusammenlagerung <i>in vitro</i>	54
3.4.8.	Rekombinante Rekonstitution des dSMN-Komplexes.....	55
3.4.9.	Rekonstituierter dSMN-Komplex katalysiert die UsnRNP-Zusammenlagerung.....	56
3.5.	MENSCHLICHES SMN UND GEMIN2 GENÜGEN ZUR BILDUNG DES USNRNP-CORE PARTIKELS.....	58
4.	DISKUSSION.....	61
4.1.	ÜBERLEGUNGEN ZUR HEURISTIK.....	61
4.2.	URSPRUNG UND EVOLUTION DES SMN-KOMPLEXES.....	63
4.2.1.	SMN und Gemin2 sind die Kernkomponenten des SMN-Komplexes.....	63
4.2.2.	Der SMN-Komplex evolviert durch modulare Expansion.....	64
4.3.	DIPTEREN BESITZEN EINEN RADIKAL VEREINFACHTEN SMN-KOMPLEX.....	65

4.4.	SMN UND GEMIN2 SIND IN <i>DROSOPHILA</i> SCHNEIDER2-ZELLEN ZYTOPLASMATISCHE PROTEINE	67
4.5.	ENTWICKLUNG UND ETABLIERUNG DES <i>TAGIT</i> -EPITOPS.....	68
4.5.1.	<i>Die Verwendung von Epitop-Tags zur Reinigung makromolekularer Komplexe</i>	68
4.5.2.	<i>Der Antikörper 7B10 und sein Epitop</i>	69
4.5.3.	<i>Das Epitop von 7B10 fehlt im SMN-Protein von Drosophila melanogaster</i>	70
4.5.4.	<i>Der TagIt-dSMN-Komplex lässt sich effizient aus Schneider2-Zellen aufreinigen</i>	71
4.6.	DIE ZUSAMMENSETZUNG DES dSMN-KOMPLEXES	72
4.6.1.	<i>dSMN und dGemin2 bilden die Kernkomponenten des dSMN-Komplexes</i>	72
4.6.2.	<i>Dhh1 ist keine stabile Komponenten des dSMN-Komplexes in Schneider2-Zellen</i>	73
4.6.3.	<i>Rigor mortis bindet nicht an dSMN</i>	74
4.6.4.	<i>Der dSMN-Komplex enthält UsnRNAs</i>	75
4.7.	ISOLIERTER dSMN-KOMPLEX IST AKTIV IN DER ZUSAMMENLAGERUNG VON <i>USNRNP-CORES</i>	76
4.8.	REKONSTITUTION DES dSMN/dGEMIN2-HETERODIMERS.....	77
4.9.	SMN UND GEMIN2 GENÜGEN BEIM MENSCHEN FÜR DIE <i>SM-CORE</i> -BILDUNG	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG	81
6.	SUMMARY	82
7.	ANHANG	83
7.1.	ISOTYPISIERUNG DES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS 7B10.....	83
7.2.	FEINANALYSE DES 7B10-EPITOPS	84
7.3.	MÖGLICHE WEITERE ANWENDUNGEN DES <i>TAGIT</i> -EPITOPS	89
7.4.	ERGÄNZENDE DATEN UND SEQUENZVERGLEICHE	92
8.	LITERATURVERZEICHNIS	96
9.	PUBLIKATIONEN	110
	Patentantrag	110
	Zeitschriftenbeiträge	110
	Konferenzbeiträge.....	110
	DANKSAGUNG	111
	LEBENS LAUF	112
	ERKLÄRUNGEN	113

1. EINLEITUNG

1.1. Spinale Muskelatrophie als Paradigma molekularer medizinischer Forschung

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist die zweithäufigste letale, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung bei Weißen nach der zystischen Fibrose (Mukoviszidose, MIM #219700) [1]. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung als symmetrische schlaffe Lähmung vor allem der Extremitätenmuskulatur bei Kindern und Jugendlichen. Nach ihrem Verlauf unterscheidet man vier allelische Typen. Der zuerst von Werdnig und Hoffmann beschriebene Typ I [2, 3] kann sich bereits während der Schwangerschaft durch verminderte Kindsbewegungen äußern und tritt beim Neugeborenen und Säugling als „floppy infant syndrome“ zu Tage. Patienten mit dieser schweren Form der SMA sterben meist unter zwei Jahren an Atemversagen als Folge der Lähmung der Atemmuskulatur und sekundärer Infektionen. Die SMA Typ II (MIM #253550) manifestiert sich im Alter zwischen 6 und 18 Monaten. Die Betroffenen können das Sitzen erlernen, sind aber nicht in der Lage zu laufen. Der Tod tritt – ähnlich wie bei der SMA Typ I – durch Atemversagen zwischen dem Alter von 2 Jahren und dem jungen Erwachsenenalter ein. Der Typ III (MIM #253400) ist mit den Namen Kugelberg und Welander verbunden [4] und tritt definitionsgemäß nach dem 18. Lebensmonat auf. Die Betroffenen können stehen und gehen und sterben erst im Erwachsenenalter. Als Typ IV (MIM #271150) bezeichnet man eine milde Variante, die erst im Erwachsenenalter symptomatisch wird mit guter Prognose *quoad vitam* [5].

1.1.1. Genetische Grundlagen der SMA

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der molekularen Pathogenese der Erkrankung war die Identifizierung des bei Patienten mutierten Gens. Der Genlokus war bereits zuvor auf Chromosom 5q13 eingengt worden. Lefebvre und Mitarbeiter konnten dann zeigen, dass an dieser Stelle des Genoms eine invertierte Duplikation eines Genclusters vorliegt, welcher das als „survival motor neuron“ SMN1 bezeichnete Gen umfasst, das bei SMA-Patienten deletiert ist oder in dem Mutationen vorliegen [6]. Das neben diesem „telomerischen“ Gen vorliegende zentromerische Gen (SMN2) liegt seinerseits in unterschiedlichen Kopienzahlen vor [1, 7], bei ca. 4% der Individuen fehlt es völlig. Das SMN2-Gen unterscheidet sich vom SMN1-Gen lediglich durch 5 Basenunterschiede in Intron 6, Exon 7, Intron 7 (2 Basenaustausche) und Exon 8. Als Folge der C->T-Transition in Exon 7 des SMN2-Gens wird ein exonischer Spleißverstärker (*exonic splicing enhancer*, ESE) zerstört, wodurch überwiegend eine um dieses Exon verkürzte mRNA vom SMN2-Gen gebildet

wird (*exon 7 skipping*). Die verkürzte mRNA führt zur Translation eines nicht funktionellen Proteins. Trotzdem besitzt ein geringer Teil der Transkripte des SMN2-Gens die volle Länge, weshalb etwas funktionsfähiges SMN-Proteins gebildet wird. Bei Organismen, die nur über eine Kopie des SMN-Gens verfügen, ist eine homozygote Deletion nicht mit dem Leben vereinbar, wie die Situation in *Schizosaccharomyces pombe* oder das SMN-Mausmodell zeigen [8-10]. Menschen, die an Spinaler Muskelatrophie leiden, sind also nur deshalb lebensfähig, weil das SMN2-Gen geringe Mengen funktionsfähigen SMN-Proteins liefert. Diese genetische Konstellation ist für die Spezies Mensch einzigartig [11]. Dies zeigt, dass SMN ein essentieller Faktor ist. Darüber hinaus wird das Gen in allen untersuchten Geweben exprimiert [6, 12] und ist nicht etwa – wie der Krankheitsphänotyp vermuten ließe – neuronenspezifisch. Es ist eine Frage grundsätzlicher Bedeutung, weshalb ein essentiell benötigter Faktor zu einem gewebespezifischen Phänotyp führt. In der Tat gibt es auch Mutationen in anderen Genen, die trotz ihrer ubiquitären Expression nur in bestimmten Geweben krankhaft manifest werden. Beispiele sind zwei Formen der Retinitis pigmentosa, Typ 11 (MIM #600138) und Typ 18 (MIM# 601414), denen Mutationen in den Genen PRPF31 bzw. PRPF3 zu Grunde liegen, die essentielle Bestandteile des Spleißosoms codieren [13, 14].

1.1.2. Eine Rolle von SMN bei der Biogenese spleißosomaler UsnRNPs

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der molekularen Pathogenese der SMA war der Befund, dass das SMN-Protein eine Rolle beim Spleißen von prä-mRNAs spielt. Dieser komplexe Prozess des Herausschneidens von Introns wird vom makromolekularen Spleißosom katalysiert. Wichtige Bestandteile des Spleißosoms sind vier so genannte UsnRNPs, welche ihrerseits aus einer namensgebenden UsnRNA (*Uridin-rich small nuclear RNA*) - Komponente (U1, U2, U4/6 und U5) und mehreren Proteinen bestehen (RNP: *ribonucleoprotein particle*). Diese UsnRNPs binden mittels ihrer RNA-Komponente an die prä-mRNA und wirken dynamisch zusammen, um Exons unter gleichzeitiger Entfernung der Introns zusammenzufügen. Die Biogenese spleißosomaler UsnRNPs erfolgt ihrerseits in einer regulierten Abfolge von Ereignissen [15] (Abbildung 1). Die transkribierten UsnRNAs werden dazu aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo die sieben Sm-Proteine B/B' (B' ist eine Spleißvariante von B), D1, D2, D3, E, F und G an einen *Sm-site* genannten Teil der UsnRNAs binden [16, 17]. Diese besitzt die charakteristische Sequenz Purin-A-U_{4,6}-G-Pu. Die Zusammenlagerung des *Sm-core*-Partikels kann *in vitro* spontan ablaufen und es ent-

steht eine kompakte und stabile, ringförmige Struktur, die das strukturelle Grundgerüst aller UsnRNPs bildet. Man bezeichnet sie als *Sm-core*-Domäne und den resultierenden RNP als *Sm-core*-Partikel.

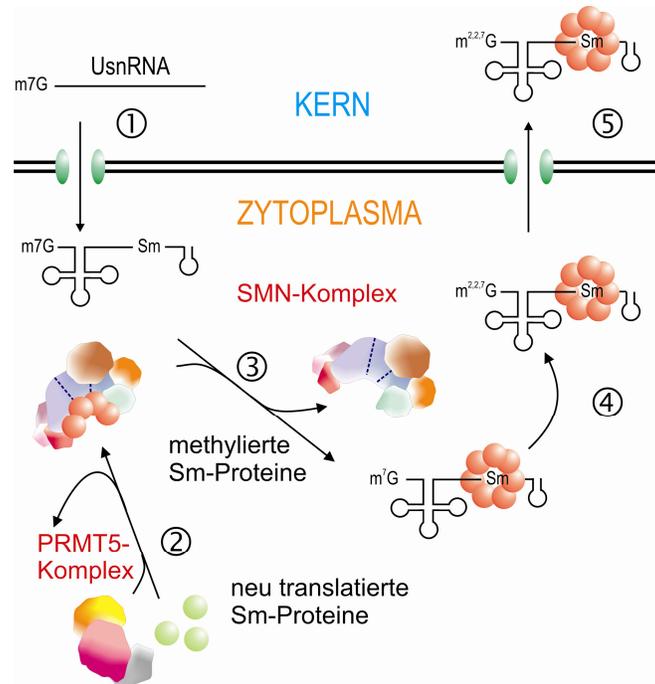


Abbildung 1: Biogenese spleißosomaler UsnRNPs nach [28] und in [29]

Die Zusammenlagerung (*Assembly*) von spleißosomalen *UsnRNPs* erfolgt durch die koordinierte Aktivität zweier Proteinkomplexe. Nach der Transkription der *UsnRNA* im Zellkern (1) erfolgt ihr Export in das Zytoplasma. Dort translatierte *Sm*-Proteine (grün) werden durch den *PRMT5*-Komplex symmetrisch an Arginin-Resten di-methyliert (2, rot). Anschließend werden sie auf den *SMN*-Komplex übertragen. Nur mit den am *SMN*-Komplex gebundenen *Sm*-Proteinen kann die *UsnRNA* über ihre *Sm-site* in Wechselwirkung treten (3). Es bildet sich ein stabiler *Sm-core*-Partikel aus, der aus der *UsnRNA* und einem sieben-teiligen Ring von *Sm*-Proteinen besteht. Nun wird die Cap-Struktur der *UsnRNA* hypermethyliert (4) und der fertige *Sm-core*-Partikel in den Zellkern importiert (5). Nicht genau bekannt und hier auch nicht dargestellt ist bislang der Ort und der Mechanismus der Bindung *UsnRNP*-spezifischer Proteine.

Obwohl die Zusammenlagerung (man spricht im Englischen von *Assembly*) von *UsnRNA* und *Sm*-Proteinen im Reagenzglas spontan erfolgen kann, war für das Verständnis der SMA die Beobachtung entscheidend, dass dieser Vorgang in der lebenden Zelle die Mitwirkung des *SMN*-Proteins erfordert [18, 19]. So wurde zunächst eine transiente Wechselwirkung zwischen *SMN* und *UsnRNAs* im Cytoplasma von *Xenopus*-Oocyten beobachtet. In weitergehenden Studien ließ sich dann zeigen, dass das *SMN*-Protein Teil einer makromolekularen Einheit, des so genannten *SMN*-Komplexes ist, der die *Sm*-Proteine in einer aktiven Weise auf die *UsnRNA* lädt [20]. Dieser Prozess benötigt im Zellextrakt ATP, läuft

aber am isolierten SMN-Komplex spontan ab. Der eigentlichen Zusammenlagerung der *UsnRNP-core*-Partikel ist eine posttranslationale Modifikation der Sm-Proteine B, D1 und D3 vorgeschaltet: Einige Arginin-Reste der Sm-Proteine werden durch den PRMT5-Komplex symmetrisch di-methyliert [21, 22]. Studien mit isolierten Sm-Proteinen legten den Schluss nahe, dass diese Modifikation die Affinität der Sm-Proteine zum SMN-Komplex erhöht [22]. *In vivo* kommen jedoch Sm-Proteine wahrscheinlich nicht einzeln, sondern als Heterooligomere oder in einem bislang schlecht charakterisierten, bei 6S in der Gradientenzentrifugation sedimentierenden Komplex vor [23, 24]. Es bleibt daher abzuwarten, welche Rolle Arginin-Methylierung *in vivo* bei der UsnRNP-Biogenese zukommt.

Nach der Zusammenlagerung von Sm-Proteinen mit der jeweiligen UsnRNA wird die bisherige m⁷G-cap-Struktur der snRNA durch die Cap-Methyltransferase Tgs1 zum m^{2,2,7}G-cap hypermethyliert, wobei ebenfalls der SMN-Komplex als Bindungsplattform dient [25, 25, 26]. Anschließend findet der Import des zusammengelagerten UsnRNPs in den Zellkern unter Vermittlung des Proteins Snurportin statt [27].

1.1.3. Das SMN-Protein ist Teil eines makromolekularen Komplexes

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Pathogenese der SMA war die Erkenntnis, dass das ca. 32 kDa große (294 Aminosäuren) humane SMN-Protein Teil eines makromolekularen Komplexes ist [19]. Ein Fokus der Forschungen in den vergangenen 10 Jahren lag auf der Aufklärung der einzelnen Bestandteile dieses SMN-Komplexes. Zunächst erhielten die neu identifizierten Bindungspartner von SMN unsystematische Bezeichnungen. Per Konvention werden heute all jene Interaktoren, die zusammen mit SMN in „Gemini of Cajal Bodies“, kurz Gems, im Zellkern angetroffen werden [30], als „Gemine“ bezeichnet und werden nach der Chronologie ihrer Entdeckung fortlaufend nummeriert. Der zuerst identifizierte Interaktor von SMN war das Gemin2 (SIP-) Protein [19]. Es wurde in einem „yeast-two-hybrid-screen“ entdeckt und ermöglichte die Erstbeschreibung der Funktion des SMN-Komplexes bei der UsnRNP-Biogenese [18]. Ähnlich wie die meisten übrigen Komplexpartner besitzt Gemin2 keine wegweisende Domänenstruktur. Gemin3 (dp103) gehört zur Gruppe der DEAD-Box-Helikasen [31, 32], welche unter ATP-Verbrauch Sekundärstrukturen von RNA entwinden [33] oder Umlagerungen von Protein-RNA-Bindungen in RNPs ermöglichen [34]. Ähnlich wie für das 120 kDa große Gemin4 [35], ist auch für Gemin6 (19 kDa) [36], Gemin7 (15 kDa) [37] und Gemin 8 (29 kDa) [38] bisher keine Domänenstruktur beschrieben. Gemin5 (169 kDa) hingegen ist ein so genanntes

WD-repeat-Protein [39]. WD-repeats (Pfam PF00400) sind etwa 40 Aminosäuren umfassende Motive, die oft, jedoch nicht immer, mit den Aminosäuren Tryptophan und Asparaginsäure (WD im Einbuchstabencode) enden [40]. Sechs bis acht solcher Motive lagern sich zu einem Beta-Propeller zusammen (eine Kristallstruktur zeigt PDB 1sq9, [41]), der als Bindungsplattform für andere Proteine dient. Neben weiteren Proteinen, die womöglich transient oder unter bestimmten Bedingungen mit dem SMN-Komplex interagieren, wurde das Protein UNRIP als stabile Komponente des zytoplasmatischen SMN-Komplexes gefunden [42, 43].

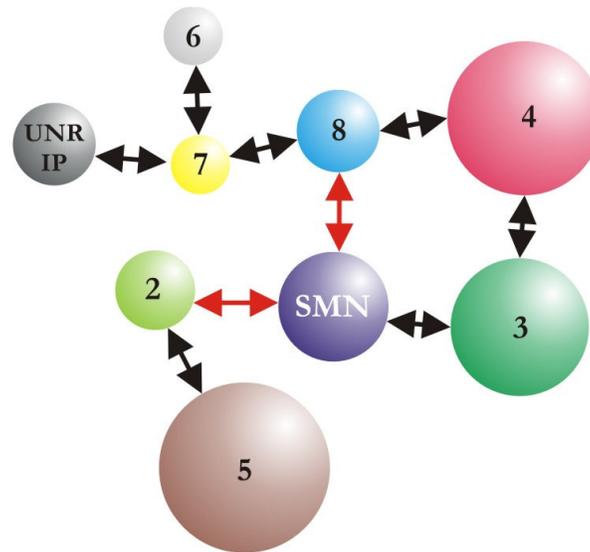


Abbildung 2: Protein-Interaktionen im humanen SMN-Komplex nach [44].

Schematische Darstellung der mittels verschiedener Methoden erhobenen Bindungen innerhalb des humanen SMN-Komplexes. Die Zahlen bezeichnen die Gemin-Proteine. UNRIP ist nur Bestandteil des zytoplasmatischen SMN-Komplexes.

Nachdem nun zumindest die wesentlichen Komplexpartner von SMN identifiziert wurden, befasst sich gegenwärtige Forschung mit der Funktionsanalyse der einzelnen Komplexpartner. Ein wesentlicher Beitrag zu diesem Ziel war die Aufklärung der Protein-Interaktionen innerhalb des SMN-Komplexes durch Otter und Mitarbeiter [44]. Eine Zusammenfassung der Resultate zeigt Abbildung 2. Demnach bilden die Proteine SMN, Gemin2 und Gemin8 das Rückgrat des Komplexes. Gemin8 stellt dabei die Brücke zu den peripheren Komponenten Gemin7, Gemin6 und UNRIP sowie zu Gemin4 dar. Dieses wiederum bildet zusammen mit SMN eine Bindungsplattform für die DEAD-Box-Helikase Gemin3, während Gemin5 über Gemin2 zum Komplex rekrutiert wird.

1.1.4. Funktionelle Domänen des SMN-Proteins

SMN besitzt eine charakteristische Tudor-Domäne (Aminosäure 90-149). Diese Domäne ist benannt nach dem *Drosophila* Tudor-Protein, welches bei der Organisation des Polplasmas der Oocyte eine Rolle spielt und neun dieser Domänen enthält [45-47]. Mit großer Sicherheit ist die Tudor-Domäne des SMN-Proteins für die Bindung Arginin-dimethylierter Sm-Proteine verantwortlich, wie biochemische und strukturelle Daten zeigen [22, 48-52]. Die Sm-Protein-Bindung wird durch die im Menschen pathogene Aminosäuresubstitution E134K aufgehoben [48, 49]. Es wird vermutet, dass die Tudor-Domäne des namensgebenden *Drosophila*-Proteins ebenfalls methylierte (Sm-) Proteine bindet [53]. Eine Reihe weiterer Proteine mit Tudor-Domänen werden mit RNA-metabolen Prozessen in Verbindung gebracht [46]. Einige davon (Tdrd1, 6 und 7) spielen eine Rolle bei der Keimzellbildung [54, 55], für Tudor-SN (*Drosophila*, humanes Homolog Tdrd11, auch EBNA2 coactivator p100) wird eine Funktion bei der Spaltung editierter RNA, wahrscheinlich im Rahmen der Regulation der RNA-Interferenz, postuliert [56-58].

Neben der Tudor-Domäne wurden auch andere Bereiche des SMN-Proteins genauer charakterisiert. So wurde die Bindungsstelle für Gemin2 durch Konkurrenz mit synthetischem Peptid auf die Aminosäuren 13-44 eingeengt [19]. Der C-Terminus von Gemin3 bindet seinerseits an den C-Terminus von SMN; so wurde gezeigt, dass das Einbringen der beim Menschen pathogenen Mutation Y272C oder eine Trunkation von SMN um das Exon 7 die Bindung von Gemin3 weitgehend aufhebt [31]. Andererseits ist dieser Rest Teil einer hochkonservierten YxxG-Box [59] und offenbar für die Oligomerisierung von SMN verantwortlich [60, 61].

1.2. *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus der Spinalen Muskelatrophie

Neben Maus [8, 9] und Zebrafisch [62-64] wurde *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus der Spinalen Muskelatrophie untersucht. Miguel-Aliaga und Mitarbeiter [65] identifizierten zunächst das *smn*-Gen in *Drosophila* (dSMN) auf Basis einer Homologiesuche in der damaligen EST-Datenbank. Eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen von humanem SMN-Protein und *Drosophila*-SMN zeigt Abbildung 3.

In frühen Stadien von *Drosophila*-Embryonen ist das *smn*-Transkript ein maternales Genprodukt ähnlich wie bei *C. elegans* [67]. Es wurde gezeigt, dass Überexpression des humanen SMN-Gens im Puppenstadium letal wirkt, ein Effekt, der auch nach Überexpression des C-Terminus von dSMN auftrat. Dies wurde auf einen dadurch hervorgerufenen Oligomerisierungsdefekt des dSMN-Proteins zurückgeführt. Kennzeichnend für die überexprimie-

renden Fliegen waren Defekte bei der posterioren Entwicklung. Jene wenigen Individuen, die schlüpfen, besaßen deformierte Beine. Ein Phänotyp nach Überexpression beim Menschen ist allerdings nicht bekannt. Aus derselben Arbeitsgruppe wurde später die Identifizierung und Analyse [68] zweier *Drosophila*-Mutanten im *smn*-Gen berichtet. Beide führen zu Aminosäuresubstitutionen im C-Terminus des Proteins (G202S für die Linie *smn73^{Δo}* und S201F für *smn^B*).

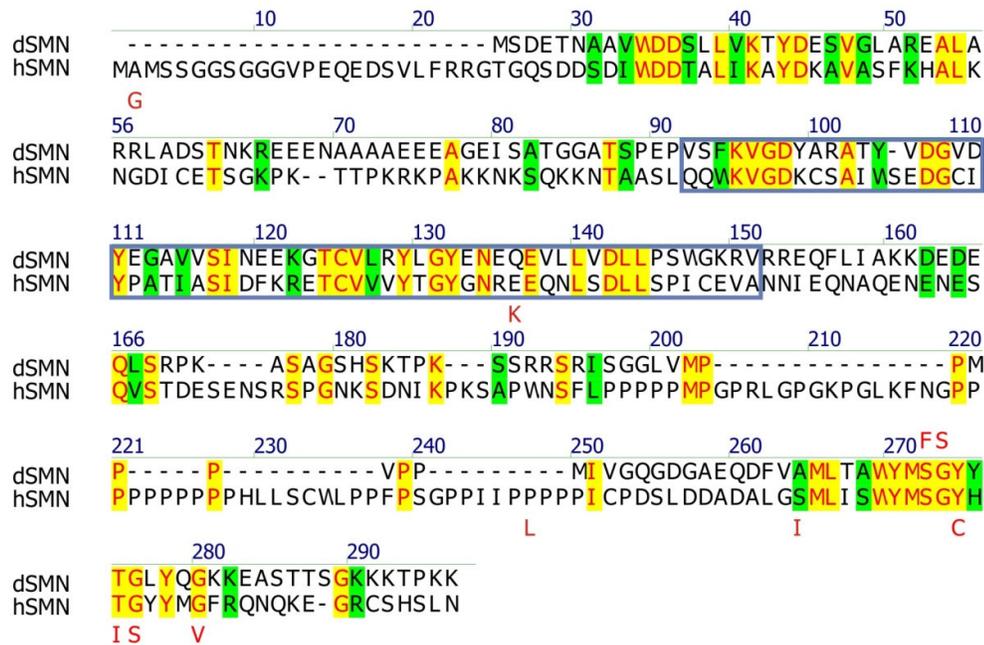


Abbildung 3: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von hSMN und dSMN

Die Tudor-Domäne ist hellblau umrahmt (Domänengrenzen nach SMART [66]). Identische Aminosäuren sind gelb, ähnliche grün unterlegt. Die beschriebenen Mutationen in *Drosophila smn73^{Δo}* (alias *smn^A*) und *smn^B* sind oberhalb der dSMN-Sequenz wiedergegeben und bekannten humanen Mutationen (unterhalb der Sequenz) gegenübergestellt.

Ein Vergleich mit bekannten SMA verursachenden Mutationen beim Menschen zeigt, dass einige davon in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander im Bereich der konservierten und für die Oligomerisierung erforderlichen YxxG-Boxen liegen (siehe Abbildung 3 [60]). Die Mutationen sind homozygot letal in späten Larvenstadien. Dass die Mutation überhaupt mit dem Leben vereinbar ist, wurde schlüssig auf den maternalen Pool an Transkripten zurückgeführt. Phänotypisch wurde bei den Mutanten eine verringerte Mobilität der Larven beobachtet. Ein *rescue* gelang nicht nur nach ubiquitärer Expression des wildtypischen SMN-Protein sondern auch wenn es gleichzeitig unter einem pan-neuralen und einem muskelspezifischen Promotor mittels GAL4:UAS-System exprimiert wurde [69]. Expression nur in Neuronen oder nur in Muskeln stellte den Wildtyp-Phänotyp nur unvollständig

wieder her. Auf histologischer Ebene untersuchten die Autoren daher die motorische Endplatte der Fliegen. Es zeigte sich, dass allenfalls subtile und sehr variable morphologische Veränderungen auftraten, die den Phänotyp nicht vollständig zu erklären schienen. Kürzlich wurde erneut versucht, die Charakteristika der SMA in einem *Drosophila*-Modell zu rekapitulieren [70]. Dazu wurden drei verschiedene Transposon-Insertionen (*PiggyBac*, [71, 72]) analysiert, von denen zwei innerhalb der codierenden Sequenz liegen (smn^C und smn^D) und als homozygot letale null-Allele zu betrachten sind. Eine dritte (smn^E) liegt im Promotor-Bereich des *smn*-Gens und zeigte keinen Phänotyp. Daher wurden unpräzise Exzisionen des P-Elements vorgenommen, von denen zwei berichtete einen „motoneuronalen Phänotyp“ zeigten. Nur die smn^{E33} -Linie wurde weiter untersucht. In der Tat konnten die Mutanten nicht fliegen, waren aber lebensfähig und fertil. Die Autoren zeigten, dass die indirekte Flugmuskulatur der mutanten Insekten desorganisiert war und die adulten Motoneurone eine fehlerhafte Verzweigung besaßen. Erstaunlicherweise besitzen die Mutanten im Immunoblot identische Mengen an dSMN-Protein mit Ausnahme der Flugmuskulatur, wo eine geringere Proteinmenge gezeigt wurde. Diese Daten reichen jedoch nicht aus, um schlüssig eine auf die Flugmuskulatur beschränkte Funktion des dSMN-Proteins nachzuweisen. Daten, die eine normale UsnRNP-Biogenese in diesen Mutanten nachweisen sollten, waren nicht konsistent. Zudem beschränkten sich die Analysen auf nur eine hypomorphe Mutante, so dass weiter reichende Schlüsse schwer möglich sind. Zusammengefasst zeigen die verfügbaren Daten, dass das *Drosophila*-SMN-Protein strukturell ähnliche Eigenschaften besitzt, wie das humane Ortholog. Auch scheint eine C-terminale Oligomerisierung für die Funktion des Komplexes unverzichtbar. Zudem deutet sich an, dass das Protein, ähnlich wie im Menschen für die Lokomotion der Tiere erforderlich ist, sei es auf neuronaler oder muskulärer Ebene. Ob allerdings das Protein auch in *Drosophila* bei der UsnRNP-Biogenese eine Rolle spielt wurde nicht geklärt. In der Tat wurde diese Funktion bis heute nur in Vertebraten gezeigt, nämlich *Xenopus laevis* [18], *Danio rerio* [64], und Mensch [20].

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

In den vergangenen Jahren war der humane SMN-Komplex Gegenstand intensiver Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Ursachen der SMA. Ein Schwerpunkt dabei lag auf der Identifizierung seiner Komponenten. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass dieser aus mindestens 9 Proteinen besteht, welche *in vivo* an der *UsnRNP*-Biogenese beteiligt sind. Dem gegenüber läuft die Zusammenlagerung des *Sm-core*-Partikels *in vitro* spontan ab [16, 17, 73] und erfordert *in cis* lediglich die *Sm-site* [74, 75].

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war daher die Frage, ob in der Tat alle Gemin-Proteine für die Zusammenlagerung des *Sm-core*-Partikels erforderlich sind. Ich stellte die Hypothese auf, dass der SMN-Komplex anderer Organismen als des Menschen einfacher aufgebaut sein könne.

- Dazu sollte der SMN-Komplex zunächst mit bioinformatischen Methoden in den Genomen zahlreicher Organismen untersucht werden, um das System minimaler Komplexität zu identifizieren.
- Anschließend sollte eine geeignete Methode etabliert werden, um diesen Komplex biochemisch aufzureinigen.
- Die Zusammensetzung des isolierten Proteinkomplexes sollte dann mittels Massenspektrometrie aufgeklärt,
- und seine Funktion biochemisch charakterisiert werden.
- Im Anschluss war die Rekonstitution des minimalen SMN-Komplexes aus rekombinant exprimierten Proteinen geplant.
- Dies sollte die Grundlage für die Aufklärung der Struktur dieses minimalen SMN-Komplexes schaffen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, steriles deionisiertes Reinstwasser (ddH₂O). Die eingesetzten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von BD Biosciences (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Radiochemikalien stammten von GE Life Sciences (Freiburg), Restriktionsenzyme und Phosphatasen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main), DNA-Polymerasen von MBI Fermentas und peqlab (Erlangen). Oligonukleotide wurden bei biomers.net (Ulm), Peptide bei Peptide Specialty Lab (Heidelberg) und Schafer-N (Kopenhagen, Dänemark) synthetisiert. Geschützte Warennamen (Warenzeichen) sind in dieser Arbeit nicht gesondert kenntlich gemacht.

2.2. Bioinformatik

2.2.1. Evolutionsbiologie

Die Analyse der Evolution des SMN-Komplexes wurde in enger Zusammenarbeit mit Prof. Jörg Schultz, Lehrstuhl für Bioinformatik durchgeführt. Dazu wurden die Proteome der einzelnen Organismen heruntergeladen, im Einzelnen:

- aus der ENSEMBL-Datenbank (www.ensembl.org) die Proteome von *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Ciona intestinalis*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*.
- aus der JGI-Datenbank (www.jgi.doe.gov) die Proteome von *Nematostella vectensis*, *Branchiostoma floridae* und *Ostreococcus tauri*
- von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) das Proteom von *Strongylocentrotus purpuratus*
- aus Organismus-spezifischen Datenbanken folgende Proteome: *Saccharomyces cerevisiae* – SGD (www.yeastgenome.org), *Schizosaccharomyces pombe* – Sanger Centre (www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe), *Apis mellifera* – BeeBase (www.beebase.org), *Dictyostelium discoideum* – DictyBase (dictybase.org), *Arabidopsis thaliana* – TAIR (arabidopsis.org), *Oryza sativa ssp. japonica* – MIPS (mips.gsf.de).

Um Orthologe des SMN-Komplexes zu identifizieren, wurde für jede Komponente des humane SMN-Komplexes ein *position specific iteration BLAST* (PSI-BLAST [76])-Profil generiert und damit die jeweilige Proteindatenbank durchsucht. Mit jedem Kandidatenprotein wurde anschließend eine Rückwärtssuche gegen die nichtredundante Proteindatenbank durchgeführt. Nur solche Kandidaten wurden berücksichtigt, die bekannte Komponenten

des humane SMN-Komplexes als beste Treffer lieferten. Bei unklaren Verwandtschaftsverhältnissen, wie sie durch die häufigen Domänen in Gemin3 (DEAD-Box-Helikase) und Gemin5 (WD-repeats) verursacht wurden, erstellte Prof. Schultz ein phylogenetisches Kladogramm, um Orthologe von Paralogen zu trennen. Darüberhinaus wurde jedes Protein einzeln manuell in der nichtredundanten Datenbank und in der genomischen NCBI-Datenbank gesucht.

Die Analyse der Evolutionsgeschwindigkeit für die Gemin3- und Gemin5-Orthologen in Dipteren wurde ein Sequenzvergleich der Proteinsequenzen aller untersuchten Organismen erstellt und ein phylogenetischer Baum berechnet unter Verwendung von proml aus dem phylip Programmpaket [77]. Sowohl für Gemin3 wie für Gemin5 folgte der errechnete Stammbaum dem für die entsprechenden Spezies. Um zu untersuchen, ob die Evolutionsgeschwindigkeit der Dipteren signifikant von den übrigen Gemin3- oder Gemin5 Orthologen abweicht, wurde das codeml-Programm aus dem PAML-Paket benutzt [78]. Der errechnete Stammbaum wurde benutzt um zu fragen, wie gut zwei hypothetische Modelle die Daten erklären. In einem Fall wurde angenommen, dass über den gesamten Stammbaum eine konstante Evolutionsrate vorliegt. Im zweiten Modell wurde für den Zweig der Dipteren eine abweichende Geschwindigkeit erlaubt. Für beide untersuchte Gemine ergab sich eine schneller Evolutionsrate in den Dipteren. Zur Signifikanztestung wurde ein *log-likelihood ratio test* durchgeführt. Dazu muss die verdoppelte Differenz zwischen den log-likelihoods beider Modelle einen bestimmten Wert der Chi²-Verteilung überschreiten. Bei einem Freiheitsgrad (Evolutionsgeschwindigkeit) wurde für beide Gemine der Chi²-Wert von $p=0.001$ überschritten.

2.2.2. Laborsoftware

Die Erstellung aller Plasmid-Karten, Durchführung von BLAST-Suchen (Basic Local Alignment Search Tool [79]) und Erstellen von Sequenzvergleichen wurde mittels der VectorNTI 10 Software von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Zur Berechnung von Eigenschaften der Oligonukleotide und Peptide wurde das „Sequence Cruncher“ Plugin für Word benutzt (Barry Moore, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA).

2.3. Gentechnische Methoden

Für zahlreiche Klonierungen wurden cDNA-Klone vom *Drosophila* Genomic Resource Center der Indiana University (Bloomington, IN, USA) bezogen und die gewünschte codierende Sequenz unter Einfügung von Schnittstellen mittels präparativer Polymeraseket-

tenreaktion (PCR) amplifiziert und in das gewünschte Expressionsplasmid kloniert. Die dafür verwendeten cDNA-Klone, Primersequenzen und eingefügten Schnittstellen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Alle Konstrukte wurden im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg oder durch die Firma Medigenomix (Martinsried) vollständig sequenziert.

Genprodukt	DGRC Klon	Gen	5'-Primer	3'-Primer	Schnittstellen
dSMN	LD23602	<i>smn</i>	CATGCCATG- GCAATGTCCGACGA- GACGAACGC	ATTTGCGGCCGC- TFACTTCTTGGGTGTCTT TTTCTTTCC	NcoI NotI
dGemin2	LD47479	CG10419	CATGCCATGGCAATG- CAGCATGAGCCCGAAG	ATTTGCGGCCGCTTA- TATGTAATCCTTGAAAT- CATTCTGTGC	NcoI NotI
Dhh1	LD05563	Dhh1	CGGGATCCATG- GAGCGCGAAATAGCG	ATTTGCGGCCGCTTAG- TAATAGTTCTGTGTA- GATICTTGGC	NcoI NotI
Rigor mortis	SD03652	Rig	CATGCCATGGCAAT- GAACTCGCAGGTGATG- TACC	AAATGCGGCCGCTTAAT GCTCGGCAGTAGATC- CATTG	NcoI NotI
dU1 für T7-Transkription <i>in vitro</i>	Geschenk von Stephen M. Mount, University of Maryland, College Park, MD [80]		GGAATTCTAATAC- GACTCACTATAGGGA- TACTTACCTGGCGTA- GAGGTTAACCG	CCCAAGCTTA- GATCTCGGGACGGCGCG AACG	EcoRI (5') HindIII BglII (3')
dU85 für T7-Transkription <i>in vitro</i>	RT-PCR aus Schneider2 Zell Total-RNA		GGAATTCTAATAC- GACTCACTA- TAGGGTGCCCATGAT- GAAATATTCGACATCGG	CCCAAGCTTTGCGCTCA- GATTACTAAAGACGTCTG	EcoRI HindIII
dU1 aus analytischem RNA-PAGE			GGAATTCATACT- TACCTGGCGTAGAGG- TTAACCG	CCCAAGCTTA- GATCTCGGGACGGCGCG AACG	EcoRI HindIII BglII
dU2 aus analytischem RNA-PAGE			GGAATT- CATCGCTTCTCGGCCITTA TGGCTAAGATC	CCCAAGCTTGTGTGGCC GAAATCCCGGCGG	EcoRI HindIII
dU4 aus analytischem RNA-PAGE (Trunkation 5' und 3')			GGGAATTCTGAGGTGCG GTTATTGCTAGT- TGAAAACITTAACC	GTCACT- GCAGGGCTCCAAAAAT TGCCGTAGTGGACGG	EcoRI PstI
dU5 aus analytischem RNA-PAGE			GGAATT- CACTCTGGTTTCTCTTCA ATTGTCGAATAAATC	CCCAAGCTTGGCCCCAAA GGCAAATGCC	EcoRI HindIII

Tabelle 1: Primer-Paare, Quellen und Schnittstellen zur Klonierung

2.3.1. DNA-Präparation

Plasmid-Präparationen in unterschiedlichem Maßstab wurden mit den entsprechenden Kits der Fa. Macherey-Nagel (Düren) „Nucleospin Plasmid QuickPure“, „Nucleobond PC100 und PC 500“ durchgeführt.

2.3.2. Präparative Polymerasekettenreaktion

Zur präparativen Amplifikation codierender Sequenzen aus cDNA-Plasmiden wurde die 3'-5'-Exonuklease besitzende Pfu- (*Pyrococcus fulgidus*) Polymerase, im Einzelfall die Pwo- (*Pyrococcus woesei*) Polymerase benutzt:

50 ng	Plasmid-DNA
1 µl	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)/Pwo-Polymerase (1 U/µl)
20 pmol	5'-Primer
20 pmol	3'-Primer
1 µl	10 mM (je Deoxynucleotid) dNTP-Mix
5 µl	10X Pfu-Puffer
ad 50 µl	ddH ₂ O

In der Regel wurden 25 PCR-Zyklen durchgeführt, um eine Akkumulation eventuell fehlerhafter Produkte zu vermeiden. Die Hybridisierungstemperatur wurde in der Regel mindestens 6°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt. Denaturierung erfolgte bei 95°C für 30" je Zyklus, Elongation bei 68°C für 1 min/750 bp. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.3.5), visualisiert und das entsprechende Produkt ausgeschnitten. Die Gelelektion erfolgte im Allgemeinen mittels des „Nucleospin Extract II“-Kits (Macherey-Nagel), bei sehr kleinen Fragmenten mittels einer modifizierten Freeze/Squeeze-Technik [81, 82].

2.3.3. Restriktionshydrolyse von DNA

Der Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte gemäß der Herstelleranleitung als Doppelverdau bei 37°C für mindestens eine Stunde mit 1 U Enzym/µg DNA. Der Doppelrestriktionsverdau mit NcoI und NotI wurde in 2-fachem Tango-Puffer durchgeführt, wobei die NotI-Konzentration gegenüber der NcoI-Konzentration verdoppelt wurde. Um Religationen des Plasmid-Vektors zu verringern, wurde anschließend eine 5'-Dephosphorylierung für 1h bei 37° mit Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/Reaktion) durchgeführt. Sofern keine Gelelektrophorese erfolgte, wurde die DNA mit dem „Nucleospin Extract II“-Kit extrahiert.

2.3.4. Ligation von DNA

Zur Ligation des 5'-Phosphorylgruppen tragenden, verdauten PCR-Produkts mit den 3'-Hydroxygruppen des Plasmids wurden ca. 100 ng Plasmid mit sechsfach molarem Überschuss des PCR-Produkts unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (1 Weiss-Unit) bei 14°C gemäß Herstelleranweisung über Nacht inkubiert.

2.3.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 6-fach DNA-Ladepuffer aufgenommen, auf ein je nach Fragmentgröße 0,7 bis 2%-iges Agarosegel (1 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und bei ca. 15 mA/cm in einfachem TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Produkte erfolgte mittels UV-Licht im Bioprint DS-Geldokumentationssystem (LTF-Labortechnik, Freiburg) mit BioCapt-Software.

DNA-Ladepuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3)
 (6-fach) 0,03% (w/v) Bromphenolblau
 0,03% (w/v) Xylencyanol FF
 60% (v/v) Glycerol
 60 mM EDTA

TBE-Puffer: 89mM Tris pH 8.3
 (1-fach) 89mM Borsäure
 1 mM EDTA

2.3.6. Transformation von *E.coli*-Stämmen

Zur Klonierung wurde das Ligationsprodukt mittels Hitzeschock-Transformation in die kompetenten *E.coli*-Stämme DH5α (Invitrogen) oder XL1-Blue (Stratagene) eingebracht. Transformationskompetenz der Zellstämme wurde nach der von Inoue beschriebenen Methode erreicht [83]. Die bei -80°C gelagerten Aliquots wurden auf Eis aufgetaut, zur DNA gegeben und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 2 min 42°C ausgesetzt, mit 500 µl LB-Medium versetzt und erneut auf Eis für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 45 min bei 37°C schüttelnd inkubiert, bevor sie auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto Tryptone (Tryptisches Kasein-Hydrolysat)
 0,5% (w/v) Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)
 1% (w/v) NaCl

<u>LB-Agar:</u>	erhält man durch Zugabe von 1,4% Agar zu warmem LB-Medium
<u>Antibiotika:</u>	Stammlösungen (Endkonzentrationen in Klammern)
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser (100 µg/ml)
Kanamycin	25 mg/ml in Wasser (25 µg/ml)
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol (30 µg/ml)

2.3.7. PCR-Kolonie-Screening

Um jene *E.coli*-Klone zu identifizieren, bei welchen das gewünschte DNA-Fragment in den Plasmid-Vektor integriert war, wurde eine Anzahl Kolonien mittels PCR-Kolonie-Screening untersucht. Dies ermöglichte eine rasche und eindeutige Aussage bei geringen Kosten. Dazu wurde ein Primer-Mix mit 10 pmol der zur Klonierung verwendeten 5'- und 3'-Oligonukleotide in 10 µl ddH₂O hergestellt, in dem die jeweiligen Kolonie mit einem sterilen Holzstäbchen ausgeschüttelt wurde. Die jeweiligen Kolonien wurden auf einer Replikaplatte abgelegt. Anschließend wurden 10 µl 2-fach PCR-Ready Mix (Roche, Mannheim) hinzugefügt und eine PCR wie unter 2.3.2 beschrieben durchgeführt, jedoch mit 30 Zyklen und Elongation bei 72°C. Klone, welche das gewünschte Produkt enthielten wurden von der Replikaplatte in 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (siehe 2.3.6) angeimpft und eine Plasmid-Präparation aus 4 ml gesättigter Kultur durchgeführt (siehe 2.3.1).

2.3.8. Generierung von Expressionskonstrukten für *E.coli*

Zur prokaryotischen Expression von Proteinen wurden die codierenden Sequenzen der gewünschten Proteine regelmäßig in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Dabei nutzte ich am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) generierte Vektoren (Geschenk von A. de Marco, EMBL, Heidelberg). Das Plasmid pBAD-M11 codiert in 3' des Arabinose-Operators für ein N-terminales His₆-Tag gefolgt von einer Schnittstelle für die Protease des „Tobacco Etch Virus“ (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln) und einer „Multiple Cloning Site“ (MCS), welche mit NcoI beginnt. Die Lage und Erkennungssequenz (CCATGG) dieses Restriktionsenzym ist so beschaffen, dass sich ein Translationsstartcodon (ATG) ergibt, welches in vielen Fällen die Realisierung eines Fusionsproteins beginnend mit dem N-terminalen Methionin ermöglicht. Somit kann man ein strukturell und funktionell dem wildtypischen Protein ähnliches Verhalten des rekombinanten Proteins erwarten. Im Plasmid pET-M30 liegt an Stelle des Arabinose-Operators ein Promotor für die T7-RNA-Polymerase vor, gefolgt in 3' von einem Lac-Operator [84], so dass sich in

Bakterienstämmen, welche das Gen für die T7-Polymerase (unter dem *lacUV5*-Promotor) codieren, eine effiziente und stringente Expressionskontrolle erzielen lässt [85]. Anschließend beginnt die codierende Sequenz mit einem His₆-Tag, es folgt die Glutathion-S-Transferase (GST) und die TEV-Protease-Schnittstelle gefolgt von einer ähnlichen MCS wie in pBAD-M11. Somit erlaubten diese und abgeleitete Vektoren die rasche Subklonierung des einmal in die MCS eingebrachten Fragments unter einander. Prokaryoten besitzen im Gegensatz zu Eukaryoten (Ausnahme: IHRES tragende RNAs) die Möglichkeit, von einem Transkript zwei oder mehr Proteine zu translatieren. Diese Eigenschaft machte ich mir zu Nutze, um *Drosophila* SMN (dSMN) und *Drosophila* Gemin2 (dGemin2) von einem einzigen Plasmid zu exprimieren. Dazu wurde das Konstrukt dSMN:pBAD-M11 mit NotI und XhoI verdaut und ein Polylinker genanntes, doppelsträngiges, synthetisches DNA-Molekül ligiert. 20 pmol der synthetisierten Einzelstränge wurden dazu zuvor in einem 50 µl-Ansatz für 2 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min hybridisiert. Durch Ligation des Polylinkers wird die ursprünglich enthaltene NotI-Schnittstelle unbrauchbar. Dieses Konstrukt wurde nachfolgend NheI und NotI geschnitten und aus dem Vektor dGemin2:pET-M30 mit XbaI und NotI ein Fragment ausgeschnitten, welches ein für H₆-GST-dGemin2 codiert.

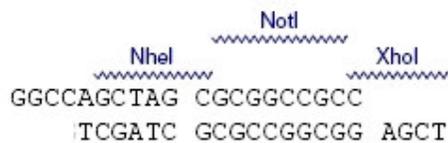


Abbildung 4: Polylinker-Dimer mit enthaltenen Restriktionsschnittstellen

2.3.9. Erzeugung des pMTagIt-Vektors zur Expression in Schneider2-Zellen

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines neuartigen Affinitätsepitops zur Aufreinigung makromolekularer Komplexe aus *Drosophila* Schneider2-Zellen. Ausgangspunkt der Klonierung war der Vektor pMTV5/HisA (Invitrogen). Um eine einfache Subklonierung aus bestehenden Konstrukten in pBAD-M11 und pET-M30 zu ermöglichen, wurde die *multiple cloning site* des Plasmid-Vektors pET28a (Merck Biosciences) mittels PCR amplifiziert und die Schnittstelle für KpnI in 5' eingefügt (*5'-MCS-Primer* und *T7-Terminator-Primer*, siehe Tabelle 2). Das PCR-Produkt wurde mit KpnI und XhoI verdaut und in den in gleicher Weise verdauten und dephosphorylierten Vektor pMTV5/HisA der Firma Invitrogen ligiert (Produkt: pMT-MCS-mod).

5'-MCS-Primer (+KpnI):	5'-CGGGGTACCGGGGCCATGGGACATAT GGGATCCGAATTCGAGCTC-3'
T7-Terminator-Primer	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG-3'
5'-SMN1-30-Primer (KpnI)	5'-CGGGGTACCAACATGGCGATGAGCAGCG-3'
3'-SMN1-30-Primer (TEV, NcoI)	5'-CATGCCATGGCGCCCTGAAAA TAAAGATTCTCATCATCGCTCTGGCCTG-3'

Tabelle 2: Primer-Sequenzen zur Generierung des Expressionsvektors pMTagIt

Die Vorgehensweise zur Generierung des Expressionsvektors ist im Text beschrieben.

Parallel wurde die codierende Sequenz des humanen SMN-Proteins mittels PCR so aus dem Plasmid SMN:pGex5X-1 amplifiziert [20], dass durch die Primer in 5' eine Schnittstelle für KpnI, eine für *Drosophila* optimierte Kozak-Sequenz [86, 87] sowie 3' die codierende Sequenz einer TEV-Protease-Schnittstelle gefolgt von einer NcoI-Schnittstelle eingefügt wurden (5'-SMN1-30-Primer und 3'-SMN1-30-Primer, siehe Tabelle 2). Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen KpnI und NcoI in den Vektor pMT-MCS-mod eingefügt (Produkt: pMTSMN1-30, siehe Abbildung 26). Somit ermöglicht der Vektor die mit Schwermetallsalzen (CuSO₄) induzierbare Expression des Fusionsproteins aus SMN1-30-TEV und dem gewünschten Produkt in *Drosophila* Schneider2- Zellen. Für die Experimente wurden die codierende Sequenzen von *Drosophila*-SMN (dSMN:pMTSMN1-30), *Drosophila*-dGemin2 (dGemin2:pMTSMN1-30), Dhh1 und Rigor mortis zwischen die NcoI- und NotI-Schnittstellen subkloniert (vgl. 2.3.1). Die Klonierungsstrategie und das Endprodukt sind in Abbildung 26, S. 92 wiedergegeben.

2.3.10. Präparation von Total-RNA aus Schneider2-Zellen

Zur Gewinnung von Total-RNA aus *Drosophila* Schneider2-Zellen [88] nutzte ich eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinium-Isothiocyanat (TriZol, Invitrogen [89]). Dazu wurden ca. 2×10^7 *Drosophila* Schneider-Zellen durch Zentrifugation pelletiert und ohne weiteres Waschen in 1,5 ml Trizol-Reagenz resuspendiert. Die Probe wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 0,3 ml Chloroform hinzugefügt und anschließend 15 s kräftig geschüttelt. Nach erneuter Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei 12000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen und mit 0,75 ml Isopropanol gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut zentrifugiert wie oben, der Überstand abgenommen und das Sediment mit 75% Ethanol gewaschen, bevor es erneut sedimentiert wurde. Nach

Abnahme des Überstands wurde das Sediment an der Luft getrocknet und in RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen. Aliquots zu 10 µg Gesamt-RNA wurden bei -80°C gelagert.

DEPC-Wasser: 450 ml demineralisiertes Wasser wurden mit 900 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht im Abzug gerührt. DEPC alkyliert dabei unspezifisch Proteine, so auch RNasen und inaktiviert diese so. Durch nachfolgende Autoklavierung wurde verbliebenes DEPC hydrolysiert und damit detoxifiziert.

2.3.11. Reverse Transkription (RT)

Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde eine gentechnisch veränderte Variante der Reversen Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV-RT) mit reduzierter RNase H-Aktivität und verbesserter Thermostabilität verwendet (Superscript II, Invitrogen). Diese Eigenschaften sollten die nachfolgende Amplifikation des RT-Produkts erleichtern. Zur Klonierung der dU85scaRNA wurden 2 µg Total-RNA aus Schneider2-Zellen mit 2 pmol transkriptspezifischem RT-Primer (TTGCGCTCAGATTACTAAAGACGTCG) eingesetzt. Das übrige Vorgehen erfolgte wie vom Hersteller für transkriptspezifische RT beschrieben. Die anschließende PCR folgte dem Protokoll unter 2.3.2.

2.3.12. Transkription *in vitro* radioaktiv markierter UsnRNAs

Zur Transkription *in vitro* von dU1snRNA, dU1ΔSm und dU85scaRNA wurden die codierenden Sequenzen unter Einfügung eines Promotors für die T7-RNA-Polymerase in den Vector pUc19c (gi:20141090) kloniert (siehe 2.3.1, Tabelle 1). Das Plasmid wurde anschließend mit BglIII (dU1), BssSI (dU1ΔSm) bzw. HindIII (dU85) linearisiert und die Transkription *in vitro* mit der T7-RNA-Polymerase in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

5 µl	5x Transcription buffer (Promega, Madison, WI, USA)
2,5 µl	100 mM DTT
2,5 µl	10 mM Capanalog (m7GpppG, Promega)
1-2 µg	linearisierte DNA
je 1 µl	2,5 mM GTP/ATP/CTP/UTP
1 µl	RNasin (Promega)
1 µl	T7-RNA-Polymerase (10 U/µl, Promega)
1 µl	[α ³² P]-UTP
ad 25 µl	ddH ₂ O

2. Materialien und Methoden

Der Ansatz wurde bei 37°C 1h inkubiert, anschließend ein weiterer Mikroliter T7-RNA-Polymerase hinzugefügt und erneut für 30 min inkubiert. Die Produkte wurden dann auf einem denaturierenden RNA-PAGE aufgetrennt (2.3.13) und eluiert (2.3.14).

2.3.13. Denaturierende RNA-PAGE

Zur Auftrennung von radioaktiv markierter oder aus Affinitätsreinigungen erhaltener RNA unter denaturierenden Bedingungen wurden diese für 2 min bei 95°C oder 10 min bei 70°C in RNA-Probenpuffer denaturiert. Die RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde dann unter ca. 8 M Harnstoff in 20cm x20 cm x 1mm Gelen bei 45 mA durchgeführt.

RNA-PAA-Gel (8 M Harnstoff, 5% Polyacrylamid):

(denaturierend)	6,25 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1 AA:BA)
	24 g	Harnstoff
	10 ml	5-fach TBE
	500µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
	50µl	(N,N,N',N') Tetraethylmethyldiamin (TEMED)

RNA-Probenpuffer:

(denaturierend)	90% (v/v) Formamid
	0,025% (w/v) Xylencyanol
	0,025% (w/v) Bromphenolblau

2.3.14. Elution von DNA und RNA aus denaturierenden Gelen

RNA wurde im Gel durch nachfolgende Ethidiumbromidfärbung (1µg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O) bzw. Autoradiographie visualisiert, die entsprechenden RNA-/DNA-Spezies ausgeschnitten und aus dem Gel mit 400 µl RNA-Elutionspuffer bei 4°C über Nacht eluiert. Die DNA im Eluat wurde anschließend mit 1 ml Ethanol und Zusatz von 40 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 (RNA: 5 M Ammoniumacetat, 20 µg Glycogen) gefällt, bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugiert, in 70% Ethanol gewaschen und in einer SpeedVac getrocknet.

<u>RNA-Elutionspuffer:</u>	300 mM	Natriumacetat
	2 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS

2.3.15. Northern-Blot und Hybridisierung

Als Ergänzung der RT-PCR wurde die Gegenwart oder Abwesenheit bestimmter RNAs mittels Northern-Blot nachgewiesen. Dazu wurde die mittels denaturierender PAGE aufgetrennte RNA in 1x TBE-Puffer auf eine Hybond N-Membran (GE Life Sciences) bei 0,8 mA/cm² übertragen. Die Membran wurde anschließend mit RapidHyb-Hybridisierungspuffer (GE Life Sciences) bei 42°C in einem Hybridisierungssofen für 30 min blockiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Oligonukleotid-Sonde in RapidHyb-Puffer für 2h bei 42°C hybridisiert. Nach Abnahme der Sonde wurde die Membran 3 x in der Hybridisierungsröhre mit 1x SSC-Puffer gewaschen, in eine Schüssel überführt und erneut für kurze Zeit gewaschen. Die Membran wurde anschließend auf Kodak MS-Film exponiert.

Präparation von Hybridisierungssonden:

3 µl	γ -[³² P]-ATP (10 µCi/µl)
1 µl	PNK-Puffer A
1 µl	Oligonucleotid (10 pmol/µl)
1 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
4 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, in Formamid-Puffer aufgenommen, bei 70°C für 10 min denaturiert und in der denaturierenden RNA-PAGE aufgetrennt (siehe 2.3.13). Nach Gelelektion (siehe 2.3.14) wurden die Oligonukleotide gefällt und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

SSC-Puffer (1-fach): 150mM NaCl, 15mM Natriumcitrat

Sonde	Sequenz
dU1	GCCTTCGTGATCACGGTTAAC
dU2	GTTGTCCTCCAATGGAGGAAC
dU4	GCACCTCAGGAGGACTTCATTG
dU5	GACTCATTAGAGTGTTCCTCTCC
Met-tRNA _i	GCAGAGCAAGGTTTCGATCCTC

Tabelle 3: DNA-Oligonukleotidsonden für Northern-Blot

2. Materialien und Methoden

2.3.16. Native RNA-PAGE/EMSA

Um die Bildung von UsnRNP core Partikeln im „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ zu verfolgen, wurde die native RNA-Gelelektrophorese eingesetzt ähnlich wie von Meister et al. [20] beschrieben. Die entsprechende Proteinpräparation oder affinitätsgereinigter *Drosophila* SMN-Komplex (siehe 2.4.2) wurde dazu für 60 min bei 27°C inkubiert, der Versuchsansatz anschließend mit einem gleichen Volumen nativem RNA-Probenpuffer versetzt und auf das native RNA-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der Probenpuffer enthielt hohe Konzentrationen Heparin zur Verminderung unspezifischer RNA-Proteinbindungen und Harnstoff, um die Stabilität des entstehenden UsnRNP core Partikels unter denaturierenden Bedingungen zu untersuchen. Zusätzlich wurden als Kompetitor je 1 µg tRNA zugefügt.

<u>RNA-Probenpuffer</u>	16% (v/v)	Glycerol
(nativ)	10 mg/ml	Heparin
	4 M	Harnstoff
	0,025% (w/v)	Xylencyanol
	0,025% (w/v)	Bromphenolblau
<u>RNA-PAA-Gel:</u>	4% Glycerol, 5% Polyacrylamid	
(nativ)	18,75 ml	20% Acrylamid/Bisacrylamid (80:1 AA:BA)
	15 ml	5-fach TBE
	3,45 ml	86% Glycerol
	37,8 ml	ddH ₂ O
	750 µl	APS
	75 µl	TEMED

2.4. Zellkulturtechniken

2.4.1. Kultur von *Drosophila* Schneider2-Zellen

Schneider2-Zellen sind von 20-24 Stunden alten *Drosophila*-Embryonen abgeleitete Zellen, die zu 60-80% tetraploid sind und ein XX-Genom besitzen [88]. Sie wachsen zunächst als Monolayer, man beobachtet jedoch unabhängig vom Alter der Kultur einen unterschiedlich großen Anteil vitaler Zellen in Suspension. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Kultur erfolgte in Schneider's *Drosophila* Medium (biowest, Nuaille, Frankreich) supplementiert mit 10% Kälberserum (PAA, Linz, Österreich) und 1% Penicillin/Streptomycin-Stammlösung

(Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10 mg/ml, PAA) bei 27°C im verschlossenen Kulturgefäß ohne CO₂-Zufuhr. Zur Passage wurden die Zellen vom Boden unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Hartenstein, Würzburg) abgelöst und bei 700x g für 2 min in einer Eppendorf 5804R-Tischzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde nach Abnahme des Überstands in einem geeigneten Volumen frischen Mediums resuspendiert und die Zellen in neue Kulturflaschen überführt.

Um größere Mengen Zellmaterial zu erhalten, wurden die Kulturen bis auf drei 150 cm²-Flaschen expandiert und anschließend in 0,5 l-Dreiwegerührflaschen überführt (Glasbläseerei Jürgen Höhn, München; Impeller hergestellt von der Werkstatt des Biozentrums). Die Durchmischung erfolgte bei 116 rpm auf einem Variomag Biosystem 4 (Thermo Electron, Oberschleißheim) bei verschlossenen Zuluftöffnungen. Während der Kultur wurde das Mediumvolumen nach zunächst 2-3 Tagen verdoppelt und die Kultur rasch in 1,5 l und 2,5 l-Rührflaschen überführt, so dass diese zu maximal 40% des Nennvolumens gefüllt waren, um den Gasaustausch zu gewährleisten.

2.4.2. Herstellung stabil transfizierter Schneider2-Zelllinien

Die Transfektion von Schneider2-Zellen erfolgt nach der klassischen Calciumphosphat-Methode [90]. Durch langsames Vereinigen einer Calciumchloridlösung mit einem phosphathaltigen Puffer (HBS, HEPES-buffered saline) kommt es aufgrund des niedrigen Löslichkeitsprodukts zur Bildung von Calciumphosphatpräzipitaten, an welche sich die zu transfizierende DNA anlagert. Durch die rege endozytotische Aktivität der Zellen werden die Präzipitate internalisiert und in einem nicht im Einzelnen bekannten Vorgang kommt es zur intrazellulären Freisetzung der DNA. Dem mittels des auch für Eukaryoten toxischen Peptidylnucleosids Blastocidin-S ausgeübten Selektionsdruck können allein solche Zellen widerstehen, welche das kotransfizierte Plasmid pCoBlast (Invitrogen) aufgenommen haben. Dieses kodiert für die Blastocidin-Deaminase aus *B. cereus*. Fortgesetzter Selektionsdruck führt zur stochastischen Integration des Resistenzplasmids zusammen mit dem Expressionskonstrukt in das Genom der Zelle, wo es regelmäßig in Form von Arrays vorliegt ([91] und Referenzen darin). Schneider2-Zellen wurden dazu auf 6-well-Platten zu 10⁶ Zellen/cm² ausplattiert und über Nacht kultiviert. Je Napf (Durchmesser 35 mm) wurden angesetzt:

2. Materialien und Methoden

Gefäß A: 9µl 2 M CaCl₂
5 µg DNA (Expressionsplasmid:pCoBlast=20:1)
ad 75µl mit ddH₂O

Gefäß B: 75 µl 2-fach HBS

Der Inhalt von A wurde langsam (Dauer ca. 2 min) unter ständigem Durchmischen (Antippen) des Gefäßes in B getropft und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat tropfenweise zu der Zellkultur hinzugeben und diese über Nacht bei 27°C inkubiert. Nach einem Tag wurden die Zellen vom Boden abgeschabt und 2 min bei 700 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellsediment in PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Schließlich wurden die Zellen in Selektionsmedium aufgenommen und weiter kultiviert. Das Selektionsmedium enthielt 50% konditioniertes Medium und 25 µg/ml Blasticidin S (Invivogen, Toulouse, Frankreich). Durch Zusatz konditionierten Mediums wurde eine Selektion auf Toleranz von Wachstumsfaktormangel unterbunden. Nach weiteren Mediumwechseln in demselben Kulturgefäß war nach 3 Wochen das Auftreten resistenter Klone zu beobachten. Ohne diese zu vereinzeln wurde die Kultur expandiert und die Expression des gewünschten Proteins im Immunoblot untersucht. Hierzu wurde die gewünschte polyklonale Zelllinie in eine 12-well-Platte eingesät und anschließend in einer Konzentrationsreihe mit CuSO₄ für 24 h induziert. Der Inhalt eines Nöpfchens wurde abzentrifugiert, in PBS gewaschen und mit 25 µl Lysepuffer für 10 min bei 30°C inkubiert. Nach Ermittlung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test (siehe 2.5.10) wurde eine jeweils identische Menge Gesamtprotein auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot untersucht.

Zur präparativen Aufreinigung von Proteinkomplexen wurde die Kultur auf mindestens 2 l expandiert (2.4.2) und mit der ermittelten Kupfersulfatkonzentration für 24 h induziert. Die Zellen wurden in einem JA8.100-Rotor in einer Beckman Avanti J20-XP bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Sediment in PBS gewaschen, in einen konischen Becher überführt, erneut in einer Beckman J6-B bei 4000 rpm sedimentiert, in 50 ml-Einmalgefäße zu Aliquots von 2-4 g überführt und erneut bei 1000 g für 10 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach Abnahme des PBS wurden die Zellen zu Extrakt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der Gasphase eines Stickstofftanks gelagert.

2-fach HBS: 50 mM HEPES/NaOH pH 7,1
(sterilfiltriert) 1,5 mM Na₂HPO₄
280 mM NaCl

<u>Lysepuffer:</u>	50 mM	TrisHCl, pH 7.8
	150 mM	NaCl
	1%	Igepal CA-630

2.5. Proteinchemische Methoden

2.5.1. SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinproben nach ihrer Größe wurde die SDS-PAGE angewandt. Für einige Anwendungen wurde das diskontinuierliche Lämmli-Gelsystem [92] genutzt, wie häufig beschrieben (z.B. in [93]). In der Regel wurde jedoch auf ein Bis-Tris-Gelsystem zurückgegriffen. Als Vorteile sehe ich eine in meinen Händen bessere Reproduzierbarkeit sowie die längere Lagerfähigkeit vorgegossener Gele (identischer pH in Sammel- und Trenngel) und die schnelle Durchführung der Elektrophorese. Diese wurde in einer BioRad MiniProtean III-Kammer bei 80 mA/Gel und 50W/Gel für ca. 35 min durchgeführt. Für massenspektrometrische Untersuchungen griff ich auf die NuPage-Gele der Firma Invitrogen zurück. Die Elektrophorese erfolgte in einer XCell SureLock-Zelle nach Herstellerangabe. Für vier MiniProtean-Gele setzte ich ein:

<u>Trenngel (12%):</u>	5,7 ml	1,25 M Bis-Tris pH 6,8
	8 ml	30% Acrylamid- Bisacrylamid-Lösung (37,5:1AA:BA)
	6,13 ml	ddH ₂ O
	133 µl	APS
	33 µl	TEMED
<u>Sammelgel:</u>	2,26 ml	1,25 M Bis-Tris pH 6,5-6,8
	1,33 ml	30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1 AA:BA)
	4,27 ml	ddH ₂ O
	40 µl	APS
	20 µl	TEMED
<u>MOPS-Laufpuffer:</u>	500 mM	Morpholino-O-Propansulfonsäure (MOPS)
	500 mM	Tris-hydroxyaminomethan (Tris-Base)
	10 mM	Di-Natrium-EDTA
	1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	keine pH-Einstellung erforderlich	
	5 mM	Natrium-Disulfit
	(frisch zugesetzt aus 1 M Stammlösung in ddH ₂ O)	

2. Materialien und Methoden

<u>5X SDS-Probenpuffer:</u>	50 mM	Tris pH 6,8
	2% (w/v)	SDS
	84 mM	β -Mercaptoethanol
	20% (v/v)	Glycerin
	0,04% (v/v)	Bromphenolblau

2.5.2. Coomassie-Färbung

Zur Darstellung von Proteinen im SDS-PA-Gel wurde die Coomassie-Färbung angewandt. Dieser hydrophobe blaue Farbstoff bindet Proteine unspezifisch und an die meisten Proteine gleich gut (vgl. mit Silberfärbung, [94]). Die Färbung erfolgte mit der Coomassie-Lösung für ca. 20 min, anschließend wurde das Gel für ca. 1 Stunde entfärbt.

<u>Coomassie-Lösung:</u>	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	0,1% (w/v)	Coomassie Blue R250

Entfärber: *idem*, jedoch ohne Coomassie Blue R250

2.5.3. Silberfärbung

Die Silberfärbung beruht auf Anlagerung von Ag^+ -Ionen an Proteine, die beim Entwickeln zu metallischem Silber reduziert werden, wodurch sich weiteres metallisches Silber anlagert. Für die Zwecke der Proteinmassenspektrometrie eignen sich unterschiedliche Methoden unterschiedlich gut [95], es wurde daher das Protokoll nach Merril angewandt [96]. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für mindestens 2 h bei Raumtemperatur fixiert, anschließend dreimal für je 15 min in 50% Ethanol gewaschen, mit 0,2 g/l Natriumthiosulfat für 60 s inkubiert, dreimal mit ddH_2O für je 20 s gewaschen, mit Silberlösung für 20 min imprägniert, erneut zweimal mit ddH_2O gewaschen und entwickelt. Die Reaktion wurde mit Fixierer ohne Formaldehyd abgestoppt und das Gel dann in 50% Methanol überführt.

<u>Fixierlösung:</u>	50% (v/v)	Methanol
	12% (v/v)	Essigsäure
	0,05% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung

<u>Silberlösung:</u>	2 g/l	Silbernitrat
	0,075% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung

<u>Entwickler:</u>	60 g/l	Natriumcarbonat (wasserfrei)
	0,05% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung

2.5.4. Western-Blot und Amidoschwarz-Färbung

Das Prinzip des Elektrobloottransfers von Proteinen aus Polyacrylamidgelen wurde von Towbin eingeführt [97]. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dazu auf eine in 100% Methanol äquilibrierte PVDF-Membran (Pall Corp., Ann Arbor, MI, USA) aufgelegt, gefolgt beidseits von drei Lagen Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), das in Transferpuffer äquilibriert war. Der Blottransfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 2 h. Anschließend wurde die Membran mit Amidoschwarz für 10 min gefärbt. Nach Entfärbung mit 90% Methanol, 3% Essigsäure wurden die angefärbten Proteine dokumentiert.

<u>Transferpuffer:</u>	25 mM	Tris HCl
	192 mM	Glycin
	0,1%	SDS
	20% (v/v)	Methanol

Färbelösung Amidoschwarz:

	0,2% (w/v)	Amidoschwarz
	10% (v/v)	Methanol
	2% (v/v)	Essigsäure

2.5.5. Immunoblot-Analyse

Die mit Amidoschwarz gefärbte PVDF-Membran wurde anschließend mit 5% Magermilchpulver in TBS-T für 30 min inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde sie dreimal mit TBS-T gewaschen und mit dem jeweiligen Primärantikörper in einer Verdünnung von zumeist 1:100 in NET-Gelatinelösung über Nacht bei 4°C oder für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und mit dem 1:5000 in TBS-T verdünntem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Sigma) für 30 min bei Raumtemperatur zusammengebracht. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die selbst angesetzte Chemilumineszenz-Lösung oder das ECL-Reagenz der Firma GE Life Sciences aufgebracht und das Resultat auf Röntgenfilm (CEA RP NEW, Fa. Noras, Würzburg) dokumentiert.

<u>TBS-T:</u>	137 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	50 mM	TrisHCl, pH 8,0
	0,5% (v/v)	Tween 20

2. Materialien und Methoden

<u>NET-Gelatine:</u>	150 mM	Natriumchlorid
	5 mM	EDTA
	50 mM	TrisHCl pH 7,5
	0,05% (v/v)	Triton X-100
	0,01% (w/v)	Natriumazid

Chemilumineszenzlösungen:

Lösung 1:	6,8 mM	Coumarsäure in DMSO
Lösung 2:	1,25 mM	Luminol
	100 mM	TrisHCl pH 8,5
Lösung 3:	30% (v/v)	Wasserstoffperoxid
Ansatz:	100 µl Lösung 1 + 10 ml Lösung 2 + 10 µl Lösung 3	

2.5.6. Proteinexpression in *E.coli*

Grundlage u.a. der Rekonstitutionsversuchen und der Erzeugung polyklonaler Antikörper war die rekombinante Expression von Proteinen in *E.coli*. Dazu wurde meist der Bakterienstamm Rosetta II (Novagen) genutzt. Dieser besitzt ein genomisches Integrat eines Fragments des λ -Phagenstamms DE3 und ein Chloramphenicol-Resistenz vermittelndes Plasmid welches für die in *E.coli* unterrepräsentierten tRNAs AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA codiert [98]. Für Konstrukte in pBAD-M11 wurde die Lysogenität für λ DE3 nicht genutzt. Die Expressionskonstrukte (siehe 2.3.8) wurden mittels Hitzeschock transformiert (siehe 2.3.6) und der Expressionsstamm in einer Vorkultur in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C und 140 rpm expandiert. Anschließend wurden 2 l SB-Medium enthaltende schikanierte 5 l-Flasken mit 1% (v/v) Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 150 rpm kultiviert. Durch Zugabe von 1% Glucose sollte eine „leaky expression“ vermieden werden [99]. Bei $0,6 \leq OD_{600} \leq 0,8$ wurde die Kultur auf 16°C abgekühlt und die Expression durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG; für pET-M30) bzw. 0,02% (w/v) Arabinose (für pBAD-M11) gestartet. Gleichzeitige Zugabe von 1% (v/v) Ethanol sollte eine Hitzeschockantwort bei den Zellen bewirken, um eine korrekte Proteinfaltung zu favorisieren. Vor Induktion sowie in einstündlichen Abständen nach Beginn der Induktion wurden Proben von 1 ml Kultur abgenommen, die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert, das Sediment in 200 µl 7M Harnstoff resuspendiert, mit 50 µl 5-fach SDS-Probenpuffer bei 95°C für 2 min denaturiert und davon 5-10 µl-Aliquots auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (2.5.2).

SB-Medium: 3,5 % (w/v) Bacto Tryptone
 2,0% (w/v) Bacto Yeast Extract
 0,5% (w/v) NaCl

2.5.7. Affinitätsreinigung von His₆-Tag-Fusionsproteinen

Das Hexahistidin (His₆)-Tag eignet sich hervorragend als Affinitätstag zur Aufreinigung rekombinanter Proteine auch in größerem Maßstab. Dazu werden Schwermetallionen, in der Regel Nickel²⁺, durch eine chelierende Matrix, heute meist an Agarose kovalent gebundenes Nitrilotriacetat (NTA), immobilisiert. Man bedient sich des Umstands, dass die Imidazol-Ringe des Hexahistidin-Tags den Chelatkomplex um das Nickel²⁺-Ion zu einem 6-fach koordinierten Komplex vervollständigen können, so dass das Protein mit hoher Affinität an der stationären Ni-NTA-Phase immobilisiert wird. Die Elution erfolgt folgerichtig durch Konkurrenz mit hohen Konzentrationen (300 mM) Imidazol.

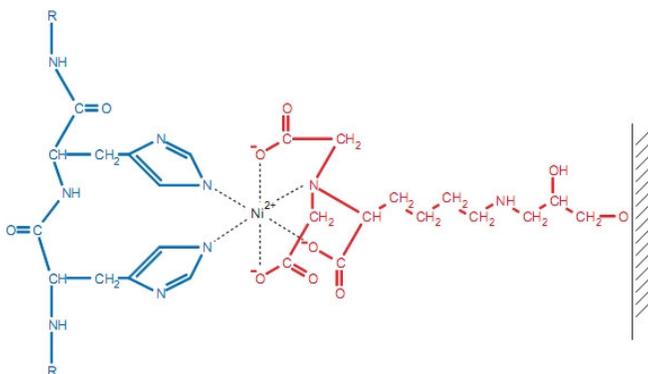


Abbildung 5: Prinzip der NiNTA-Reinigung mit His₆-getagtem Protein

In rot wiedergegeben ist das kovalent an die Matrix gebundene Nitriloacetat, in blau ein Ausschnitt aus dem His₆-getagtem Protein. Abbildung aus [100].

In dieser Arbeit wurden die Antigene dSMN und dGemin2 als His₆-GST-Fusionsproteine im Rosetta II-Stamm wie beschrieben (siehe 2.5.6) exprimiert (2x2 l Kultur). Nach Abzentrifugation bei 4000 rpm in einer Beckman L8-80M-Zentrifuge (4°C, 15 min) wurde das Sediment in 2 Aliquots à 25 ml His₆-Aufschlusspuffer aufgenommen und durch Beschallung mit einem Branson Sonifier 250 (50% Duty Cycle, Output Control 8) in 10 Zyklen à 30 s Beschallung gefolgt von 30 s Pause auf Eis lysiert. Das Lysat wurde anschließend in einer Beckman-Coulter Optima L-80 XP Ultrazentrifuge mit dem Rotor 45Ti bei 40000 xg für 30 min geklärt und der Überstand mit 1 ml Ni²⁺-NTA-Sepharose (GE Life Sciences) für 2 h bei 4°C auf einem Überkopffrotor inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 2500 rpm in einer Eppendorf 5804R-Tischzentrifuge für 2 min bei 4°C pelletiert, das Lysat ab-

genommen und die Matrix einmal mit 50 ml und zweimal mit 25 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Nach Überführung der Matrix in eine Polyprep-Säule (BioRad, München) wurden 1 ml-Fractionen mit Elutionspuffer eluiert. Die das Protein enthaltenden Fractionen wurden vereinigt und die Proteinreinheit und -konzentration mittels UV-Spektrometrie ermittelt. Um ungetaggte Proteine für die Immunisierung zu gewinnen, wurde das His₆-GST-Tag mit 1 mg TEV-Protease je 50 mg Proteinpräparation über Nacht inkubiert und anschließend das freigesetzte Tandem-Tag, ungeschnittenes Protein sowie die ebenfalls His₆-getaggte TEV-Protease über Ni²⁺-NTA-Sepharose abgetrennt und der das unfusionierte rekombinante Protein enthaltende Durchfluss gesammelt. Nach Dialyse (Spectrapor, MWCO 6-8000, Spectrum Laboratories, Laguna Hills, CA, USA) gegen PBS wurde die Proteinpräparation zur Immunisierung von je 2 Kaninchen durch die Fa. Immunoglobule (Himmelstadt) benutzt.

His-Aufschlusspuffer:

20 mM HEPES-NaOH pH 8,0

500 mM NaCl

10 mM Imidazolchlorid

5 mM β -Mercaptoethanol

His-Elutionspuffer: *idem*, jedoch 300 mM Imidazol

2.5.8. Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper anti-dSMN und anti-dGemin2

Die verwendeten Expressionskonstrukte verfügten neben einem His₆-Tag auch über einen Fusionsanteil aus Glutathion-S-Transferase (GST), welche die Bindung an immobilisiertes Glutathion erlaubt [101]. Entsprechend wurde das Sediment der Expressionskultur in GST-Aufschlusspuffer aufgenommen und wie beschrieben lysiert und geklärt (siehe 2.5.7). Nach Bindung an 1 ml Glutathion-Sepharose (GE Life Sciences) wurde die Matrix in GST-Aufschlusspuffer gewaschen wie beschrieben, anschließend in 10 ml 0,2 M Dinatriumtetraborat pH 8,0 zunächst gewaschen und dann resuspendiert. Dann wurde der homobifunktionelle Quervernetzer Dimethylpimelimidat als Festsubstanz zu einer Endkonzentration von 10 mM hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 min auf einem Taumelschüttler inkubiert, um kovalente Bindungen zwischen Glutathion-Sepharose und Fusionsprotein auszubilden [102]. Hernach wurde die Matrix durch Zentrifugation (2500 xg, 2 min in Eppendorf 5804R) abgetrennt, in 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur in Ethanolaminlösung inkubiert, um verbleibende reaktive Gruppen ab-

zusättigen. Anschließend wurde die Matrix in PBS äquilibriert und mit 10 ml Serum für 2 h inkubiert. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte nach mehrfachem Waschen mit PBS durch pH-Schock mit 0,1 M Glycin pH 2,7 in 1/10 Elutionsvolumen vorgelegten 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8. Antikörper enthaltende Fraktionen wurden im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und gegen 50 Vol. PBS bei 4° C über Nacht dialysiert.

GST-Aufschlusspuffer: wie His-Aufschlusspuffer, jedoch ohne Imidazol

2.5.9. Affinitätsreinigung des monoklonalen Antikörpers 7B10

Die Affinitätsreinigung des gegen humanes SMN-Protein gerichteten monoklonalen Antikörpers 7B10 erfolgte zunächst wie in [20] beschrieben, indem das Fragment SMN1-160 vom Plasmid SMN1-160:pGEX5X1 als GST-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert wurde. Der Hybridoma-Kulturüberstand wurde dann wie beschrieben affinitätsgereinigt. Nach Isotypisierung des Antikörpers (vgl. 7.1) wurde ein alternatives Verfahren angewandt. Es beruht auf der selektiven Bindung von Maus-Immunglobulinen dieses Isotyps an Protein-A-Sepharose unter Bedingungen, unter denen die Affinität für andere im Kulturüberstand enthaltene Antikörper gering ist (vgl. 7.1).

2.5.10. Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration eignete sich aufgrund des einfachen Prinzips die von Bradford [103] angegebene Methode: Die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt deren Absorptionsmaximum auf 595 nm, so dass die hier gemessene Absorption der eingesetzten Proteinmenge proportional ist. Zur Messung wurde zunächst eine Eichkurve über 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg Rinderserumalbumin (BSA) im BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) aufgenommen. In derselben Weise wurden dann 5 µl Probe mit ddH₂O auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad) versetzt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 295 nm gemessen. Das Gerät errechnete dann aus der gespeicherten Regressionsfunktion die Proteinkonzentration.

2.5.11. Glycerolgradientenzentrifugation

Zur relativen Größenbestimmung von Proteinkomplexen im Zellextrakt wurde die Glycerolgradientenzentrifugation angewandt, die auf der differentiellen Sedimentation von Molekülen in einem Gravitationsfeld beruht. Dazu wurde ein kontinuierlicher Gradient in ei-

nem Gradient Master (Biocomp, Fredericton, NB, Kanada) aus Stammlösungen von 5% und 30% (v/v) Glycerol in PBS nach der mitgelieferten Referenztabelle gebildet. 200 µl Schneider2-Zellextrakt wurden mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze auf den Gradienten aufgetragen und bei 38500 rpm für 5 h bei 4°C in einem Sw60Ti-Rotor zentrifugiert. Fraktionen zu 250 µl wurden manuell von oben abgenommen und die Proteine in 20% (w/v) Trichloressigsäure über Nacht auf Eis gefällt. Nach Pelletierung in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 12000 rpm wurde das Sediment in eiskaltem TCA-Waschpuffer gewaschen, hernach für 2h bei 50°C in SDS-Probenpuffer resuspendiert und mittels Immunoblot analysiert.

<u>TCA-Waschpuffer:</u>	70% (v/v)	Aceton
	20% (v/v)	Ethanol
	50 mM	Tris HCl pH 8,0

2.6. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Verarbeitung der Immunfluoreszenzproben erfolgte wie ausführlich beschrieben [104, 105]. Zur mikroskopischen Analyse kam ein inverses Auflichtfluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen) mit den Zeiss-Standardfiltersätzen im Verbund mit einer AxioCam MRm und der Bildaufnahmesoftware AxioVision 4.6 zum Einsatz. Für konfokale Laserscanningmikroskopie wurde ein Leica TCS SP2 AOBS verwendet (Standort: Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Biozentrum der Universität Würzburg). Die dreidimensionale Rekonstruktion der Schnittbilder erfolgte mittels ImageSurfer (<http://152.19.37.82>; University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA).

2.7. Proteintandemmassenspektrometrie (Protein-MS/MS)

Das Verfahren der Proteintandemmassenspektrometrie dient der Identifizierung unbekannter Proteine und wurde einer breiten Anwendung erst durch die Verfügbarkeit komplett sequenzierter Genome und Verbesserungen der Messapparaturen in den letzten Jahren zugänglich [106, 107]. Wie für eine neue Technologie kennzeichnend, bestehen gegenwärtig zahlreiche teils konkurrierende Verfahren. Im Folgenden seien kurz die in dieser Arbeit eingesetzten Techniken skizziert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch Julia Wiesner am Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin. Zum Einsatz kam ein LTQ XL Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich), das direkt mit einer Flüssigchromatographie zur Konzentrierung der Probe gekoppelt war (LC-MS/MS).

Im Einzelnen wurden die Proteine von Interesse aus dem Gel ausgeschnitten, gewaschen, mit DTT reduziert und mit Jodacetamid alkyliert. Es erfolgte im Gel der enzymatische Verdau (hier mit Trypsin, das C-terminal von Arginin- und Lysin hydrolysiert) und die Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie in Trifluoressigsäure aufgenommen. Die Peptide wurden (durch Elektronenspray-Ionisation, ESI) ionisiert, in einer (linearen) Ionenfalle gesammelt und die Peptide dann in einem „peptide mass fingerprint“ übersichtsweise analysiert (MS). Einzelne Peptide wurden dann aus der Ionenfalle selektiert, durch Kollision mit Helium-Atomen fragmentiert („collision induced decay“, CID) und die Fragmentionen erneut massenspektrometrisch analysiert (MS/MS). Die auf diese Weise (aus den Fragmentionen) abgeleiteten Peptidsequenzen wurden dann mit einem *in silico*-Verdau der aus der Flybase-Datenbank abgeleiteten Proteinsequenzen verglichen und Treffer mit einem MASCOT-Score über 40 für die weitere Analyse ausgewählt.

3. ERGEBNISSE

Ausgangspunkt dieser Studie war die Hypothese, dass der beim Menschen aus acht Geminen und UNRIP bestehende SMN-Komplex in evolutionär älteren Organismen einfacher aufgebaut sein sollte. Es wurden daher bioinformatisch die vollständig sequenzierten Genome verschiedener Spezies untersucht. Das UNRIP-Protein wurde wegen seiner transienten Interaktion mit dem SMN-Komplex im Zytoplasma und seiner diversen Funktionen [42, 108, 109] nicht in die Untersuchung eingeschlossen. Eine Schwierigkeit der Genomanalyse unter evolutionären Gesichtspunkten besteht in der uneinheitlichen biologischen Systematik. Weitgehend orientiert sich diese Arbeit an dem von Embley und Martin [110] nach Adl et al. [111] angegebenen Kladogramm. Hier seien die ausgewählten Modellorganismen kurz benannt und phylogenetisch eingeordnet. Neben dem Referenzorganismus Mensch wurde als Vertebrat der Zebrafisch *Danio rerio* ausgewählt, da er als SMA-Modell vergleichsweise gut charakterisiert ist. Das Lanzettfischchen *Branchiostoma floridae* wird zu den Cephalochordaten gerechnet, ist aber – anders als Mensch und Zebrafisch - kein Vertebrat. Die Schlauchseescheide *Ciona intestinalis* als Urochordat (Synonym: Tunicat) sollte aufgrund ihrer phylogenetisch nahen Verwandtschaft mit den Cephalochordaten Rückschlüsse auf den letzten gemeinsamen Vorfahren aller Chordaten zulassen. Für die übrigen Neumünder (Deuterostomia) wurde der Purpurseeigel *Strongylocentrotus purpuratus* aufgenommen. Einen artenreichen Zweig der Bilateria (Zweiseitentiere) bilden die Arthropoden, die mit den Nematoden den Protostomia (Urmünder) zuzuordnen sind. Neben den Genomen der Dipteren *Anopheles gambiae* und *Drosophila melanogaster* (Taufliege) standen Genomdaten zu den Hymenopteren *Apis mellifera* (Honigbiene) und zu der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis* zur Verfügung. Auch erste Daten zum Roten Mehlkäfer *Tribolium castaneum* waren vorhanden. Als weiterer invertebrater Modellorganismus wurde der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* in die Analyse aufgenommen. Das radiärsymmetrische Nesseltier *Nematostella vectensis* bildete das niederste der untersuchten Tiere. Aus dem Reich der Pilze wurden die Genome der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* ausgewählt. Neben diesen Askomyzeten (Schlauchpilzen) wurde der Basidiomyzet (Ständerpilz) *Laccaria bicolor* (Zweifarbiger Lacktrichterling) einbezogen. *Dictyostelium discoideum* ist ein Schleimpilz, der als biologisches Modellsystem für den Übergang vom Einzeller zum Vielzeller genutzt wird, da sein Lebenszyklus neben einer einzelligen Wachstumsphase bei günstigen Nahrungsbedingungen eine mehrzellige Reproduktionsphase bei Nahrungsmangel umfasst. Auf Basis molekularbiologischer Daten besitzt *Dictyostelium* einen

gemeinsamen Vorläufer mit Tieren und Pilzen, während die Pflanzen sich bereits früher abgespalten hatten. Unter diesen wurden der monocotyledone Reis (*Oryza sativa ssp. japonica*) und die dicotyledone Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) neben der Grünalge *Ostreococcus tauri* untersucht. Eine Analyse der Protisten hatte sich in einer Vorstudie als wenig aussichtsreich herausgestellt, da die Sequenzhomologien zu gering ausgeprägt sind, um Orthologe eindeutig zu benennen.

3.1. Ein komplex aufgebauter SMN-Komplex kennzeichnet Metazoen

Im Rahmen der Homologiesuche wurden im Proteom von *S. pombe* Orthologe von SMN (Yab8p) und Gemin2 (Yip1p) gefunden. Dies war eine entscheidende unabhängige Kontrolle für die Validität der bioinformatischen Analyse, da Yab8p als Ortholog von SMN beschrieben und Yip1p in einem *yeast-two-hybrid-screen* als sein Interaktor identifiziert worden. Mit biochemischen Methoden war diese Interaktion validiert worden [10, 112], wenngleich eine Funktion der beiden Proteine in der Zusammenlagerung von UsnRNPs nicht gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in *S. cerevisiae* kein SMN-Ortholog identifiziert, jedoch ein entfernt verwandtes Gemin2-Ortholog. Brr1p wurde bereits in einer frühen Publikation als Ortholog des humanen Gemin2 benannt [18]. Aufgrund seiner geringen Homologie zu Yip1p wurde dies jedoch später in Frage gestellt [112]. Seither jedoch wurden in den Datenbanken zahllose weitere Sequenzen abgelegt. Zusammen mit neu entwickelten iterativen Suchverfahren (PSI-BLAST [76]) erlaubte die gestiegene Datenbankgröße die eindeutige Identifikation von Brr1p als einziges signifikante Homolog des humanen Gemin2 (NP_003607.1, PSI-Blast, dritte Iteration, E-value = 3×10^{-5}) sowie des *S. pombe* Yip1p (NP_594775.1, vierte Iteration, E-value = 3×10^{-5}) in *S. cerevisiae*. Dies wird durch reziproke BLAST-Suchen untermauert. Da ein SMN-Ortholog fehlt, während ein Gemin2-Ortholog vorhanden ist, liegt in *S. cerevisiae* wahrscheinlich kein funktioneller SMN-Komplex vor.

In den Genomen von Reis und Ackerschmalwand wurden hingegen jeweils Orthologe von SMN und Gemin2 gefunden. Daher dürfte dieses Dimer die ursprünglichste Form des SMN-Komplexes darstellen. Interessanterweise besitzt *Dictyostelium discoideum* bereits Orthologe von Gemin3 und Gemin5. Bedenkt man, dass *Dictyostelium discoideum* vor der Aufspaltung des Pilz- und Tierreichs abzweigte, müssen beide Gene in den Pilzen verloren gegangen sein, während sie bei den Tieren beibehalten wurden. In *Ostreococcus tauri* wurde ebenfalls ein entfernt verwandtes Gemin5-Homolog gefunden. Es scheint daher möglich, dass bei den Landpflanzen ein erneuter Genverlust erfolgte.

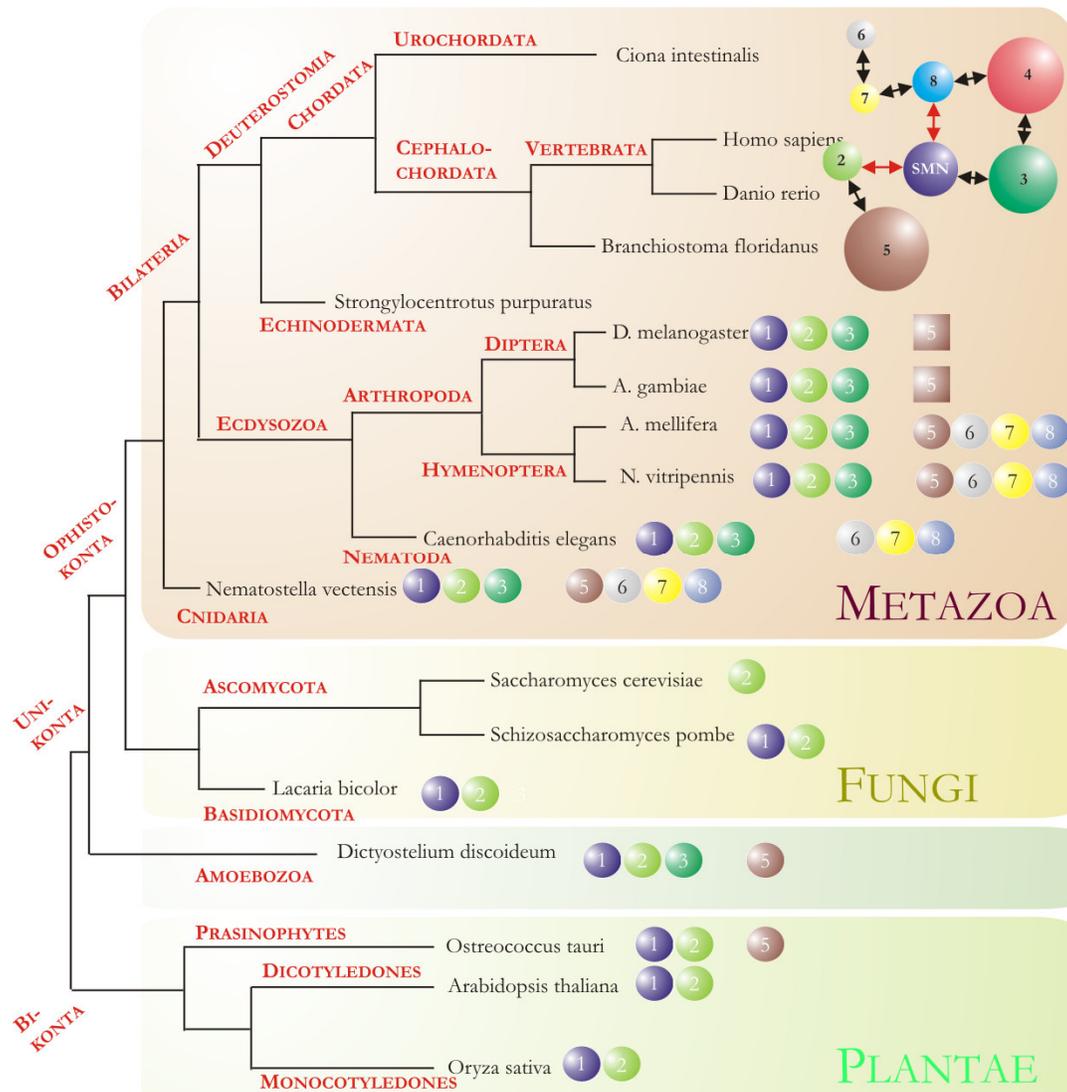


Abbildung 6: Evolution des SMN-Komplexes bei Tieren, Pilzen und Pflanzen

Die Genome einer Vielzahl von Organismen wurden mittels iterativer bioinformatischer Verfahren (PSI-BLAST) auf das Vorhandensein von Orthologen aller Komponenten des humanen SMN-Komplexes untersucht. Vorhandene Komponenten sind mit farbigen Kugeln dargestellt. Bei den Deuterostomia sind die bekannten Protein-Interaktionen innerhalb des humanen SMN-Komplexes angegeben. Beachte den sekundär vereinfachten SMN-Komplex in den Dipteren *Drosophila* und *Anopheles*. Aufgrund ihrer höheren Evolutionsgeschwindigkeit und biochemischer Daten (vgl. 4.6.3) ist das Gemin5-Ortholog der Dipteren als Quadrat dargestellt. Eine Aufstellung findet sich in Tabelle 6, S. 93

Überraschenderweise kommen in *Nematostella vectensis* bereits Orthologe zu den weiteren Geminen 6, 7 und 8 hinzu. Dies ist besonders bemerkenswert vor dem Hintergrund, dass diese im humanen SMN-Komplex eine architektonische Einheit bilden, welche an Gemin2 bindet. Gemin4 erscheint zuerst auf der Ebene der Deuterostomia mit dem Seeigel und folglich in den Vertebraten Mensch und Zebrafisch, dem invertebraten Cephalochordaten

Branchiostoma floridae und dem Urochordaten *Ciona intestinalis*. Folglich ist ein über SMN und Gemin2 hinausgehender SMN-Komplex kennzeichnend für Tiere, während Pilze und Pflanzen mit dem rudimentären Dimer aus SMN und Gemin2 auskommen.

3.2. Dipteren besitzen einen sekundär vereinfachten SMN-Komplex

Ein wegweisender Befund dieser Studie ergab sich aus der komparativen Analyse der Insektengenome. Während die Honigbiene und die parasitische Wespe *Nasonia* als Hymenopteren sowie der Mehlkäfer (Coleopteren; nicht gezeigt) über den bis zu dieser Stufe evolvierten SMN-Komplex aus SMN, Gemin2, 3, 5, 6, 7 und 8 verfügen, finden sich in Dipteren nur Orthologe von SMN und Gemin2, sowie divergente Orthologe zu Gemin3 und Gemin5. Am Beispiel von *Drosophila melanogaster* sei dies genauer dargestellt. Als Gemin2-Ortholog identifizierten wir das von CG10419 codierte Genprodukt. Seine relativ ausgeprägte Homologie zum humanen Gemin2-Protein ist in Abbildung 27 wiedergegeben. Zu Gemin3 fanden wir in Dhh1 (CG6539) eine relativ hohe Ähnlichkeit im Bereich der N-terminalen DEAD-Box-Domäne. Allerdings ist der C-Terminus deutlich divergenter (Abbildung 28). Ähnlich verhält es sich mit Rigor mortis (CG30149), das eine mäßige Homologie zu Gemin5 über die gesamte Länge aufweist. Um diese Kandidatenproteine näher zu analysieren, wurde ein phylogenetischer Baum über alle Gemin3- und Gemin5-Orthologen berechnet. Es zeigte sich, dass Dhh1 und Rigor mortis signifikant ($p < 0,001$) schneller evolvieren, als ihre Orthologe in anderen Organismen. Dieser reduzierte evolutionäre Druck auf die Aminosäuresequenz könnte auf den Erwerb einer neuen oder den Verlust einer bisher ausgeübten Funktion hinweisen. Anders als bei den Geminen 6-8, die sich nicht nachweisen ließen (siehe auch [38]), erscheinen also Dhh1 und Rigor mortis im Begriff, aus dem Genom verloren zu gehen oder in eine neue Funktion hinein zu wachsen.

3.3. dSMN und dGemin2 sind in *Drosophila* zytoplasmatische Proteine

SMN und die meisten der mit ihm assoziierten Proteine (Ausnahme: UNRIP) kommen in Vertebraten neben dem Zytosol in definierten nukleären Kompartimenten, so genannten Gemini of Cajal Bodies (Gems) vor und heißen daher allgemein Gemine. Cajal Bodies sind Strukturen im Bereich des Nukleolus, in denen sich verschiedene Reifungsschritte der UsnRNPs abspielen, so die Modifikation von UsnRNA-Basen (Pseudouridylierung, 2'-O-Methylierung), die Aneinanderlagerung der U4/U6snRNA sowie wahrscheinlich die Bindung UsnRNP-spezifischer Proteine [113]. Um die zellbiologischen Eigenschaften des *Drosophila*-SMN-Proteins und seiner Komplexpartner genauer kennenzulernen, wurde die sub-

zelluläre Verteilung von dSMN und dGemin2 immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation beider Proteine mit deutlicher perinukleärer Akzentuierung (Abbildung 7 a-i). In zahlreichen Zellen war darüber hinaus nukleäres dSMN nachweisbar. Es stellte sich meist dispers punktiert dar, im Einzelfall jedoch deutlich in bestimmten Bereichen akzentuiert, meist in Nähe der Kernhülle (Abbildung 7 j, k). Um diesen Befund genauer zu untersuchen, wurde das nukleäre Kompartiment dreidimensional rekonstruiert. Dabei zeigte sich ein unterschiedlich kompakter intranukleärer Bereich, der wahrscheinlich als *Drosophila*-Cajal-Body oder Pendant der Gems anzusprechen ist (Abbildung 7 l, m).

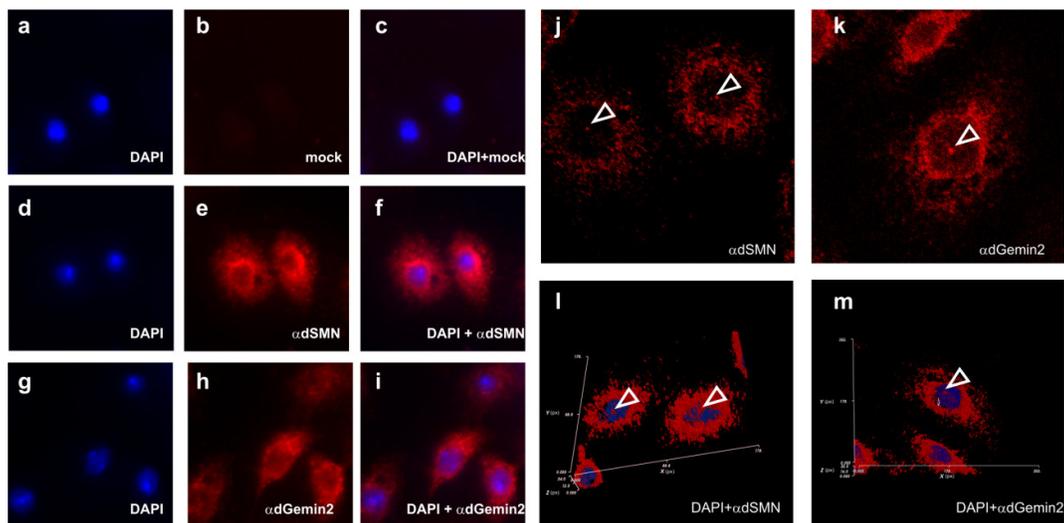


Abbildung 7: dSMN und dGemin2 sind überwiegend zytoplasmatische Proteine
a-i In der Aufsichtfluoreszenzmikroskopie von *Drosophila* Schneider2-Zellen zeigen dSMN und dGemin2 jeweils ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster mit gewisser perinukleärer Akzentuierung. Im Zellkern fanden sich geringe Mengen an dSMN und dGemin2, meist in disperser Punktierung, gelegentlich abgegrenzter. **j, k** In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie bestätigte sich die überwiegend zytoplasmatische Lokalisation von dSMN. Bei detaillierter Untersuchung zeigte sich jedoch eine Lokalisation innerhalb der Zellkerne, die unterschiedlich stark umschrieben ausfiel. In manchen Fällen ließ sich eine definiertere, im 2D-Bild punktförmige Lokalisation nachweisen (Pfeile). **l, m** Nach dreidimensionaler Rekonstruktion stellte sich deutlicher der Charakter des nukleären dSMN-positiven Bereichs als strukturelle Einheit dar. Sie dürfte dem *Drosophila* Cajal-Body bzw. *Drosophila*-Gems entsprechen (Pfeile).

3.4. Reinigung des *Drosophila*-SMN-Komplexes

Unsere bioinformatischen Befunde erlaubten den Schluss, dass ein aus den Geminen 1, 2, 3, 5, 6, 7, und 8 bestehender SMN-Komplex Metazoen allgemein kennzeichnet. In Dipteren *Anopheles gambiae* und *Drosophila melanogaster* fanden sich als Ausnahme zwar Orthologe SMN- und Gemin2-Proteine, jedoch keine oder nur entfernt verwandte Orthologe der

Gemine3 bis 8. Unklar war allerdings, ob die schnell evolvierenden Gemin3- und Gemin5-Orthologe Dhh1 und Rigor mortis noch Bestandteil des Komplexes sind. Zudem besteht generell ein hohes wissenschaftliches Interesse, den SMN-Komplex in anderen Organismen als dem Menschen genauer zu verstehen. Man erhofft sich daraus ein besseres Verständnis, wie es durch den Defekt im SMN-Gen zur Schädigung vorzugsweise der Motoneurone kommt. Hierfür wird *Drosophila* auch deshalb als besonders geeignet betrachtet, weil die Fruchtfliege als Modellorganismus seit 100 Jahren hervorragend etabliert ist [114]. Es stehen zu seiner Analyse eine Vielzahl genetischer Werkzeuge und öffentlich zugänglicher Ressourcen wie cDNA-Banken oder Sammlungen mutanter Fliegen zur Verfügung. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit der SMN-Komplex aus *Drosophila melanogaster* – Schneider2-Zellen präparativ aufgereinigt und seine Zusammensetzung mittels Proteinmassenspektrometrie analysiert werden.

3.4.1. Konzeption eines neuen Affinitätspeptids für *Drosophila*

Als Verfahren zur Isolation des *Drosophila*-SMN-Komplexes kamen prinzipiell mehrere Verfahren in Frage:

1. Die Aufreinigung des Komplexes über Zellfraktionierungsverfahren wie Gelfiltration, Ionenauschromatographie oder präparative Gradientenzentrifugation.
2. Die direkte Immunpräzipitation mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper.
3. Die Affinitätsreinigung über ein Epitop-Tag oder eine andere Affinitätsmatrix.

Zellfraktionierungsverfahren gestalten sich häufig langwierig und benötigen große Materialmengen. Grundvoraussetzung sollte zudem die Verfügbarkeit eines geeigneten Testassays sein. Mir war es in vorbereitenden Untersuchungen jedoch nicht gelungen, die Zusammenlagerung von UsnRNPs im *Drosophila* S2-Zellextrakt analytisch darzustellen. Zudem ist es schwierig, die Komponenten eines so aufgereinigten Komplexes sicher zu identifizieren, da sie unter Umständen während der Reinigung verloren gehen. Weiterhin kann es während der Reinigung zur Denaturierung des Proteins kommen, so dass sich seine Funktion nicht weiter untersuchen lässt. Zu Beginn dieser Arbeit hatte ich versucht, den dSMN-Komplex mittels präparativer Immunpräzipitation darzustellen. Hierbei zeigte sich jedoch, wahrscheinlich aufgrund zu geringer Avidität des polyklonalen Antikörpers, beständig eine unzureichende Qualität des Eluats. Daher entschied ich mich, zunächst gängige Affinitätsreinigungsverfahren auf ihre Eignung für den dSMN-Komplex zu untersuchen (für Einzelheiten zu Affinitätsreinigungen siehe 4.5.1). Als vergleichsweise gut verstandenes Beispiel

3. Ergebnisse

wählte ich das FLAG-HA-Tandemaffinitäsepitop. Dazu wurde im Vektor pMTV5/HisA (Invitrogen), das N-terminale V5-Epitop durch eine Kombination aus FLAG- und HA-Epitop ersetzt. Sowohl für getaggetes dSMN, wie auch für dGemin2 wurde eine induzierbare Expression des Fusionsproteins im Immunoblot nachgewiesen. Die anschließende Reinigung des Proteinkomplexes gelang jedoch bei Elution mit FLAG-Peptid nur ausgesprochen ineffizient (nicht gezeigt). In der Tat werden vom Hersteller Elutionstemperaturen bis 70°C empfohlen, so dass von einer nativen Aufreinigung, wie sie für funktionelle Experimente erforderlich ist, keine Rede sein kann. Abgesehen von der Ineffizienz der Reinigung wies das Eluat im Vergleich mit einer Kontrollreinigung aus untransfizierten Schneider2-Zellen eine sehr unbefriedigende Reinheit auf. Ähnliche Befunde sind auch in der Literatur berichtet (vgl. [70], Abb. 5A). Eine deshalb angeschlossene Affinitätsreinigung über eine anti-HA-Matrix verringerte die Ausbeute weiter, so dass mit den eingesetzten Mengen an Zellmaterial keine suffiziente Menge an dSMN-Komplex zu erzielen waren.

	1	10	20	30			
D. melanogaster	-----	-----	-----	MSDETNAAV	MDD		
N. crassa	-----	-----	-----	MA SHDEI	MDD		
S. pombe	-----	-----	-----	MDQS QKEV	MDD		
C. elegans	-----	-----	-----	MEVDDV	MDD		
D. rerio	-----	MANGA	EDVVF	CRGTGQS	DDSDI MDD		
X. laevis	-----	MAGL	EDGGEVL	FRRGAGQS	DDSDI MDD		
G. gallus	-----	MAGRVL	FRRGAGQS	DDSDI	DM MDD		
M. musculus	MA	MGS	GGAGS	EQEDTVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD	
R. norvegicus	MA	MGS	GGAGS	EQEDTVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD	
B. taurus	--	MAL	GGGGGGFPE	PE	EDSVL	FRRGTGES	DDSDV MDD
C. familiaris	---	MGGGGG	LPE	PE	EDSVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD
F. catus	--	MAMGGGS	G	VPE	QEDSVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD
M. fascicularis	MA	MSS	GGSGGGVPE	QEDSVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD	
P. pygmaeus	MA	MSS	GGSGGGVPE	QEDSVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD	
H. sapiens	MA	MSS	GGSGGGVPE	QEDSVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD	
P. troglodytes	MA	MSS	GGSGGGVPE	QEDSVL	FRRGTGQS	DDSDI MDD	

Abbildung 8: Der N-Terminus des SMN-Proteins expandiert auf der Stufe der Vertebraten und Säugetiere

Die Aminosäuresequenzen der SMN-Orthologe aus den aufgeführten Organismen wurden mit dem Programm AlignX verglichen. Dargestellt sind die Aminosäuren 1-36 bezogen auf das humane Protein. Konservierte ähnliche Reste sind grün, identische gelb unterlegt.

Dieses Ergebnis kontrastierte eindrucksvoll mit Experimenten aus unserem Labor, in denen der humane SMN-Komplex mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 7B10 in hoher Reinheit isoliert und genau charakterisiert [42, 44] wurde. Bislang war das Epitop von 7B10 auf die Aminosäuren 1-30 des humanen SMN-Proteins eingengt worden [115]. Wie bis dato unpublizierte Experimente gezeigt hatten, lässt sich der humane SMN-Komplex mit einem Überschuss an synthetischem Peptid, welches dieses Epitop umfasst, von der Anti-

körpermatrix eluieren. Es stellte sich daher die Frage, ob und ggf. wie dieser Vorzug für die Reinigung des *Drosophila*-SMN-Komplexes zu nutzen sei.

Es fällt ins Auge (vgl. Abbildung 3), dass der N-Terminus des SMN-Proteins in *Drosophila* gegenüber dem humanen Ortholog um etwa 30 Aminosäuren verkürzt ist. Folglich wird der Antikörper 7B10 mit dSMN nicht kreuzreagieren. Schließt man noch zahlreiche andere SMN-Orthologe in die Analyse ein (Abbildung 8) zeigt sich, dass hSMN1-30 nur im Schimpansen (*Pan troglodytes*) und im Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) vollständig konserviert ist, während bereits der Orang Utan (*Pongo pygmaeus*) einen Aminosäureaustausch aufweist (siehe auch 7.2). In einer systematischeren Betrachtung fällt eine zweistufige Expansion dieses Bereichs bei den Vertebraten und noch einmal bei den Säugetieren ins Auge. Dies erlaubt den Schluss, dass 7B10 in *Drosophila* und anderen Invertebraten nicht mit dem jeweiligen SMN-Protein interagiert.

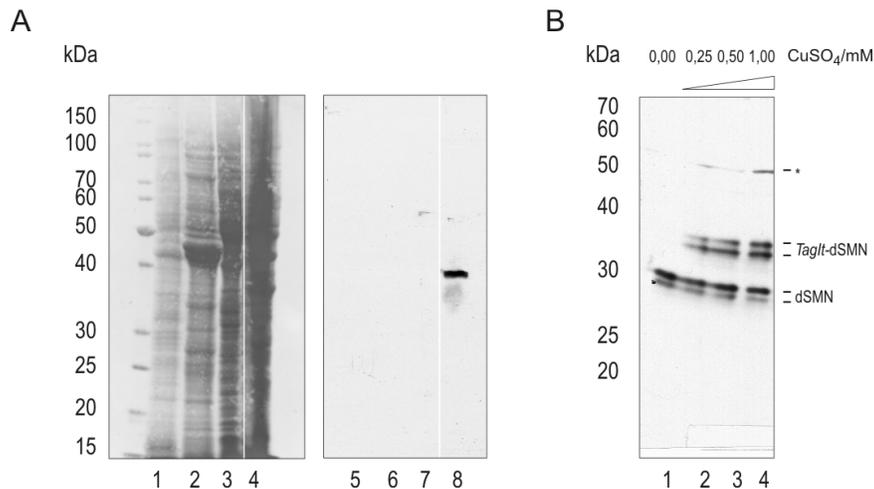


Abbildung 9: hSMN1-30 eignen sich als Epitop-Tag in Schneider2-Zellen

A Extrakt aus *C. elegans* verschiedener Stadien (Spuren 1 und 5), *Drosophila* Embryonen (Canton S, Spuren 2 und 6), *Drosophila* Schneider 2-Zellen (Spuren 3 und 7) sowie humanen HeLa-Zellen (Spuren 4 und 8) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Membran mit Amidoschwarz gefärbt (1-4). Nach Inkubation mit dem Antikörper 7B10 findet sich lediglich ein Signal in HeLa-Zellextrakt bei ca. 37 kDa entsprechend hSMN (Spur 8). Demnach kreuzreagiert der Antikörper 7B10 weder mit den orthologen SMN-Proteinen aus *Drosophila* und *C. elegans*, noch mit anderen Proteinen der untersuchten Extrakte. **B** Stabil mit TagIt-dSMN transfizierte Schneider2-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Kupfersulfat für 24 Stunden kultiviert. Ca. 20 µg Gesamtprotein (Bradford-Test) wurden im Immunoblot mit einem Antikörper gegen dSMN analysiert. Es zeigte sich eine detektierbare Expression des TagIt-dSMN-Fusionsproteins ab 0,25 mM CuSO₄. Diese wurde schließlich für die Induktion von Rührkulturen verwendet. Beachte das Auftreten von Doppelbanden sowohl für das endogene Protein, wie für das Fusionsprotein. Das Sternchen markiert nicht ausreichend denaturiertes Protein.

Um diesen Befund zu untermauern, wurden Extrakte aus einer Reihe von Organismen im Immunoblot auf Kreuzreaktivität von 7B10 untersucht (Abbildung 9). Außer in HeLa-Zellextrakt zeigte sich in keinem der untersuchten Extrakte ein Signal. Zusätzlich ergab eine BLAST-Suche, dass Homologien zu diesen Aminosäureresten in anderen Proteinen praktisch nicht vorkommen. Aus dieser Beobachtung folgerte ich, dass man die Aminosäuresequenz hSMN1-30 als Affinitäsepitop nutzen kann. Vorteilhaft dabei sollten im Vergleich mit existierenden Epitop-Tags die effiziente Elution der präzipitierten Proteinkomplexe durch Peptidkompetition und die in unserem Labor praktisch unlimitierte Verfügbarkeit des monoklonalen Antikörpers sein. Es wurde daher in Analogie zu der geschilderten FLAG-HA-Tandemaffinitätsreinigung die Aminosäuresequenz dieses Epitops in 5' der *multiple cloning site* des Plasmids pMTV5/HisA eingebracht und zwar so, dass sich eine geeignete Kozak-Sequenz für *Drosophila* ergab (vgl. 2.3.9). Als alternatives Elutionsverfahren zur Peptidkompetition sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die isolierten Proteinkomplexe durch proteolytischen Verdaus mittels TEV-(*tobacco etch virus*) Protease von der Affinitätsmatrix zu eluieren. Die entsprechende zusätzliche Peptidsequenz (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln) gefolgt von Glycin und Alanin sollte darüber hinaus die unabhängige Faltung des Fusionsproteins sicherstellen. In einem ersten Schritt wurden dSMN und dGemin2 in den modifizierten Vektor eingebracht, der wegen seiner rasch zunehmenden Verbreitung in unserem und befreundeten Labors den griffigen Namen pMTagIt erhielt. Im Immunoblot von Zellysaten transfizierter und mit CuSO₄ induzierter Zellen zeigte sich eine effizient induzierbare Expression des Fusionsproteins (Abbildung 9 B). Detaillierte Daten zum *TagIt*-Epitop einschließlich der Vektorkonstruktion finden sich im Anhang dieser Arbeit. Die Anwendbarkeit des *TagIt*-Epitops für andere Komplexe sowie seine Modifikation zur Affinitätsreinigung von RNA-bindenden Proteinen wurde in der von mir betreuten Diplomarbeit von K. Apfel ausführlich diskutiert [116].

3.4.2. *TagIt*-dSMN kosedimentiert mit und bindet dGemin2

Ein häufiger Schwachpunkt bei der Reinigung von Proteinkomplexen mittels Affinitätstags ist die aus der Überexpression resultierende unvollständige Inkorporation des rekombinanten Proteins in den funktionellen Komplex, da die Bindungspartner substöchiometrisch in der Zelle vorliegen. Um zu untersuchen, ob das rekombinante, getaggte dSMN-Protein in einen definierten Komplex integriert, führte ich eine Glycerolgradientenzentrifugation mit Extrakten aus *TagIt*-dSMN exprimierender Schneider2-Zellen durch. Bei Inkubation mit

anti-dSMN-Antikörper zeigte sich im Immunoblot (Abbildung 10 A) eine Sedimentation von *TagIt*-dSMN (36 kDa) in einem unscharf abgegrenzten Komplex mit Gipfel in den Fraktionen 8 bis 16. In denselben Fraktionen ließ sich zusätzlich ein Signal bei ca. 30 kDa entsprechend dem endogenen dSMN-Protein darstellen. Folglich integrieren rekombinantes *TagIt*-dSMN und endogenes dSMN in einen homogenen Komplex. In einem ähnlichen Experiment wurde ein spezifisches Signal in den Fraktionen 8-16 sowohl für dGemin2 als auch für *TagIt*-dSMN beobachtet (Abbildung 10 B). Folglich kann man annehmen, dass überexprimiertes *TagIt*-dSMN-Protein auch in einen gemeinsamen Komplex mit dGemin2 integriert. Das Sedimentationsverhalten entspricht einem etwa 25S großen Komplex, ähnlich wie für den humanen SMN-Komplex beschrieben.

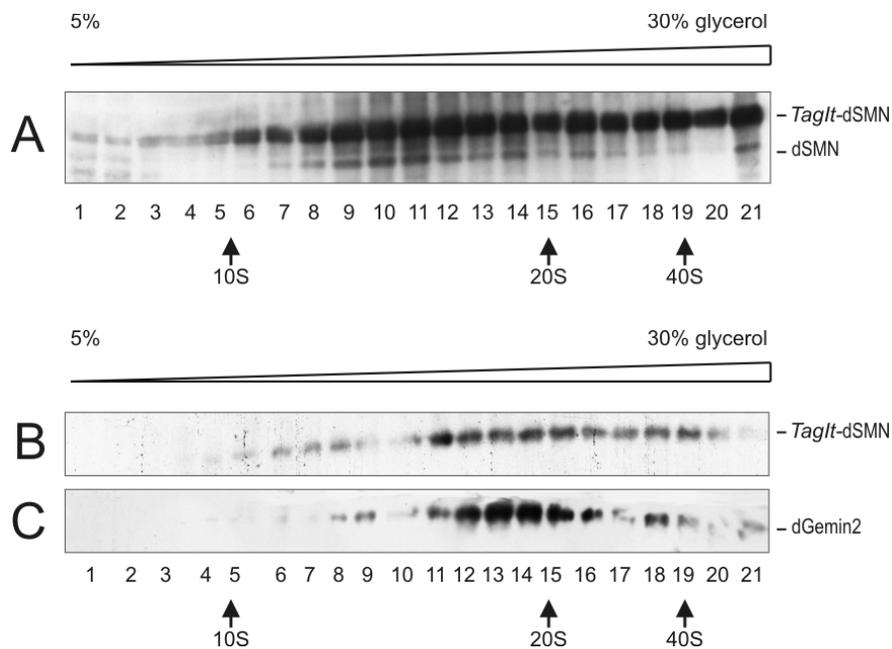


Abbildung 10: *TagIt*-dSMN kosedimentiert mit dGemin2 in einem makromolekularen Komplex

Extrakt aus *TagIt*-dSMN stabil exprimierenden Schneider2-Zellen wurde auf einem Gradienten von 5-30% Glycerol fraktioniert, die einzelnen Fraktionen mit TCA gefällt und im Immunoblot mit dem Antikörper anti-dSMN (A) analysiert. Es zeigte sich ein Sedimentationsverhalten beider Proteine, des *TagIt*-dSMN (oben) und des endogenen dSMN-Proteins (unten) in einem breiten Gipfel mit Maximum in den Fraktionen 8-16. B *TagIt*-dSMN (nachgewiesen mit 7B10) kosedimentiert mit dGemin2 (C, nachgewiesen mit anti-dGemin2) in einem gemeinsamen Komplex in den Fraktionen 8-16, entsprechend ca. 25S. Die Sedimentationswerte (Pfeile) wurden abgeschätzt.

Um diese Befunde weiter zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitation des Komplexes mit dem monoklonalen Antikörper 7B10 durchgeführt. In der Immunoblot-Analyse zeigte sich ein Signal für rekombinantes *TagIt*-dSMN-Protein sowie für dGemin2 (Abbildung 11

A, Spur 2). Umgekehrt war in einer Aufreinigung aus *TagIt*-dGemin2 exprimierenden Zellen die Assoziation von dSMN nachweisbar (Abbildung 11 A, Spur 4). Zudem wurde – ähnlich wie für den humanen SMN-Komplex beschrieben – eine von der Stringenz der Waschschritte abhängige Bindung der Sm-Proteine B und D3 gezeigt (Abbildung 11 B). Dies bestätigte, dass das *TagIt*-dSMN-Protein eine physische Interaktion mit seinem Komplexpartner dGemin2 sowie seinen Substraten, den Sm-Proteinen, eingeht.

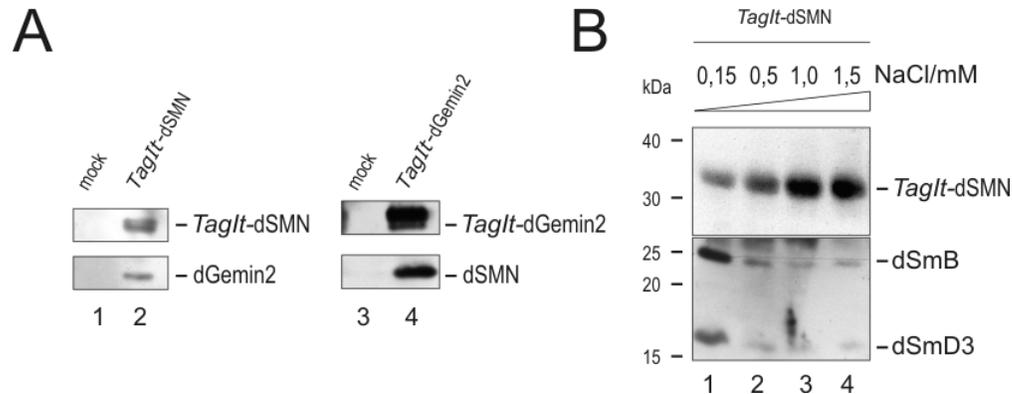


Abbildung 11: dGemin2 und die Sm-Proteine B und D3 binden an *TagIt*-dSMN

A Im Immunoblot einer Co-Immunpräzipitation von *TagIt*-dSMN wurde dGemin2 nachgewiesen (Spur 2), umgekehrt dSMN in einer Co-Immunpräzipitation von *TagIt*-dGemin2. **B** Die Assoziation von Sm-Proteinen mit *TagIt*-dSMN wurde unter unterschiedlichen Stringenzbedingungen analysiert. Obwohl in Spur 1 etwas weniger *TagIt*-dSMN aufgetragen wurde, verringert sich verglichen damit die Menge des gebundenen SmB/D3-Heterodimers bereits ab 500 mM NaCl. Dies ähnelt der Situation im humanen System [44]. Auch dort zeigt sich eine relativ salz-sensible Assoziation des SmB/D3-Heterodimers mit dem SMN-Komplex.

3.4.3. Massenspektrometrische Analyse des dSMN-Komplexes

Ein Kernziel dieser Arbeit war die Untersuchung des isolierten dSMN-Komplexes mittels Protein-Massenspektrometrie. Aufgrund der Sensitivität des Verfahrens muss ein so zu analysierender Proteinkomplex in hoher Reinheit vorliegen. Diese Grundvoraussetzung wurde mit der Entwicklung des *TagIt*-Epitops geschaffen. Das Eluat einer Affinitätsreinigung wurde zum einen mit Phenol und Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Aceton präzipitiert und diese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Silber gefärbt (Abbildung 12 A). Zum anderen wurde die Elution ohne weiteres unter nicht reduzierenden Bedingungen im silbergefärbten SDS-PAGE analysiert (Abbildung 12 B). Dabei zeigte sich zunächst im Kontrolleluat und der Aufreinigung des *TagIt*-dSMN-Proteins neben der schweren (50 kDa) und leichten (25 kDa) Immunglobulinkette bzw. dem gesamten IgG1-Molekül (150 kDa) eine unspezifische Bande bei ca. 80 kDa entsprechend dem Hit-

zeschockprotein hsc70. Dieses ist eine häufige Kontaminante in Affinitätsreinigungen, da es als Co-Chaperon effizient an die Immunglobuline der Affinitätsmatrix binden kann. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion verschwanden im Vergleich zur unbehandelten Elution des *TagIt*-dSMN-Proteins einige argyrophile Banden zwischen 40 und 55 kDa; sie wurden später als UsnRNAs identifiziert (siehe 3.4.6). Das rekombinante *TagIt*-dSMN-Protein erschien als prominente Bande bei 36 kDa. Die übrigen Proteinbanden verhielten sich verglichen mit diesem substöchiometrisch. Dies war zweifellos auf die Überexpression des rekombinanten dSMN-Proteins zurückzuführen (vgl. auch Abbildung 10 A). Dadurch genügte die Abundanz der Bindungspartner nicht, um quantitativ in den isolierten Komplex integriert zu werden. Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden in der Bande bei 30 kDa sowohl dSMN als auch dGemin2 identifiziert. Diese zeigen in der SDS-PAGE identisches Laufverhalten, wie sich auch im Immunoblot und mit in *E.coli* exprimierten Proteinen gezeigt hatte. Dies bestätigte zum einen die Oligomerisierung des rekombinanten dSMN-Proteins mit endogenem dSMN und zum anderen die Identifizierung von dGemin2 mittels Bioinformatik und Immunoblot.

Aus massenspektrometrischen Analysen des humanen SMN-Komplexes ist bekannt, dass eine Reihe von Proteinen transient mit dem SMN-Komplex assoziiert ist. Dazu gehören in erster Linie die Sm-Proteine, aber auch einige UsnRNP-spezifische Faktoren. Interessanterweise waren in der *TagIt*-dSMN-Elution alle sieben Sm-Proteine nachweisbar, nämlich SmB, SmD1 (Gen snRNP69D), SmD2 (CG1249), SmD3, SmE (CG18591), SmF (DebB) and SmG (CG9742). Zudem wurden die UsnRNP-spezifischen Proteine U1 70K [117], U2A' [118], und das *Drosophila*-Ortholog von U5 116kD (CG4849) [119, 120] gefunden. Die Proteine U2B'' und U1A werden in *Drosophila* beide durch das Protein SNF [121] repräsentiert, welches ebenfalls spezifisch nachweisbar war. In keiner der in der Silberfärbung sichtbaren und massenspektrometrisch analysierten Banden konnten allerdings Kandidaten für die Homologen von Gemin3 (Dhh1) und Gemin5 (Rigor mortis) gefunden werden. Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass dSMN und dGemin2 alleine in der Lage sind, alle Sm-Proteine sowie eine Reihe UsnRNP-spezifischer Proteine zu binden. Um diesen Befund einer funktionellen Analyse zu unterziehen und mit der biologischen Wirklichkeit zu vergleichen, wurde der isolierte dSMN-Komplex später in einem EMSA (electrophoretic mobility shift assay) auf seine Aktivität in der Zusammenlagerung von *UsnRNP-core*-Partikeln untersucht (siehe 3.4.6).

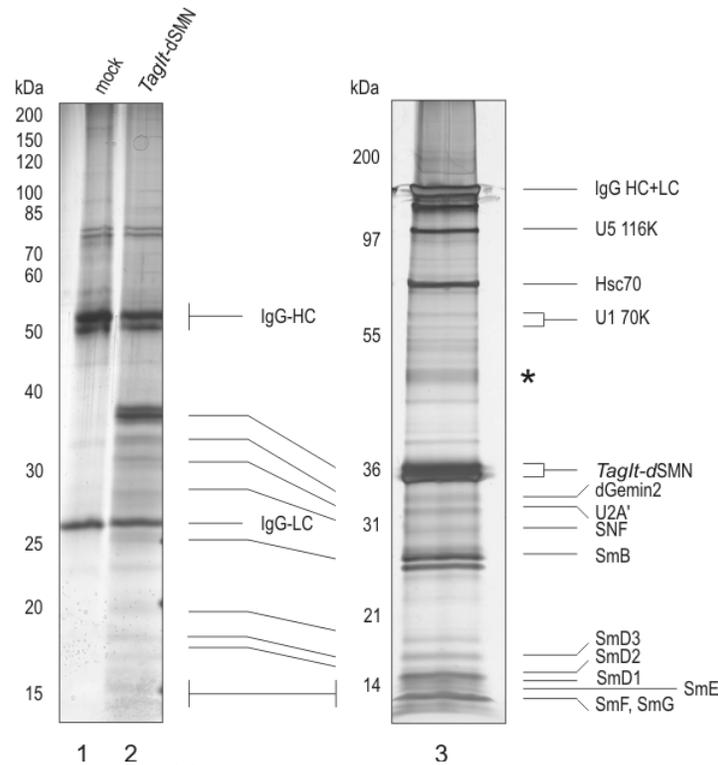


Abbildung 12: Der mittels *TagIt*-Epitop isolierte dSMN-Komplex besteht aus dSMN, dGemin2 und bindet Sm-Proteine und UsnRNP-spezifischen Faktoren

Affinitätsgereinigter *TagIt*-dSMN-Komplex wurde unter reduzierenden (Spuren 1 und 2) und nicht reduzierenden (Spur 3) Bedingungen mit (1 und 2) oder ohne (3) vorherige Phenol/Chloroform-Extraktion im silbergefärbten Polyacrylamidgel analysiert. Mittels Massenspektrometrie wurden neben dem immunpräzipitierten *TagIt*-dSMN endogenes dSMN und dGemin2 bei ca. 30 kDa nachgewiesen. Neben allen Sm-Proteinen fanden sich darüber hinaus die UsnRNP-spezifischen Proteine U5-115K, U1-70K, U2A' und SNF. Hsc70 kommt auch in der Kontrolleluat vor.

3.4.4. Dhh1 ist keine stabile Komponente des dSMN-Komplexes

Dhh1 wurde in der bioinformatischen Analyse des dSMN-Komplexes als Gemin3-Ortholog identifiziert, zeigt jedoch ausgeprägte Homologie zu Gemin3 lediglich im Bereich der Helikase-Domäne. Bioinformatisch ließ sich zeigen, dass in den untersuchten Dipteren der evolutionäre Konservierungsdruck auf das Protein verloren ging. Nachdem Dhh1 auch nicht in der massenspektrometrischen Analyse des dSMN-Komplexes zu finden war, stellte ich die Frage, ob das Protein tatsächlich Bestandteil des dSMN-Komplexes ist. Besonders, da das Dhh1-Protein bislang uncharakterisiert ist und keine Antikörper existieren, wurde eine *TagIt*-Dhh1 stabil überexprimierende Schneider2-Zelllinie generiert. Nach Affinitätsreinigung wurde das Eluat im Immunoblot auf die Anwesenheit von dSMN untersucht. Während bei physiologischer Stringenz (150 mM NaCl im Waschpuffer) nur wenig dSMN

detektiert wurde, konnte bei 100 mM NaCl der Komplex so weit stabilisiert werden, dass dSMN in relevantem Ausmaß vorhanden war (Abbildung 13). Aufgrund der oben gezeigten Daten (vgl. 3.4.2) kann man davon ausgehen dass dSMN und dGemin2 in ausreichender Menge in der Zelle vorliegen um mit einem relevanten Bindungspartner auch bei etwaiger Überexpression desselben einen Komplex zu formieren. Da dies nicht der Fall ist, bildet Dhh1 wahrscheinlich keine stabile Komponente des dSMN-Komplexes.

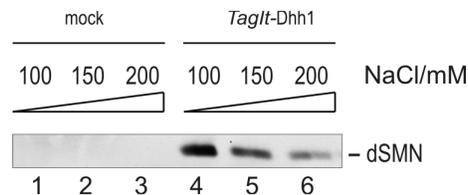


Abbildung 13: Dhh1 ist keine stabile Komponente des dSMN-Komplexes

Zur Untersuchung, ob Dhh1 mit dSMN interagiert, wurde eine stabil transfizierte *TagIt-Dhh1*-Zelllinie etabliert. Nach Immunpräzipitation wurde das an der Matrix immobilisierte Fusionsprotein mit steigender Stringenz gewaschen und das Eluat auf die Anwesenheit von dSMN untersucht. Es zeigte sich, dass zwar Dhh1 mit dSMN interagieren kann, jedoch nahm diese Interaktion bei höherer Stringenz ab.

3.4.5. Rigor mortis bildet keinen Komplex mit dSMN

Auch das Rigor mortis-Protein wurde in der massenspektrometrischen Analyse des affinitätsgereinigten dSMN-Komplexes nicht detektiert. Aufgrund seiner Orthologieverhältnisse sollte die Frage einer Assoziation mit dSMN durch zusätzliche Daten abgesichert werden. Zu diesem Zwecke wurde analog zu Dhh1 eine *TagIt-Rigor mortis* stabil exprimierende Zelllinie generiert und die Affinitätsreinigung wie geschildert durchgeführt. Eine Affinitätsreinigung des dSMN-Komplexes diente als Kontrolle. Zum Nachweis des Rigor mortis-Proteins wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper von Carl Thummel (University of Utah, Salt Lake City, UT, USA) genutzt. Auch im Falle von Rigor mortis wurden die Waschschritte unterschiedlich stringent durchgeführt. Jedoch zeigte sich unter keiner der gewählten Bedingungen ein Signal für dSMN (Abbildung 14 A, Spuren 4-6). Ebenso wenig wurde umgekehrt Rigor mortis in der *TagIt*-dSMN-Aufreinigung beobachtet (Spur 7). Um dies unter physiologischeren Bedingungen zu bestätigen, wurde eine Immunpräzipitation gegen dSMN durchgeführt, in der gegenüber der Negativkontrolle ebenfalls kein Rigor mortis-Protein nachzuweisen war (Abbildung 14 B). Man kann daher folgern, dass Rigor mortis, ähnlich wie Dhh1, *in vivo* keinen Komplex mit dSMN und dGemin2 bildet. Obwohl Rigor mortis ein Ortholog von Gemin5 ist, spielt es funktionell keine Rolle am dSMN-Komplex.

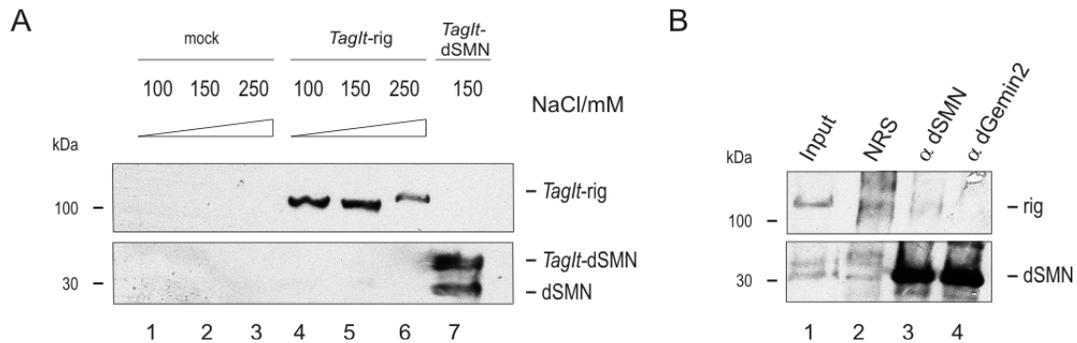


Abbildung 14: Rigor mortis bindet *in vivo* nicht an dSMN

A dSMN und dGemin2 wurden aus Schneider2-Zellextrakt immunpräzipitiert und im Immunoblot auf die Gegenwart von dSMN und Rigor mortis-Protein untersucht. Rigor mortis wird mit keinem der beiden Proteine kopräzipitiert, obwohl das Protein in Schneider2-Zellen exprimiert wird. **B** Eine *TagIt*-Rigor mortis exprimierende Schneider2-Zelllinie wurde generiert und das an die Matrix gebundene Fusionsprotein mit steigender Stringenz gewaschen. Eine *TagIt*-dSMN-IP diente als Positivkontrolle für dSMN. Nach Untersuchung des Eluats mit α Rigor mortis- und α dSMN-Antikörpern im Immunoblot zeigte sich keine wechselseitige Assoziation der beiden Proteine.

3.4.6. Der dSMN-Komplex enthält UsnRNAs

Bei Immunpräzipitation des SMN-Komplexes aus *Xenopus laevis*-Oozyten werden – anders als dies beim humanen SMN-Komplexes der Fall ist – die UsnRNAs U1 und U5 copräzipitiert [18, 20]. Um zu prüfen, ob es sich in *Drosophila* ähnlich verhält wie bei *Xenopus*, wurde die wässrige Phase einer Phenol-Chloroform-extrahierten *TagIt*-dSMN-Elution in einer denaturierenden RNA-PAGE analysiert. Dabei zeigten sich nach Ethidiumbromid-Färbung im Vergleich zu Eluaten aus wildtypischen Schneider2-Zellen spezifische Banden, wie sie für die U1, U2, U4 und U5snRNAs beschrieben wurden [122, 123] (Abbildung 15 A). Um die Identität der UsnRNAs zu verifizieren, wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten, mit snRNA-spezifischen Oligonucleotiden revers transkribiert und amplifiziert. Das Resultat zeigt Abbildung 15 B. Schließlich wurden die RT-PCR-Produkte über die eingebrachten Restriktionsschnittstellen (siehe 2.3.1) in das Plasmid pBluescript KS(+) kloniert und je zwei Klone sequenziert. Im Vergleich mit in der Datenbank hinterlegten Referenzsequenzen ergaben sich für dU1 und dU2 identische Sequenzen, bei dU4 kam es – wahrscheinlich aufgrund eines Fehlers in der PCR-Reaktion - zu je einer Deletion und Insertion. Beide sequenzierten dU5snRNA-Klone wiesen eine Deletion von 10 Basenpaaren in 3' auf. In diesem Bereich liegt eine stem-loop-Sekundärstruktur der RNA. Der Denaturierungsschritt bei 65°C genügte folglich nicht, um diese Sekundärstruktur aufzulösen (Abbildung 15 C).

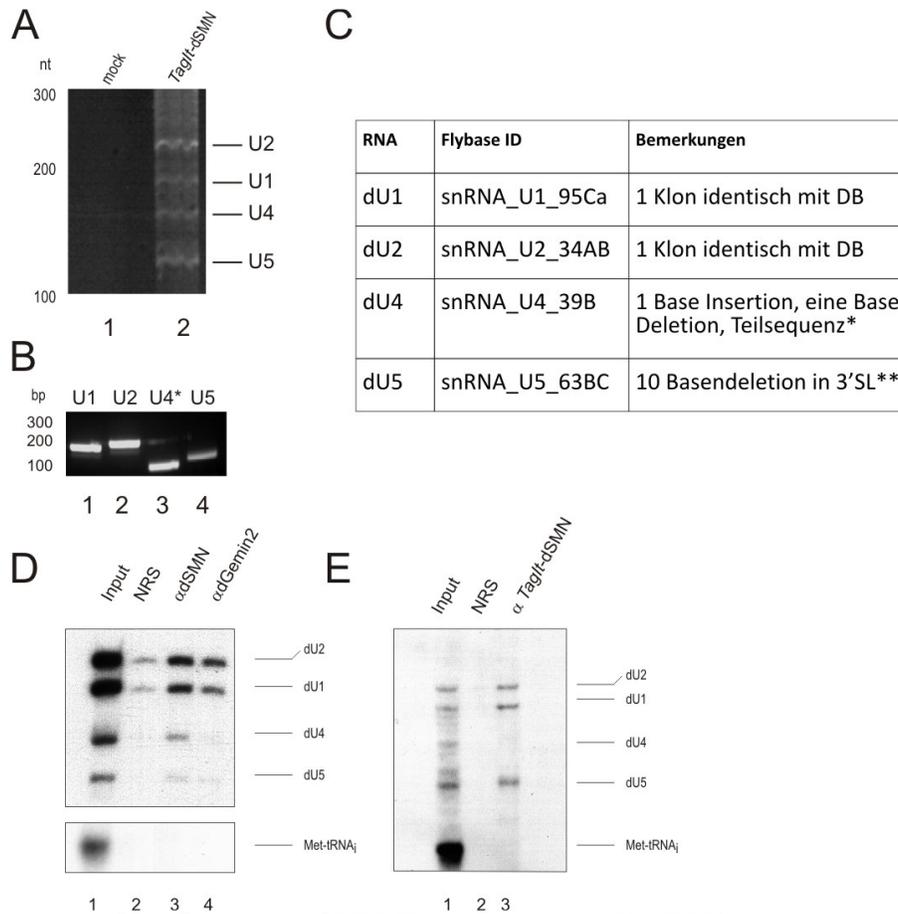


Abbildung 15: Der *Drosophila*-SMN-Komplex enthält UsnRNAs

Mehrere Methoden wurden angewandt, um die Assoziation von UsnRNAs mit dem dSMN-Komplex zu untersuchen. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion des mit Peptid eluierten *TagIt*-dSMN-Komplexes zeigte sich im Ethidiumbromid-gefärbten RNA-PAGE eine sehr spezifische Anreicherung einiger RNA-Spezies (A). Aufgrund ihrer Größe wurde vermutet, dass es sich um UsnRNAs handelt. Diese wurden mit UsnRNA-transkriptspezifischen Primern amplifiziert (B). Nach ihrer Klonierung wurden die UsnRNAs sequenziert (C). Dabei wurde die weitgehende Übereinstimmung mit den hinterlegten Datenbanksequenzen festgestellt. Die Bindung von UsnRNAs an den dSMN-Komplex trifft auch für wildtypischen dSMN-Komplex zu (D), der aus Schneider2-Gesamtzell-extrakt präzipitiert wurde. Als weiterer Beleg wurde zyttoplasmatischer Extrakt aus *TagIt*-dSMN-exprimierenden Zellen generiert und das Fusionsprotein aufgereinigt (E). Met-tRNA_i diente dabei als Negativkontrolle.

Diese Aussage sollte nun mit zwei weiteren Experimenten abgesichert werden. In einem ersten Experiment wurde der endogene dSMN-Komplex mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und die assoziierten UsnRNAs im Northern Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl mit Antikörpern gegen dSMN als auch gegen dGemin2 die UsnRNAs dU1, dU2, dU4, und dU5 kopräzipitiert wurden (Abbildung 15 D). Da die Möglichkeit besteht, dass die intrinsische Affinität des dSMN-Komplexes für UsnRNAs oder UsnRNPs

im nativen Gel rascher migrierender Komplex aus. Die U85scaRNA wurde durch Inkubation mit dem *TagIt*-dSMN-Komplex nicht beeinflusst und diente als Negativkontrolle. Zusammengenommen erlauben diese Daten den Schluss, dass gereinigter *TagIt*-dSMN-Komplex alle Komponenten und Eigenschaften besitzt, um die Zusammenlagerung von UsnRNPs in einer von Temperatur und der Präsenz der *Sm-site* abhängigen Weise zu katalysieren.

3.4.8. Rekombinante Rekonstitution des dSMN-Komplexes

Die Affinitätsreinigung des *TagIt*-dSMN-Komplexes erlaubte den Schluss, dass *in vivo* dSMN und dGemin2 die einzigen stabilen Komponenten des dSMN-Komplexes darstellen. Um diesen Komplex näher kennen zu lernen und um auszuschließen, dass substöchiometrisch in der *TagIt*-dSMN-Reinigung vorkommende Faktoren zu der Assemblyaktivität beitragen, sollte das dSMN/dGemin2-Heterodimer rekombinant dargestellt werden. Dazu wurde ein dicistronisches Konstrukt kloniert, welches die Expression von H₆-getagtem dSMN zusammen mit H₆-GST-getagtem dGemin2 unter der Kontrolle des Arabinose-Operators erlaubte. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass beide Proteine in etwa demselben Ausmaß translatiert werden und somit bereits in der Bakterienzelle einen Komplex ausbilden können. Nach Aufreinigung des dSMN/dGemin2-Dimers mittels NiNTA-Sepharose wurde es erneut an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit einem Überschuss an rekombinant hergestellten oligomeren Sm-Proteinen einzeln und in allen möglichen Kombinationen inkubiert. Um die unspezifische Bindung der sehr basischen Sm-Proteine an das Kunststoffreaktionsgefäß zu verringern, wurde Rinderserumalbumin zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach exzessivem Waschen der matrixgebundenen Proteine wurde der Komplex mit SDS-Probenpuffer eluiert und im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Dabei zeigte sich, dass das dSMN/dGemin2-Dimer grundsätzlich in der Lage ist, alle Sm-Proteine zu binden (Abbildung 17, Spur 15). Diese binden jedoch in einer hierarchischen Art und Weise. In Abwesenheit des SmE/F/G-Heterotrimer binden SmD1/D2 und Sm B/D3 nur schlecht an dSMN/dGemin2 (Spur 9, 10). In Gegenwart von SmE/F/G erhöht sich die Affinität des dSMN/dGemin2-Komplexes für SmD1/D2 deutlich (Spur 14) und nun kann auch das SmB/D3-Dimer relativ effizient binden (vergleiche Abbildung 17, Spur 9 mit Spur 15). Somit binden die Sm-Proteine kooperativ an das dSMN/dGemin2-Dimer.

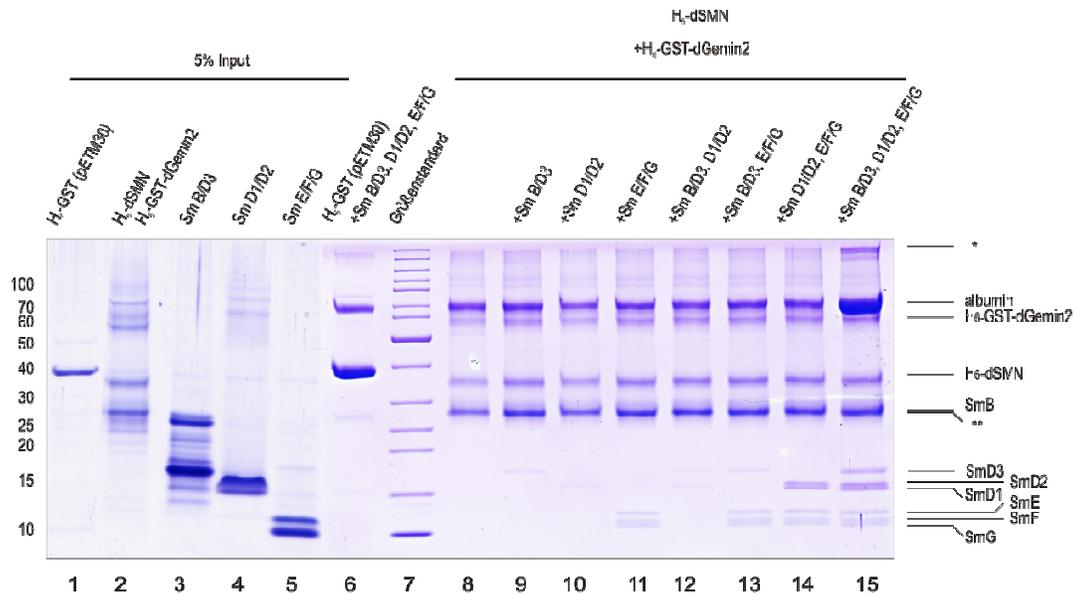


Abbildung 17: Das dSMN/dGemin2-Dimer bindet alle Sm-Proteine

Ein von einem dicistronischen Konstrukt in *E. coli* exprimiertes Dimer aus H₆-GST-dGemin2 und H₆-dSMN wurde an Glutathion-Sepharose gebunden und mit den gereinigten Sm-Protein-Heterooligomeren B/D3, D1/D2 und E/F/G in Gegenwart von BSA inkubiert. BSA wurde benutzt, um unspezifische Bindung der Sm-Proteine zu vermeiden. H₆-GST wurde ebenfalls mit den Sm-Proteinen beladen und diente als Negativkontrolle. Die einzelnen Sm-Protein-Oligomere binden an das dSMN/dGemin2-Dimer mit geringer Affinität. In Gegenwart von Sm E/F/G ist die Bindung von Sm D1/D2 an das dSMN/dGemin2-Dimer deutlich stärker (vgl. Spuren 10 und 14). Bezüglich SmB/D3 beobachtete ich eine geringere Kooperativität. Mit * sind unvollständig denaturierte Proteine bezeichnet, ** weist auf ein Abbauprodukt von H₆-GST-dGemin2 hin.

3.4.9. Rekonstituierter dSMN-Komplex katalysiert die UsnRNP-Zusammenlagerung

Somit reichen dSMN und dGemin2 aus, um alle Sm-Proteine zu binden. Folglich stellte sich die Frage, ob dieser Komplex auch in der Lage ist, UsnRNAs zu erkennen und in einen *UsnRNP-core*-Partikel zu integrieren. Dazu wurde der dSMN/dGemin2-Komplex mit allen Sm-Proteinen beladen, von der Glutathion-Sepharose nativ mit Glutathion-haltigem Puffer eluiert und das Eluat *in vitro* mit radioaktiv markierter dU1snRNA, dU1ΔSm und dU85scaRNA inkubiert. Um auszuschließen, dass unspezifisch z.B. an das Reaktionsgefäß oder die Sepharosematrix gebundene Sm-Proteine spontan mit der U1snRNA einen *Sm-core*-Partikel bilden, wurde als Kontrolle rekombinant vom Vektor pETM-30 exprimiertes H₆-GST an die Glutathion-Sepharose gebunden, ebenfalls mit Sm-Proteinen inkubiert, von der Matrix eluiert und dann mit *in vitro* transkribierten RNAs inkubiert. Um spontanes und katalysiertes Assembly vergleichen zu können, wurden Sm-Proteine unmittelbar mit allen untersuchten RNAs zusammengebracht. Zugleich diente dies als Positivkontrolle für die

Zusammenlagerung. Die Reaktionsprodukte wurden dann wie in 3.4.7 beschrieben in der nativen RNA-PAGE analysiert.

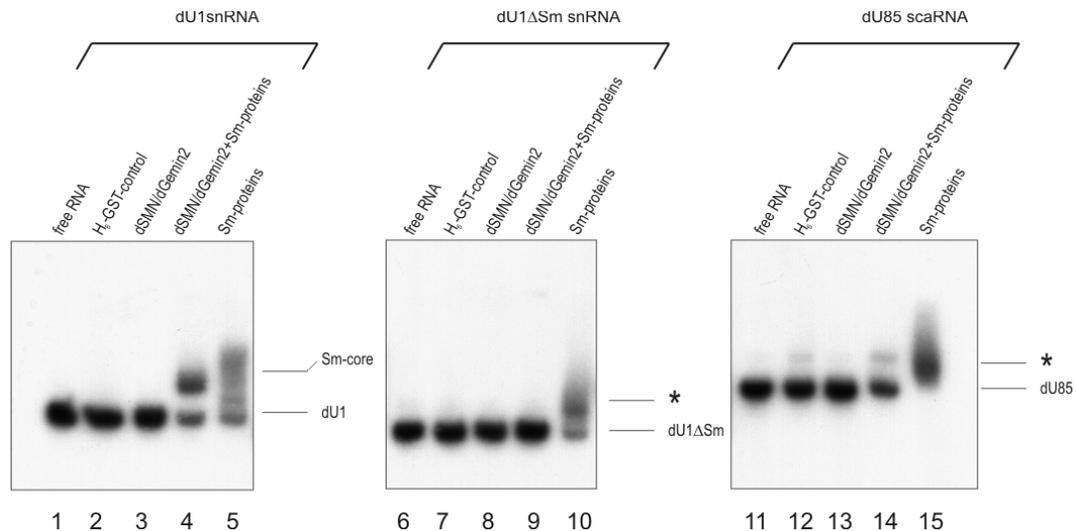


Abbildung 18: Rekonstituiertes dSMN/dGemin2-Dimer katalysiert die Zusammenlagerung des UsnRNP cores

In vitro transkribierte U1snRNA, U1 Δ Sm und U85scaRNA wurden bei 25°C mit eluiertem dSMN/dGemin2-Dimer alleine oder nach vorheriger Beladung mit Sm-Proteinen inkubiert. H₆-GST wurde vor Elution mit Sm-Proteinen pseudo-“beladen”, um eine spontane Zusammenlagerung des *UsnRNP-core*-Partikels durch freie Sm-Proteine in der Präparation auszuschließen. dSMN/dGemin2 erlauben die Ausbildung eines distinkten UsnRNP core-Partikels in Gegenwart (Spur 4) aber nicht in Abwesenheit (Spur 9) der *Sm-site*. Eine äquimolare Mischung von Sm-Proteinoligomeren bindet an U1snRNA (Spur 5) und bildet einen mäßig definierten RNP aus, der in Teilen wohl dem *Sm-core*-Partikel entspricht. Jedoch binden die Sm-Proteine auch an U1 Δ Sm und U85scaRNA (Spuren 10, 15, Sternchen). Folglich agiert das dSMN/dGemin2 Heterodimer als molekulares Chaperon um die unspezifische Bindung der Sm-proteine an “falsche” RNAs zu verhindern. Die schwache zusätzliche RNA-Bande, die besonders in den Spuren 12 und 14 auftritt, entspricht einer alternative gefalteten U1 Δ Sm snRNA.

Zunächst wurde nachgewiesen, dass es zu keinem Assembly in Gegenwart von H₆-GST kommt. Dies ließ den Schluss zu, dass keine freien Sm-Proteine in der Präparation vorhanden waren, durch die das Assembly autonom hätten stattfinden können. Hingegen zeigte sich in Anwesenheit des mit Sm-Proteinen beladenen dSMN-Komplexes die Bildung eines stabilen UsnRNA-core-Partikels an der U1snRNA (Abbildung 18, Spur 4). Die U1 Δ Sm (Spur 9) und dU85scaRNA (Spur 14) genügten indes nicht für die Ausbildung eines *Sm-core*-Partikels. Sm-Proteine alleine bildeten mit der dU1snRNA einen vergleichsweise unscharf migrierenden Komplex aus (vergleiche Spur 5 mit Spur 4). Darüber hinaus banden die Sm-Proteine unspezifisch an die U1 Δ Sm und die dU85scaRNA (Spur 10 und Spur 15) in jeweils unscharf migrierenden Komplexen. Diese Daten zeigen, dass dSMN und dGe-

min2 nicht nur ausreichen um alle Sm-Proteine zu binden, sondern auch um sie auf die *Sm-site* der UsnRNA zu übertragen. Dabei entsteht ein *Sm-core*-Partikel, welcher definiertere Laufeigenschaften in der nativen RNA-PAGE aufweist, als ein spontan entstehender.

3.5. Menschliches SMN und Gemin2 genügen zur Bildung des *UsnRNP-core* Partikels
 Diese Befunde erlaubten die weit reichende Hypothese, dass SMN und Gemin2 ganz allgemein, also auch in Vertebraten, ausreichen, um die Zusammenlagerung des *Sm-core*-Partikels zu katalysieren.

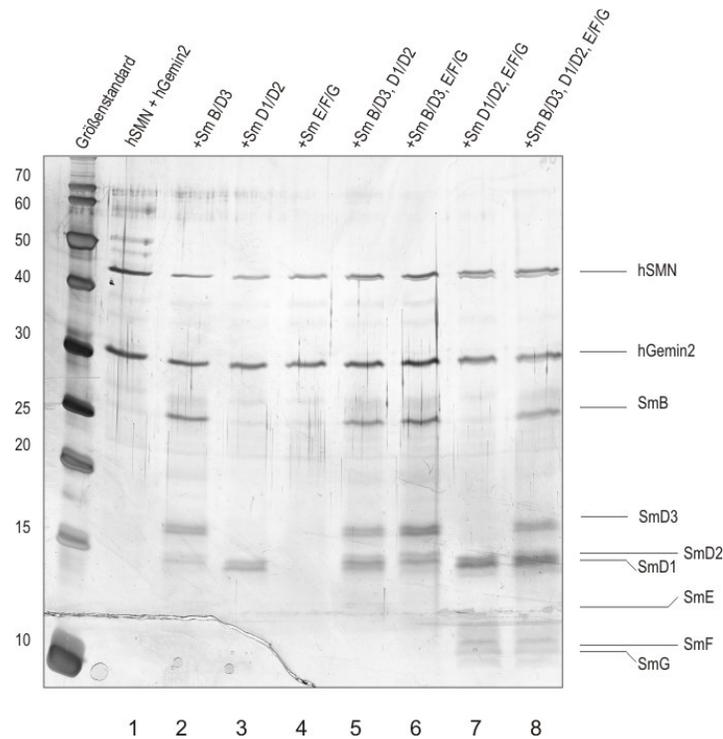


Abbildung 19: Humanes SMN/Gemin2-Heterodimer bindet alle Sm-Proteine

Rekombinant exprimierter humanes SMN- und Gemin2-Protein wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit Heterooligomeren der Sm-Proteine analog zu Abbildung 17 beladen. Nach ausgiebigem Waschen wurden die an die Matrix gebundenen Komplexe mit der PreScission-Protease abgespalten und im silbergefärbten SDS-PAGE (13%, Tris/Glycin) analysiert. Das hSMN/hGemin2-Dimer (Spur 1) bindet SmB/D3 (Spur 2) und SmD1/D2 (Spur 3), aber nicht SmE/F/G alleine (Spur 4). In Gegenwart von SmD1/D2 wird SmE/F/G effizient gebunden (Spur 7), was auf konservierte Bindungseigenschaften dieser beiden Heterooligomere zwischen *Drosophila* und Vertebraten hinweist.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden hSMN und hGemin2 analog zur geschilderten Vorgehensweise in *Drosophila* koexprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit Sm-Proteinen beladen. Nach reichlichem Waschen und proteolytischem Verdau mit PreScission-Protease wurde das freigesetzte Dimer im silbergefärbten SDS-PAGE auf die Bindung der verschiedenen Sm-Protein-Heterooligomere untersucht. Dabei zeigte sich, dass

hSMN und hGemin2 ebenfalls in der Lage sind, alle Sm-Proteine zu binden, jedoch in einer leicht modifizierten Weise. In der Tat bindet das Sm E/F/G-Heterotrimer alleine nicht an das hSMN/hGemin2-Dimer (Abbildung 19, Spur 4). In Gegenwart von Sm D1/D2 jedoch ist diese Bindung deutlich vorhanden (Abbildung 19, Spur 7). Diese Kooperativität erinnert an die Situation in *Drosophila*, wenngleich dort SmD1/D2 alleine ebenfalls an das dSMN/dGemin2-Dimer bindet. Dieser Befund warf die Frage auf, ob damit hSMN und hGemin2 zusammen in der Lage sind, die Zusammenlagerung von UsnRNP core-Partikeln zu katalysieren. Zur Klärung dieser Frage wurde analog zu den Experimenten in *Drosophila* vorgegangen und die eluierten Komplexe mit radioaktiv markierter U1snRNA und einer U1-Variante mit mutierter *Sm-site* (U1 Δ D, TAATTTT nach CTCGAG [124, 125]) inkubiert.

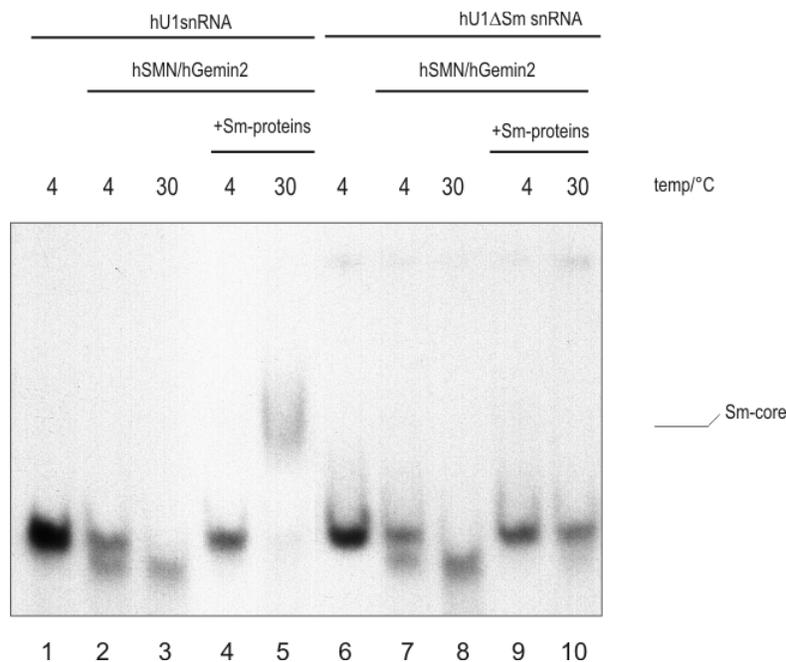


Abbildung 20: Humanes SMN/Gemin2-Heterodimer katalysiert die Zusammenlagerung des *UsnRNP-core*-Partikels

Das humane SMN/Gemin2-Dimer wurde alleine (Spuren 2, 3, 7, 8) oder nach Beladung mit Sm-Proteinen (Spuren 4, 5, 9, 10) mit U1snRNA (Spuren 1-5) oder einer Mutante mit substituierter *Sm-site* (U1 Δ Sm, [124, 125]) inkubiert. Bei 30°C kommt es zu einem effizienten Transfer der Sm-Proteine auf die *Sm-site* der U1snRNA durch das SMN/Gemin2-Heterodimer (Spur 5, *Sm-core*).

Interessanterweise zeigte sich effizientes Assembly des *Sm-core*-Partikels bei 30°C, aber nicht bei 4°C in Gegenwart der *Sm-site* tragenden U1snRNA. An die mutierte U1snRNA (U1 Δ Sm) banden die Sm-Proteine jedoch nicht. Insgesamt führten diese Experimente und Überlegungen zu der neuen Einsicht, dass SMN und Gemin2 als konservierte Kernkomponenten des SMN-Komplexes ausreichen, um die Zusammenlagerung von *UsnRNP-core*-

3. Ergebnisse

Partikeln zu katalysieren. Es erhebt sich daher die interessante Frage, zu welchem Zweck im Laufe der Evolution weitere Komponenten zu dieser Basiseinheit hinzugekommen sind und welche Funktionen sie im Einzelnen erfüllen.

4. DISKUSSION

4.1. Überlegungen zur Heuristik

Mehr als 10 Jahre sind vergangen seit den Entdeckungen, dass das SMN-Protein eine Funktion bei der Zusammenlagerung des UsnRNP-Partikels erfüllt und Teil eines makromolekularen Komplexes ist [18, 19]. Seither wurde - zunächst mittels eines *yeast-two-hybrid-Screens* und später mittels Massenspektrometrie, die Zusammensetzung dieses Komplexes so weit aufgeklärt, dass keine wesentlichen neuen Komponenten mehr zu erwarten sind. Es ist beeindruckend, dass eine Anzahl dieser Komponenten bereits in der grundlegenden Veröffentlichung vorweggenommen wurde. Je mehr Komponenten jedoch identifiziert wurden, desto unwahrscheinlicher erschien es, dass alle diese Proteine für die Zusammenlagerung des heptameren Rings von Sm-Proteinen um die *Sm-site* der UsnRNA erforderlich sein sollten. Für einen Prozess, der *in vitro* spontan ablaufen kann.

Bei der Untersuchung komplexer biologischer Prozesse hat es sich als sinnvoll erwiesen, in einfacheren Organismen zunächst die Prinzipien zu verstehen, um anschließend die bei komplexeren Spezies hinzukommende Modulation und Modifikation dieser Vorgänge anzugehen. Mit einigem Erfolg wurde diese Herangehensweise in der Zellbiologie und besonders in der Entwicklungsbiologie genutzt. In letzterer Disziplin hat sich unter dem Begriff „evo-devo“ (evolutionary developmental biology) eine eigene Gruppe von Spezialisten gebildet, die eine Schnittstelle zwischen Phylogenomik, Entwicklungsbiologie, vergleichender Systematik und Paläontologie bilden. Prominente zellbiologische Beispiele für den Erfolg dieser Vorgehensweise sind etwa Vesikelfusion, -transport und Endo-/Exozytose. Diese Prozesse wurden zunächst mittels eines genetischen Screens in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eingehend untersucht [126]. Einige Vorgänge, wie die Vesikelabschnürung (v.a. an Synapsen), wurden ausführlich in *Drosophila* studiert [127, 128], was die Übertragung der zugrunde liegenden Mechanismen auf höhere Organismen [129] erleichterte. Auf einer mehr globalen Ebene ermöglichte die Verfügbarkeit der Genomsequenzen zahlreicher Organismen vergleichende genomweite Studien. So wurde mit der Sequenzierung des Genoms von *Nematostella vectensis* klar, dass die Wnt-Genfamilie – ganz ähnlich wie in Vertebraten – aus 12 Subfamilien besteht, während in *Drosophila* und *C. elegans* nur sechs vorhanden sind [130]. Die Gegenüberstellung genomischer Daten mit dem jeweiligen Phänotyp soll dann Rückschlüsse auf evolutionäre Muster und die Funktion eines Gens oder einer Gruppe von Genen, eines Gen-Clusters, bei Entwicklungsprozessen erlauben.

Es erschien erfolgversprechend, die Zusammensetzung des SMN-Komplexes unter einem evolutionsbiologischen Blickwinkel zu studieren. Die Auswahl der Organismen wurde dabei weitgehend durch den Fortschritt der jeweiligen Sequenziervorhaben diktiert. Allerdings wurde in dieser Studie bereits ein sehr breites Spektrum an Organismen untersucht. Diese spannen bei den Tieren einen Bogen vom einfachen radiärsymmetrisch aufgebauten Cnidarium über mehrere Ecdysozoen (umstrittenes Taxon, vgl. [131]) bis hin zu mehreren Repräsentanten der Chordaten. Mit *Dictyostelium* wurde ein Organismus zwischen Pflanzen einerseits und Tieren und Pilzen andererseits [132] untersucht, daneben mehrere Pflanzen und Pilze.

Organismus	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. discoideum</i>	<i>N. crassa</i>	<i>N. vectensis</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>D. mel.</i>	<i>H. sapiens</i>
Genomgröße (Mb)	12	12,5	34	38,6	450	125	180	3000
Genanzahl	5.900	4.900	12.500	10.000	25.000	25.500	13.600	22.000
Gendichte (kb pro Gen)	2,0	2,6	2,7	3,9	18,0	4,9	13,2	94

Tabelle 4: Genomdaten zu relevanten Modellorganismen

Die Genomgröße und Genanzahl korreliert nicht direkt mit dem Fortschreiten der stammesgeschichtlichen Entwicklung. Daten aus [132] und [133].

Zwei methodische Vorbehalte sind allen genomweiten Studien gemeinsam:

Zum ersten können nur die Genome von Organismen untersucht werden, die Gegenstand von Sequenziervorhaben (gewesen) sind. So führte der Vergleich zwischen den Genomen von *Drosophila* und *C. elegans* einerseits und von höheren Eukaryoten andererseits zu einer vermuteten Genzahl von 15000 Genen für primitive Metazoen [134]. Neueste Daten aus der Seeanemone *Nematostella vectensis* zeigen jedoch, dass die Seeanemone etwa 25000 Gene besitzt [133], etwa genau so viele wie der Mensch (22000, siehe Tabelle 4). Somit haben alle vergleichenden Studien den Vorbehalt der Vorläufigkeit.

Zum zweiten können solche Analysen jeweils nur so gut sein, wie das zu Grunde liegende Datenmaterial, d.h. die Vollständigkeit und Annotation der sequenzierten Genomdaten. Die in dieser Studie verwendeten Genomdaten boten jedoch in jedem Falle eine mehrfache Sequenzabdeckung. Zusätzlich zur jeweiligen Proteinvorhersage wurden die Datenbanken auf genomischer Ebene durchsucht, um falsch negative Befunde auszuschließen.

In den wenigsten Fällen wurden bislang komparative Genomstudien einer unmittelbaren biochemischen Validierung unterzogen. Auch fanden diese Methoden nach meinem Wissen bisher keine Anwendung auf die Entstehung und Abwandlung eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden Komplexes. Um angesichts der systematischen Fallstricke der bioinformatischen Analyse gesichertere Daten zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die biochemische Isolierung und Analyse eines vermuteten minimalen SMN-

Komplexes angestrebt. Die Schaffung der dafür erforderlichen biologischen Werkzeuge war Kernbestandteil dieser Studie.

4.2. Ursprung und Evolution des SMN-Komplexes

4.2.1. SMN und Gemin2 sind die Kernkomponenten des SMN-Komplexes

Den evolutionären Kern des SMN-Komplexes bilden die Proteine SMN und Gemin2. Wie Abbildung 6 zeigt, finden sich beide Proteine in allen untersuchten Reichen des Lebens, dem der Pilze, Tiere und Pflanzen sowie in *Dictyostelium*. Der Befund, dass in *S. pombe* durch die PSI-BLAST-Suche die Orthologen von SMN, Yab8p, und Gemin2, Yip1p, zutreffend identifiziert wurden, stützt die Validität des bioinformatischen Ansatzes. Yip1p war in einem yeast-two-hybrid-screen als Interaktor des SMN-Orthologs Yab8p identifiziert und diese Interaktion biochemisch detailliert analysiert worden [112]. Interessanterweise sind die Verhältnisse in *S. cerevisiae* anders. In diesem Organismus wurde ein lediglich entfernt verwandtes Ortholog von Gemin2, Brr1p (Bad response to refrigeration), identifiziert, jedoch kein SMN-Ortholog. Demnach gibt es in der Bäckerhefe keinen funktionalen SMN-Komplex. Interessanterweise wurde die sehr gering ausgeprägte Homologie von Brr1p zu humanem Gemin2 bereits in der initialen Publikation [19] beschrieben. In einer späteren Veröffentlichung aus unserem Labor wurde dieser Befund in Frage gestellt. In den vergangenen Jahren sind die Größe der Datenbanken und die Anzahl der sequenzierten Genome stark angestiegen. Zusammen mit der Entwicklung iterativer Algorithmen (PSI-BLAST, [76]) ist nunmehr eine zuverlässige Identifizierung von Orthologen auch bei gering ausgeprägter Homologie möglich. Folglich fanden wir Brr1p als einzig signifikantes Homolog von humanem Gemin2 (NP_003607.1, PSI-Blast dritte Iteration, $E = 3 \times 10^{-5}$) and *Schizosaccharomyces pombe* Yip1 (NP_594775.1, vierte Iteration, $E = 3 \times 10^{-5}$). Nachdem auch die umgekehrte Suche diese Homologie klar reproduziert, ist Brr1p das Ortholog des humanen Gemin2. Auf Grund der genetischen Interaktion von Brr1p mit SmD1 und einigen biochemischen Daten wurde eine Rolle von Brr1p bei der Biogenese von UsnRNPs postuliert [135, 136]. Andererseits ist davon auszugehen, dass sich die UsnRNP-Biogenese in *S. cerevisiae* fundamental von jener in höheren Eukaryoten unterscheidet. In der Tat ergab eine genomweite Vergleichsstudie, dass die Bäckerhefe seit ihrer Radiation von ihrem mit *S. pombe* gemeinsamen Vorläufer 300 Gene komplett verloren hat und weitere 300 weit über das erwartbare Maß hinaus divergiert sind [137], siehe auch [138]. Erstaunlicherweise betreffen die Genverluste unter anderem das Spleißosom. Das wird verständlich, wenn man bedenkt,

dass nur 3% der Gene in *S. cerevisiae* überhaupt Introns besitzen, welche dazu noch relativ kurz sind. Nur 6 Gene besitzen 2 Introns. Verglichen damit besitzen 43% der *S.pombe*-Gene Introns [139]. Dem zu Folge könnten bestimmte Faktoren des Spleißapparats entbehrlich geworden ein, und ebenso ein effizientes System der Zusammenlagerung von UsnRNPs. Zusammengenommen ergibt sich also der Schluss, dass das SMN-Gen in *S. cerevisiae* sekundär verloren ging, während das Gen für Gemin2 Brr1p extrem divergierte.

4.2.2. Der SMN-Komplex evolviert durch modulare Expansion

Neben SMN und Gemin2 stellen Gemin3 und Gemin5 die phylogenetisch ältesten Komponenten dar. In *Dictyostelium* finden sich diese beiden Proteine erstmals. Da das Genom der Grünalge *Ostreococcus tauri* für ein entfernt verwandtes Gemin5-Ortholog codiert, muss das Gemin5-Gen in den Landpflanzen unabhängig verloren gegangen sein. Nicht ganz auszuschließen ist aufgrund der bioinformatischen Daten, dass es sich beim putativen *Dictyostelium*-Orthologen nicht-orthologes Protein ähnlicher Aminosäurezusammensetzung wie Gemin5 handelt. In jedem Fall wird die Erweiterung des Komplexes in *Dictyostelium* um Gemin3 und Gemin5 in Metazoen beibehalten. Neben diesen ist das Genrepertoire im niedrigsten der untersuchten Metazoen, der Seeanemone, um die Gene für Gemin6, 7 und 8 erweitert. Diese Konfiguration des SMN-Komplexes ist dann konserviert in allen Metazoen (Ausnahmen werden unten diskutiert). Erst auf Ebene der Deuterostomia (niederster Organismus: Seeigel) komplettiert Gemin4 den SMN-Komplex, wie wir ihn aus dem Menschen kennen. Somit beobachten wir in den rezenten Arten eine Expansion des SMN-Komplexes in modularen Schritten mit Fortschreiten der stammesgeschichtlichen Entwicklung. Man kann daher Korrelationen zwischen der jeweils typischen Zusammensetzung des SMN-Komplexes und bestimmten evolutionären Errungenschaften aufstellen:

SMN/Gemin2:	Eukaryoten (außer Protisten, nicht studiert)
+ Gemin3/5:	(fakultativ) multizelluläre Lebensweise
+ Gemin 6/7/8:	Metazoen
+ Gemin4:	Deuterostomia

Dieser Befund zeigt eine deutliche Analogie zu biochemischen Daten von Otter und Mitarbeitern [44]. Verschiedene Techniken wurden in dieser Studie angewandt, um die Interaktionen der Proteine innerhalb des humanen SMN-Komplexes aufzuklären. Eine Zusammenfassung der Resultate zeigt Abbildung 2. Demnach bilden die Proteine SMN, Gemin2 und Gemin8 das Rückgrat des Komplexes. Gemin8 bildet die Brücke zu den periphe-

ren Komponenten Gemin7, Gemin6 und UNRIP sowie zu Gemin4, welches auch mit Gemin3 interagiert. Gemin5 wird über Gemin2 zum Komplex rekrutiert. Somit ist der humane SMN-Komplex aus Modulen aufgebaut, in denen jeweils mehrere Proteine zusammengefasst sind. Unter geeigneten Bedingungen sollten sich Subkomplexe, etwa bestehend aus Gemin6, Gemin7 und UNRIP oder Gemin3 und Gemin4, oder einzelne Proteine wie Gemin5 vom Gesamtkomplex dissoziieren lassen. Einen ersten Hinweis in diese Richtung ergaben Befunde, wonach eine hohe Salzkonzentration (1,5 M NaCl) die Bindung von Gemin5 an den übrigen SMN-Komplex aufhebt (Abb. 6B in [44]). Nach *knockdown* des SMN-Proteins mittels RNA-Interferenz [140] treten in der Tat solche Subkomplexe auf. Auch in Extrakten aus wildtypischen HeLa-Zellen wurde die Gegenwart solcher Komplexe demonstriert. Inwiefern diese *in vivo* existieren, ist bislang unklar. Unsere evolutionären Daten rekapitulieren also biochemische Befunde. Dies führt zu der Frage, ob die einzelnen Module des SMN-Komplexes bestimmte spezifische Funktionen innerhalb des SMN-Komplexes erfüllen. Erhellend ist zur Beantwortung der Frage die Betrachtung von Ausnahmen.

4.3. Dipteren besitzen einen radikal vereinfachten SMN-Komplex

Die Untersuchung von Ecdysozoen (umstrittenes Phylum, umfasst sich häutende Tiere wie Nematoden und Arthropoden) führte zu dem Ergebnis, dass einige von ihnen, so die Honigbiene (Hymenoptera:Apidae) und die parasitische Wespe *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera:Pteromalidae) wie erwartet die Genausstattung besitzen, die für SMN, Gemin2, 3, 5, 6, 7 und 8 codiert. Dasselbe gilt für *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). Hingegen besitzen die Dipteren *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) und *Drosophila melanogaster* (Diptera:Drosophilidae) sichere Orthologe nur für SMN, Gemin2 und Gemin3. In beiden Fällen existiert zusätzlich ein Gen, welches für ein Gemin5-Ortholog codiert, dessen Sequenzhomologie jedoch ausgesprochen gering ist. Um zu untersuchen, inwieweit die Proteine tatsächlich Gemin-Orthologe sind, verglich Prof. Schultz die Evolutionsgeschwindigkeit dieser Proteine in Dipteren mit jener in anderen Phyla. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Gemin3-Orthologe, als auch die Gemin5-Orthologe einem relaxierten Konservierungsdruck ausgesetzt sind. In anderem Zusammenhang beobachtet man ein solches Phänomen beispielsweise nach einer Genduplikation: Die ursprünglich identischen Gene divergieren und nehmen jeweils andere Teilaufgaben wahr (Subfunktionalisierung). Somit eröffnet dieser bioinformatische Befund die hypothetische Möglichkeit, dass die stark divergenten Gemin3- und Gemin5-Orthologe z.B. in einen neuen Funktionszusammenhang rekrutiert

wurden oder neue Aufgaben im alten Funktionszusammenhang wahrnehmen. Derartige Veränderungen in der Funktion eines Proteins sind im evolutionären Maßstab häufige Ereignisse. So wurde in einer bioinformatischen Studie abgeschätzt, dass sich je 1 Million Jahre Divergenz 10^5 paarweise Interaktionen eines Proteins ändern. Über das gesamte Proteom eines Organismus gerechnet, ändern sich somit je 1 Million Jahre Divergenz z.B. im Falle des Menschen 1000 Proteininteraktionen [141]. Die Neigung eines Protein-codierenden Gens, verloren zu gehen (*Propensity for Gene Loss*, PGL), korreliert dabei unter anderem mit der Anzahl der Proteininteraktionen, dem Expressionsniveau sowie auch der Anzahl an Substitutionen im Protein-codierenden Gen [142]. So weit Daten aus *S. cerevisiae* verfügbar waren, konnte darüber hinaus in der zitierten Studie eine Korrelation der PGL zum Überleben nach *knockdown* des jeweiligen Produkts gezogen werden.

Demnach beobachten wir in Dipteren einige SMN-Komplex-Komponenten codierende Gene dabei, wie sie divergieren und letztlich andere Funktionen annehmen, während andere (Gemin6-8) bereits vollständig verschwunden sind. Ist nun die Tatsache, dass ausgerechnet in Dipteren Komplexkomponenten verloren gegangen sind oder im Begriff sind, verloren zu gehen, eine Ausnahme in diesen Organismen? Einen ersten Hinweis auf die Lösung dieser Frage erlaubt bereits die oben dargestellte Tabelle 4. *Drosophila* besitzt ein deutlich kompakteres Genom als *Nematostella* und signifikant weniger Gene. Es muss daher angenommen werden, dass das Genom von *Drosophila* sekundär kompakter wurde. In der Anfangszeit der Genomära hat diese Tatsache im Übrigen zu einer spannenden und zugleich sehr erhellenden Kontroverse in der Wissenschaft geführt. Der unmittelbare Vergleich zwischen den Daten des Humanen Genomprojekts (HUGO) und den Genomdaten von Bakterien einerseits und Bäckerhefe/Taufliege/Fadenwurm andererseits hatte zu der Hypothese geführt, dass horizontaler Gentransfer signifikant zum Genrepertoire des Menschen beiträgt [143]. Rasch stellte sich heraus, dass diese Idee eine Überinterpretation (vgl. [144]) der vorhandenen Daten darstellte und es just in den Modellorganismen *Drosophila* und *Caenorhabditis* zu einem beeindruckenden Genverlust gekommen ist [145, 146]. Dieser Sachverhalt wurde in jüngster Zeit wiederum durch den sehr informativen Genomvergleich mit den Nesseltieren illustriert: Es zeigte sich, dass die meisten bis zum damaligen Zeitpunkt bekannten ESTs in *Acropora millepora* eher Orthologe z.B. in Vertebraten als in *Drosophila* oder *C. elegans* besitzen [147]. Der adaptive Nutzen eines solchen Genverlusts bzw. einer solchen Genomkontraktion/-kompaktierung (beide Begriffe sind gebräuchlich) ist jedoch unklar. Vertreter der komparativen Genomik und Entwicklungsbiologie beschränken sich

bewusst auf eine rein deskriptive Rolle [131]. Die gefundenen Beispiele (Hox-Gene, Retin-säuresignalweg, DNA-Methylierung) werden stets am Einzelfall diskutiert und zur Hypothesenbildung herangezogen. Eine ökologische (ultimate) Erklärung könnte im Nutzen eines kompakteren Genoms für die besondere, „vereinfachte“ und spezialisierte Lebensweise oder die rasche Reproduktion solcher Tiere darstellen. Eine genetische (proximate) Ursache für kompaktere Genome (wenn auch überwiegend in nicht-codierenden Bereichen der DNA) könnte in der Kontrolle transposabler Elemente liegen [148, 149]. Daten aus der soeben vorgelegten komparativen Studie von 10 Genomen der Gattung *Drosophila* werden dazu beitragen, diese Frage besser zu verstehen [150-153].

In jedem Falle erschien es lohnend, der Frage biochemisch näher auf den Grund zu gehen, welche Faktoren tatsächlich den dSMN-Komplex aufbauen, und inwiefern die Orthologen von Gemin3 und Gemin5 Bestandteile dieses Komplexes sind. Die Bioinformatik alleine erlaubt keine Aussage, ob und inwieweit diese Kandidaten noch Teil des SMN-Komplexes sind oder in einem funktionellen Zusammenhang mit diesem stehen. Wie erwähnt, wird der biochemische Nachweis der Funktion von Orthologen selten geführt. Hierzu bedurfte es zunächst der Etablierung eines biochemischen Verfahrens, das die Aufreinigung des Komplexes erlaubt.

4.4. SMN und Gemin2 sind in *Drosophila* Schneider2-Zellen zytoplasmatische Proteine
 Als ein erster Schritt zur Analyse der zellulären Funktion des *Drosophila*- Orthologs von SMN und Gemin2 wurden spezifische Antikörper generiert und damit die Lokalisation der Proteine in der Zelle untersucht. Humanes SMN-Protein und die übrigen Gemine zeigen eine charakteristische subzelluläre Verteilung: Neben dem Zytoplasma, wo ein diffuses Muster vorherrscht, findet man sie auch in definierten nukleären Kompartimenten, den Gemini of Cajal-Bodies. Interessanterweise verhält es sich in *Drosophila*-Schneider2-Zellen differenzierter. Es wurde berichtet, dass in Schneider2-Zellen dSMN ausschließlich zytoplasmatisch vorkommt [154]. Dies trifft jedoch nur in erster Annäherung zu. Neben einer überwiegend zytoplasmatischen Lokalisation zeigte sich konfokalmikroskopisch zusätzlich eine meist dispers punktierte nukleäre Lokalisation von dSMN. In einigen Zellen jedoch ließ sich eine distinktere nukleäre Domäne darstellen. Diese korreliert wahrscheinlich mit dem Cajal-Body bzw. Gemini of Cajal Bodies in diesen Zellen. Die meist gesehene disperse Punktierung stellt somit wahrscheinlich funktionell den Gems ähnliche Bereiche mit geringerer Konzentration an dSMN und dGemin2 dar. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Cajal Bodies/Gems in *Drosophila* bislang nur in den Kernen der Follikel-

und Ammenzellen detektiert wurden. Eine Lokalisation von dSMN wurde dort nur nach Überexpression eines YFP-dSMN-Fusionsproteins gesehen [155]. Die Art und Ausprägung der Lokalisation von dSMN und dGemin2 im Kern überschneidet sich somit mit der aus Vertebraten berichteten, wobei die Funktion von SMN im Zellkern von *Drosophila* noch unklarer ist, als in Vertebraten.

4.5. Entwicklung und Etablierung des *TagIt*-Epitops

4.5.1. Die Verwendung von Epitop-Tags zur Reinigung makromolekularer Komplexe

Für zahlreiche biomedizinische Fragestellungen, wie auch die vorliegende Arbeit, ist die biochemische Aufreinigung von makromolekularen Komplexen aus mehreren Proteinen bzw. Proteinen und Nukleinsäuren ein wichtiger Schritt zur genaueren Charakterisierung ihrer Zusammensetzung und Funktion. In jüngerer Zeit wurden dazu verschiedene affinitätschromatographische Methoden, speziell die Immunaффinitätschromatographie, erfolgreich eingesetzt. Limitierendes Moment ist dabei die Notwendigkeit immunpräzipitierender Antikörper oder andersartiger Affinitätsmatrizes, welche eine Komponente des jeweiligen Komplexes spezifisch binden. Daher werden zunehmend Fusionsprodukte aus einem die Affinitätsmatrix spezifisch bindenden Anteil („Tag“) und dem jeweiligen Zielprotein gentechnisch in die betreffenden Zellen oder Organismen eingebracht. Anschließend kann dann mit Hilfe spezifischer Antikörper oder Affinitätsmatrizes der jeweilige makromolekulare Komplex aus Zelllysate aufgereinigt und für weitere Analysen verwendet werden [156].

Zu den kommerziell angebotenen Tags zur Aufreinigung gehören das His₆-Tag, welches an immobilisierte Schwermetallionen bindet, das GST-(Glutathion-S-Transferase)-Tag, das an immobilisiertes Glutathion bindet oder das Mannose bindende Protein (MBP). Bekannte Tags, die durch spezifische Antikörper erkannt werden, sind das FLAG-Epitop (Fa. SIGMA, Taufkirchen), V5-Epitop (Invitrogen, Karlsruhe), HA-(Hämaggglutinin-) Epitop oder myc-Epitop (jeweils verschiedene Anbieter). Aufgrund der geringen Reinheit der über ein einzelnes Affinitäts epitop isolierten Proteinkomplexe wurden diese häufig miteinander (z.B. FLAG-HA [SIGMA]) oder mit anderen Affinitätschromatographiemethoden kombiniert (Tandem-Affinitätschromatographie). Dies setzt die native Elution des Proteins im ersten Reinigungsschritt voraus, beispielsweise durch Konkurrenz mit synthetisch hergestelltem Peptid. Beispiele für mittels solcher Tandem-Affinitätschromatographie isolierte makromolekulare Komplexe sind:

1. DNA-Protein-Komplexe, wie die MBD2/NuRD and MBD3/NuRD-Komplexe, welche durch eine Kombination von ProteinA mit triple-myc-Tag erlaubte die Identifizierung der Komponenten der [157].
2. RNA-Proteinkomplexe (RNPs), wie der U1snRNP [158], der mittels der aus Protein A und dem Calcium bindenden Protein (CBP) bestehenden TAP-Tag-Methode isoliert wurde [159].
3. Protein-Proteinkomplexe, wie der mittels FLAG-HA- Tandem-Affinitätschromatographie aus HeLa-Zellen aufgereinigte TRAP/Mediator-Komplex [160].

Die mittels Immunaффinitätschromatographie über ein einzelnes Epitop isolierten Proteinkomplexe weisen in den meisten Fällen eine unzufriedenstellende Reinheit auf. Für das FLAG-Epitop ist darüber hinaus bekannt, dass eine Reihe von Proteinen regelmäßig unspezifisch gebunden wird, darunter in humanen Zellen der PRMT5-Komplex [161]. Die Kombination von zwei Epitopen erhöht häufig die Reinheit; jedoch ist eine solche Tandemaffinitätschromatographie gegenwärtig in vielen Fällen äußerst ineffizient und erfordert daher oft exzessive Mengen an biologischem Material zur Isolierung präparativer Mengen. Für die präparative Isolierung des TRAP-Mediator-Komplexes [160] mittels FLAG-HA-Tandemaffinitätschromatographie wurden beispielsweise 20 Liter Suspensionskultur von HeLa-Zellen eingesetzt. Zudem erfordert die Methode regelmäßig langwierige und kostspielige Optimierungen. Schließlich erfordert die eluierte Proteinpräparation in vielen Fällen weitere Aufbereitung etwa durch denaturierende Fällungen, die stets mit Mengen- und Qualitätsverlusten einhergeht und auch in Veränderungen der Stöchiometrie von Komplexkomponenten resultieren kann.

Für zahlreiche Zelltypen und Organismen ist bisher keine Methode zur Isolierung intrazellulärer makromolekularer Komplexe beschrieben. Besonders für die in dieser Arbeit zu untersuchende Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* stand bisher keine standardisierte Isolationsmethode von makromolekulare Komplexen, etwa aus *Drosophila*-Zellkulturen oder transgenen Fliegen zur Verfügung (siehe aber [162]).

4.5.2. Der Antikörper 7B10 und sein Epitop

Zur Aufklärung der Zusammensetzung des humanen SMN-Komplexes hat sich der monoklonale Antikörper 7B10 als besonders nützlich dargestellt [20]. Wie gezeigt worden war, erkennt dieser die oder einen Teil der ersten 30 Aminosäuren des humanen SMN-Proteins. Später wurde entdeckt, dass sich immunpräzipitierter SMN-Komplex unter nativen Bedin-

gungen vom immobilisierten Antikörper eluieren lässt, indem man mit einem synthetischen Peptid hSMN1-30 kompetiert. Dies ermöglichte in der Vergangenheit die genauere Charakterisierung von Komponenten des humanen SMN-Komplexes. Von entscheidendem Vorteil war dabei die Armut der Elutionen an Kontaminanten. Die native Elution erlaubte es weiterhin, den isolierten Komplex funktionell zu analysieren.

4.5.3. Das Epitop von 7B10 fehlt im SMN-Protein von *Drosophila melanogaster*

Eine erste Idee war es daher, den *Drosophila*-SMN-Komplex mit eben diesem Antikörper zu präzipitieren. Jedoch hatte sich bereits bei Inspektion der Sequenz von dSMN gezeigt, dass sein Epitop im *Drosophila*-SMN-Protein fehlt. Versuche, den dSMN-Komplex mittels FLAG-HA-Tandemepitop zu reinigen, erwiesen sich initial als wenig erfolgversprechend. Daher überlegte ich, dass sich die hervorragenden Eigenschaften von 7B10 nutzen lassen könnten, wenn man sein Epitop in *Drosophila*-SMN einbringt. In der Tat hatte eine BLAST-Suche ergeben, dass kein anderes Protein in *Drosophila* signifikante Homologie zu SMN1-30 aufweist. Es zeigte sich darüber hinaus kein Signal bei der Untersuchung von Schneider2-Zelllysat im Immunblot mit 7B10. Immunpräzipitationen in Schneider2-Zelllysat ergaben lediglich die Bindung von hsc70, einer häufigen Kontaminante. Um zu verstehen, ob diese Situation nur für *Drosophila* zutrifft, wurde die BLAST-Suche ausgedehnt. Dabei zeigte sich, dass ein SMN1-30 homologes Protein in Invertebraten fehlt. Zur Bestätigung fehlten entsprechende Reaktionen von 7B10 in Zelllysaten von *C. elegans* und weiterer Organismen (nicht gezeigt). Dieses Experiment schließt nicht aus, dass in bestimmten Entwicklungsstadien oder einzelnen Geweben kreuzreagierende Proteine vorhanden sind. Wie unten diskutiert werden wird, konnte diese Möglichkeit weitgehend ausgeräumt werden.

Es erschien nach dem Gesagten möglich, Fusionsproteine aus der Aminosäuresequenz hSMN1-30 und dSMN in *Drosophila* Schneider2-Zellen zu exprimieren. Ein solcher Ansatz in Zellkultur besitzt die Vorteile, dass eine definierte Zellpopulation untersucht wird und sich ausreichende Mengen an biologischem Material aus Rührkulturen gewinnen lassen. Gegenüber der Untersuchung von ganzen Organismen ist darüber hinaus die Materialgewinnung einfach und mit geringem apparativem, Platz- und Kostenaufwand zu bewerkstelligen. Gleichzeitig vor- und nachteilig ist die Tatsache, dass Schneider2-Zellen nur über einen Zelltyp Aufschluss geben und etwaige gewebspezifische Expressionsmuster von Komplexpartnern nicht erfassen. Allerdings ist anzunehmen, dass alle ubiquitären Faktoren, die für den Basisstoffwechsel und die grundlegenden zellulären Prozesse benötigt wer-

den, repräsentiert sin. Nachteile einer Überexpression gegenüber der Expression von endogenem Protein wurden oben (3.4.2) geschildert. Durch die Verwendung des induzierbaren Metallothioneinpromotors wurde jedoch versucht, die Menge des exprimierten Fusionsproteins möglichst niedrig zu halten und so die Bindung des Proteins an seine Komplexpartner zu befördern. Zudem kann es für bestimmte Proteine oder Fragestellungen vorteilhaft sein, möglichst große Proteinmengen zu isolieren, beispielsweise, wenn die Bindung von *in vitro* translatiertem Protein an das in Schneider2-Zellen exprimierte Fusionsprotein gemessen werden soll.

4.5.4. Der *TagIt*-dSMN-Komplex lässt sich effizient aus Schneider2-Zellen aufreinigen
Nach Induktion der Proteinexpression in einer Rührkultur wurden die Zellen durch Beschallung mit Ultraschall lysiert. Diese Methode wurde in Vorversuchen als effizienteste identifiziert. Die Lyse durch Inkubation mit hypotoner Pufferlösung oder mittels Homogenisatoren nach Dounce oder Potter-Elvehjem hatten sich als nicht zufriedenstellend erwiesen. Aufgrund ihrer Kleinheit entgingen die Schneider2-Zellen der Zerquetschung durch das Pistill. Als potentieller Nachteil der Sonifizierung ist auf die unkontrollierte Lyse der Zellkerne zu verweisen. Dies gilt insbesondere, da bekanntermaßen dSMN nach Expression unter einem starken Promotor in den Zellkern migriert [155]. Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Studie wurden jedoch anhand von Immunpräzipitationen des endogenen dSMN überprüft oder aus zytoplasmatischen Extrakten im analytischen Maßstab reproduziert.

Wie Abbildung 12 zeigt, konnte der dSMN-Komplex mittels des *TagIt*-Epitops bereits bei physiologischen Salzkonzentrationen (150 mM, PBS) in relativ reiner Form eluiert werden. Die Elution bei 27°C erwies sich dabei jener bei 4°C hinsichtlich der Ausbeute als überlegen. Eine signifikante proteolytische Degradation wurde dennoch nicht beobachtet. Es ist bemerkenswert, dass sich aus dem Lysat von 2-4 g Zellen bis zu drei konsekutive Aufreinigungen des dSMN-Komplexes durchführen ließen, ohne dass dies zu merklichen Änderungen in der Zusammensetzung oder katalytischen Aktivität geführt hätte. Die Anwendbarkeit des Verfahrens wurde inzwischen anhand weiterer Komplexe illustriert (7.3).

Ein wichtiger Befund ergab sich dabei bei der Analyse von Extrakten aus *TagIt*-dSMN exprimierenden Schneider2-Zellen mittels Glycerol-Gradientenzentrifugation. Hier zeigte sich ein breiter Gipfel mit Maximum bei geschätzt 25S sowohl für das rekombinante *TagIt*-dSMN als auch für das endogene dSMN-Protein. Zudem sedimentierte dGemin2 in den-

selben Fraktionen. Somit ist davon auszugehen, dass das TagIt-dSMN-Fusionsprotein in Schneider2-Zellen in einen ähnlich großen Komplex integriert wie sein endogenes Pendant und der Komplexpartner dGemin2. Aus dem Sedimentationsverhalten ist darüber hinaus eine Oligomerisierung des Komplexes wahrscheinlich. Auch für den humanen SMN-Komplex ist ein solches Verhalten typisch (siehe auch 4.6.1).

4.6. Die Zusammensetzung des dSMN-Komplexes

Bei der Analyse des dSMN-Komplexes im silbergefärbten Polyacrylamidgel fielen mehrere deutlich anfärbbare, sehr scharfe und schmale, aber multipel auftretende Banden auf. In der massenspektrometrischen Analyse ließen sich diesen Banden keine eindeutigen Proteine zuordnen. Dies führte zu der Vermutung, dass es sich bei diesen argyrophilen Molekülen um RNA-Spezies handele. Dementsprechend verschwanden sie nach Phenol-Chloroform-Extraktion aus der organischen Phase (Proteinphase) des Eluats. Grundsätzlich zeigte die Negativkontrolle abgesehen von den Immunglobulinketten lediglich eine Doppelbande bei etwas über 70 kDa, welche als hsc70, ein Co-Chaperon, identifiziert wurden. Im Folgenden sollen zunächst die Proteinkomponenten beschrieben werden.

4.6.1. dSMN und dGemin2 bilden die Kernkomponenten des dSMN-Komplexes

Aus der massenspektrometrischen Analyse des silbergefärbten Polyacrylamidgels erfuhr die *TagIt*-Methode eine nachdrückliche Bestätigung. Neben der prominenten Doppelbande des *TagIt*-dSMN-Proteins wurde dSMN in einer Bande bei etwa 30 kDa detektiert. Somit belegen vier Evidenzlinien die Oligomerisierung des dSMN-Proteins: 1. Das Sedimentationsverhalten des Komplexes in der Gradientenzentrifugation. 2. Die Copräzipitation endogenen Proteins mit *TagIt*-dSMN. 3. Der Phänotyp nach Überexpression des C-Terminus von hSMN in *Drosophila* [65]. 4. Die in einem genomweiten *yeast-two-hybrid*-Screen des *Drosophila*-Proteoms gefundene hochsignifikante Selbst-Interaktion von dSMN [163]. In der Bande bei 30 kDa wurde wie erwartet auch dGemin2 nachgewiesen und im Immunoblot wechselseitig bestätigt. Ein unabhängiger experimenteller Nachweis der Interaktion von dSMN und dGemin2 (CG10419) war darüber hinaus auch im zitierten *yeast-two-hybrid*-Screen geführt worden [163].

Wegweisend war der Befund, dass mit *TagIt*-dSMN alle Sm-Proteine kopräzipitiert wurden. Dies erlaubte den Schluss, dass im isolierten Komplex alle Sm-Protein-Bindungsstellen vorhanden waren, mithin eine Voraussetzung für UsnRNP-Assembly. Über diese allen spleißosomalen UsnRNPs gemeinsamen wurden noch einige UsnRNP-spezifische Proteine

identifiziert. Nicht im Einzelnen nachgewiesen ist bislang, an welchem Schritt der UsnRNP-Biogenese die jeweils spezifischen Proteine binden. Aus anderen Organismen ist jedoch klar, dass das U1 70 K Protein die *stem-loop* A der U1snRNA benötigt [124, 164-166]. Das U1 A-Protein bindet an *stem-loop* II der U1snRNA [167, 168]. U2A' und U2B'' bilden ein Heterodimer und binden kooperativ an *stem-loop* IV der U2snRNA [169, 170]. In *Drosophila* werden U2B'' und U1A gemeinsam durch das Protein SNF repräsentiert [121]. Die Tatsache, dass diese UsnRNP-spezifischen Proteine in unserer Reinigung vorhanden waren, könnte mit der Bindung zumindest der UsnRNAs U1 und U2 an den *TagIt*-dSMN-Komplex erklärt werden. Das Vorhandensein des U5 116K Homolog ist schwieriger zu erklären, da sein Ortholog in der Hefe, Snu114p, das spleißosomale Prp8-Protein benötigt, um in den U5 snRNP integriert zu werden [171]. Jedoch ergab der zitierte genomweite *yeast-two-hybrid*-Screen in *Drosophila* [163] eine hoch signifikante Interaktion von dSMN mit U5 116K, was auf eine direkte Interaktion der Proteine hinweist. Nicht formal auszuschließen ist die Erklärung, dass exprimiertes *TagIt*-dSMN-Proteins in den Kern transloziert, wo es in mit fertig zusammengelagerten UsnRNPs interagieren kann.

Aufgrund ihrer relativ geringen Abundanz oder ihrer Unzugänglichkeit für die Massenspektrometrie können UsnRNP-spezifische Proteine der Analyse entgangen sein. Insgesamt jedoch war nur ein kleiner Teil der existierenden UsnRNP-spezifischen Proteine an den dSMN-Komplex gebunden. Es erscheint demnach, als würde der dSMN-Komplex eine Plattform zu bilden, um genau diese Faktoren mit ihrer zugehörigen snRNA zusammen zu bringen. Andere UsnRNP-spezifische Proteine könnten den UsnRNP dann im Zellkern komplettieren. Ein möglicher Ort wären die in Schneider2-Zellen identifizierten Cajal Body/Gem-Äquivalente. Es erscheint darüber hinaus möglich, dass über die Zusammenlagerung einiger Spezies von UsnRNPs (z.B. U1, U2) andere Schritte im Assembly-Zyklus auch anderer UsnRNPs reguliert werden, z.B. die Transkription der UsnRNAs, oder Basenmodifikationen im Cajal-Körper.

4.6.2. Dhh1 ist keine stabile Komponenten des dSMN-Komplexes in Schneider2-Zellen
 In unserer bioinformatischen Analyse wurde Dhh1 als Gemin3-Ortholog identifiziert. Dhh1 (DEAD-box-Helikase 1) ist trotz gleichen Namens nicht ortholog zu Dhh1 aus *S. cerevisiae*, dessen *Drosophila*-Ortholog Me31B heißt und in P-bodies (Processing bodies) eine Rolle spielt [172]. Neben diesen bioinformatischen Daten weisen genetische Experimente auf eine Interaktion von Dhh1 mit dSMN hin. So ging Dhh1 als hochsignifikanter Interak-

tor von dSMN aus einem genomweiten *yeast-two-hybrid*-Screen hervor [163], und zwar sowohl als *bait* wie als *prey*. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Dhh1 eine Rolle am dSMN-Komplex spielen könnte. Gleichwohl wurde das Protein in der massenspektrometrischen Analyse des Komplexes nicht nachgewiesen. Da für Dhh1 bisher kein Antikörper zur Verfügung steht, wurde das nun etablierte *TagIt*-Epitop genutzt, um eine etwaige Interaktion von Dhh1 mit dSMN biochemisch zu untersuchen. Es zeigte sich, dass eine solche Interaktion nur bei niedriger Stringenz zuverlässig nachweisbar ist. Bereits bei physiologischen Salzkonzentrationen (150 mM NaCl) ist die Bindung von dSMN an *TagIt*-Dhh1 erheblich verringert und bei 250 mM NaCl kaum mehr nachweisbar. Somit ist davon auszugehen, dass Dhh1 zwar mit dSMN interagieren kann, aber möglicherweise nicht in den *Drosophila*-SMN-Komplex integriert ist. Zudem besteht die Möglichkeit, dass durch die Expression von *TagIt*-Dhh1 eine unphysiologische Interaktion mit dSMN herbeigeführt wird, die *in vivo* nicht oder nur unter bestimmten zellulären Bedingungen oder in einzelnen Geweben auftritt. Möglicherweise katalysiert Dhh1 einen dem dSMN-Komplex vor- oder nachgeschalteten Prozess oder spielt anderweitig eine Rolle bei der Zusammenlagerung von UsnRNPs. Auch eine davon unabhängige Rolle in der Zelle ist möglich. Ein Erfolg versprechender Untersuchungsansatz zur Klärung solcher Fragen wäre etwa die phänotypische und genetische Analyse von Dhh1-Mutanten. Die Tatsache einer instabilen Interaktion von Dhh1 mit dSMN ist auch durch den Befund gedeckt, dass Dhh1 verglichen mit den Gemin3-Orthologen der übrigen untersuchten Organismen bedeutend schneller evolviert. Demnach ist es denkbar, dass Dhh1 gegenwärtig im Begriff ist, eine neue Funktion anzunehmen.

4.6.3. Rigor mortis bindet nicht an dSMN

Im Rahmen der Identifikation von Gemin5 als Komponente des SMN-Komplexes [39] wurde die Bindung von Gemin5 an die Sm-Proteine B, D1, D2 und E gezeigt. Später wurde postuliert, dass das Protein für die Identifikation der UsnRNAs am SMN-Komplex verantwortlich sei [173]. Zudem wurden Daten vorgestellt, wonach vom SMN-Komplex dissoziiertes Gemin5 ein Intermediat der Zusammenlagerung von UsnRNPs sei [140]. Ich stellte daher die Frage, ob das Gemin5-Ortholog Rigor mortis an dSMN bindet. Dies wurde auf zweierlei Weise untersucht. Zum einen wurden Affinitätsreinigungen aus einer *TagIt*-Rigor mortis exprimierenden Zelllinie analog zu den für Dhh1 beschriebenen Experimenten analysiert. Andererseits wurden dSMN und dGemin2 aus wildtypischen Schneider2-

Zellen immunpräzipitiert und im Immunoblot auf die Gegenwart von Rigor mortis untersucht. Dabei zeigte sich in keinem der Experimente eine Assoziation von Rigor mortis mit dSMN, dGemin2 und umgekehrt. Obwohl Rigor mortis in Schneider2-Zellen exprimiert wird, bindet es demnach nicht an dSMN. Dies ist darüber hinaus in guter Übereinstimmung mit Daten von Gates et al., die eine Rolle von Rigor mortis bei der Signalübertragung durch das Hormon Ecdyson zeigen [174]. Rigor mortis, obwohl ortholog zu Gemin5, scheint also eine Rolle in einem anderen funktionellen Kontext angenommen zu haben.

4.6.4. Der dSMN-Komplex enthält UsnRNAs

Um zu untersuchen, ob und welche RNAs an den dSMN-Komplex gebunden vorliegen, wurden diese mittels Phenol-Chloroform extrahiert und in einem denaturierenden RNA-PAGE untersucht. Bereits in der Färbung mit Ethidiumbromid zeigten sich spezifisch angereicherte Banden, die nach ihrer Länge den UsnRNAs entsprachen [123]. Zur Bestätigung wurden diese aus dem Gel mittels RT-PCR amplifiziert und kloniert. Zwei Vorbehalte gegenüber diesem Ergebnis wurden in Kontrollexperimenten ausgeräumt. Um auszuschließen, dass durch Lyse der Zellkerne *TagIt*-dSMN auf Grund intrinsischer Affinitäten mit nukleären UsnRNAs assoziiert, wurden zytosolische Extrakte generiert und die Bindung der UsnRNAs aber nicht von Kontroll-Initiator-tRNA (Met-tRNA_i) im Northern Blot nachgewiesen. Um zudem zu untersuchen, ob es sich bei der beobachteten RNA-Assoziation um ein Überexpressionsartefakt handelt, wurden Immunpräzipitationen gegen natives dSMN und dGemin2-Protein in Schneider 2-Zellen durchgeführt. Auch hier zeigten sich spezifische Signale für dU1, dU2, dU4, dU5snRNA, aber nicht für die Initiator-tRNA. Somit bindet in der Tat der dSMN-Komplex jene UsnRNAs, die durch den Komplex mit Sm-Proteinen beladen werden. Ein ähnlicher Befund wurde aus *Xenopus* Oozyten berichtet. Auch in diesem Organismus kopräzipitieren Antikörper gegen SMN und Gemin2 UsnRNAs (gezeigt für U1 und U5) aus zytoplasmatischen Extrakten [18]. Mit dem humanen SMN-Komplex sind UsnRNAs hingegen nicht assoziiert. Offenbar gibt es hier Speziesunterschiede, die mit der Dynamik der Zusammenlagerungsreaktion zusammen hängen könnten. In *Drosophila* (und *Xenopus*) könnte der limitierende Schritt im Assembly-Zyklus (Abbildung 1) nach der Zusammenlagerung des *Sm-core*-Partikels liegen, beispielsweise in der Entlassung des zusammengelagerten *Sm-core*-Partikels, der Cap-Hypermethylierung oder dem Kernimport. Hingegen könnte im humanen System die Beladung des SMN-Komplexes mit UsnRNAs limitierend wirken, also ein Schritt vor der Zu-

sammenlagerung des *Sm-core*-Partikels. Weiterhin könnte eine hohe Freisetzungsgeschwindigkeit des fertigen *Sm-core*-Partikels auch experimentell die Detektion assoziierter UsnRNAs im humanen System verschleiern.

4.7. Isolierter dSMN-Komplex ist aktiv in der Zusammenlagerung von *UsnRNP-cores*
Reflektiert der mittels *TagIt*-Methode isolierte RNP den katalytisch aktiven Komplex? Für jede Beurteilung des Aufreinigungserfolgs stand diese Frage im Mittelpunkt. Darüber hinaus entscheidet sie über die biologische Relevanz des gereinigten Komplexes und die Anwendbarkeit des Epitops im Allgemeinen. Es wurde daher das native Eluat einer Reinigung unmittelbar im EMSA (electrophoretic mobility shift assay) eingesetzt. Als radioaktiv markierte Substrat-RNAs wurde neben der dU1snRNA ein in 3' vor der *Sm-site* trunkiertes *in vitro*-Transkript eingesetzt (U1 Δ Sm). In Abwesenheit der *Sm-site* sollte die Zusammenlagerung des *Sm-cores* nicht mehr möglich sein. Als weitere Spezifitätskontrolle wurde die U85scaRNA gewählt, da sie mit 316 nt in der Größenordnung der snRNAs liegt, jedoch keine *Sm-site* besitzt. In der Tat konnte ich zeigen, dass der isolierte Komplex ähnlich wie sein humanes Gegenstück in einer temperatur- und *Sm-site* abhängigen Weise die Zusammenlagerung des UsnRNP cores katalysieren kann. Dabei ist bemerkenswert, dass es auch in Abwesenheit der *Sm-site* zur Bildung eines RNPs kommt. Dieser enthält jedoch keine Sm-Proteine, wie der fehlende *supershift* mit dem anti-Sm-Antikörper Y12 zeigte. Folglich kann man vermuten, dass es sich um die Bindung UsnRNP-spezifischer Proteine an die UsnRNA handelt. So sind in der *TagIt*-Reinigung die Proteine U1-70K und U1A vorhanden, welche an die U1snRNA binden könnten. Jedoch zeigte sich keine RNP-Bildung mit der dU85scaRNA. Folglich erfordert die Bildung des *Sm-core*-Partikels die Anwesenheit der *Sm-site*, diese ist jedoch nicht erforderlich für die Sm-Protein-freien Komplexes, der wahrscheinlich strukturelle oder Sequenzeigenschaften der U1snRNA erfordert. Dies ist exakt analog zu Befunden aus [20], wo die Entstehung von Sm-Protein-haltigen (R2-, M-Komplex) und Sm-Protein-freien Komplexen (R1-Komplex) im *Xenopus laevis* Eiextrakt beschrieben wurde. Somit wurde nachgewiesen, dass der SMN-Komplex in *Drosophila* exakt wie in Vertebraten die Zusammenlagerung des *Sm-core*-Komplexes katalysiert. ATP ist dabei offenbar nicht erforderlich, anders als im Extrakt beschrieben [20]. Auch dies ist für immunpräzipitierten humanen SMN-Komplex so bekannt. In hier nicht besprochenen Experimenten hat sich darüber hinaus gezeigt, dass die nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat (AMP-PNP) und Adenosin-5'-(3-thiotriphosphat) (ATP- γ -S) die Assembly-Reaktion nicht behindern. Der genaue Schritt, an welchem in der

Zusammenlagerung des UsnRNPs chemische Energie benötigt, ist weiterhin unklar und sollte dringend erforscht werden.

4.8. Rekonstitution des dSMN/dGemin2-Heterodimers

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass neben dSMN und dGemin2 weitere substöchiometrisch vorkommende Faktoren zur Assembly-Aktivität des isolierten dSMN-Komplexes beitragen. Um diese Möglichkeit experimentell zu untersuchen, stellte ich die Frage, ob ein aus rekombinanten Proteinen rekonstituierter Komplex aus dSMN und dGemin2 Sm-Proteine bindet und *UsnRNP-core*-Assembly katalysiert. Das dazu verwendete dicistronische Konstrukt ließ sich problemlos in *E. coli* exprimieren und über NiNTA-Sephrose aufreinigen. Etwas störend bei der Analyse im SDS-PAGE war ein hier wie auch in zahlreichen anderen Experimenten auftretendes Degradations- bzw. prämaures Translationsprodukt von H₆-GST-dGemin2 bei 26 kDa entsprechend H₆-GST. Zudem musste ich unter Einsatz von BSA arbeiten, um jedwede unspezifische Bindung der sehr basischen Sm-Proteine an das Material des Reaktionsgefäßes zu minimieren. Die Bindungsversuche der Sm-Proteine zeigten die unabhängige Bindung aller einzelnen Sm-Protein-Heterooligomere an immobilisiertes dSMN/dGemin2. Auffällig war jedoch die Kooperativität der Bindung von SmD1/D2 mit SmE/F/G: In Gegenwart von E/F/G war die Bindung von D1/D2 deutlich effizienter. Für SmB/D3 war diese geringer ausgeprägt. Bisher ist unbekannt, in welcher Weise die Sm-Proteine an den SMN-Komplex binden. Die Daten sprechen jedoch dafür, dass die Bindungsstellen D1/D2 zumindest teilweise über vorgebundenes E/F/G an den Komplex rekrutiert wird. Dies ist gut vereinbar mit kristallographischen Daten zu den Positionen der einzelnen Sm-Proteine im heptameren Ring (Abbildung 21), wonach D1/D2 unmittelbar an E/F/G bindet [175]. Die Rolle des vor mehr als 20 Jahren beschriebenen RNA-freien, Sm-Proteine enthaltenden 6S-Komplexes als eventuelles Assembly-Intermediat ist dabei nicht verstanden [23]. Hier nicht gezeigte Daten, die in Zusammenarbeit mit Ashwin Chari erhoben wurden, legen darüber hinaus nahe, dass SmB/D3 eine eigene Bindungsstelle am C-Terminus des dSMN-Komplex besitzt. Mit der Bindung aller Sm-Proteine an das dSMN/dGemin2-Dimer liegen alle Voraussetzungen für ihre Übertragung auf die UsnRNA vor.

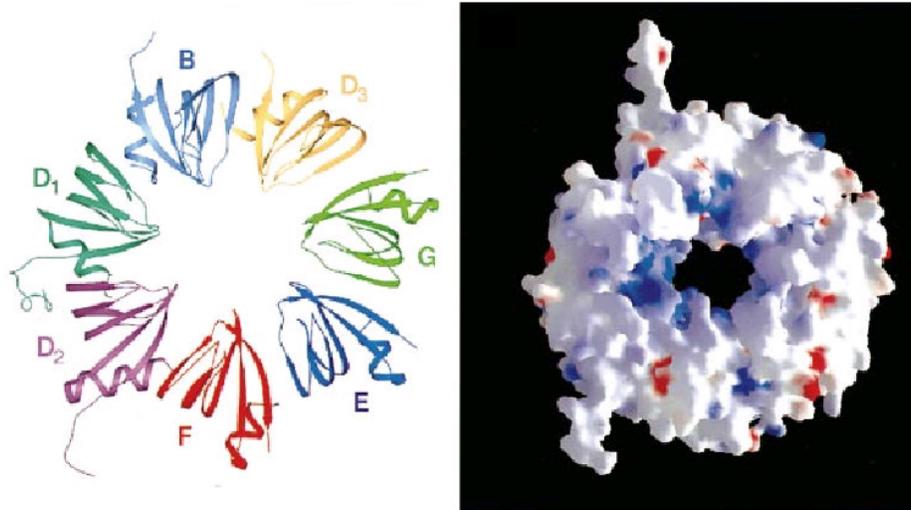


Abbildung 21: Bandmodell (links) und Oberflächenmodell (rechts) des heptameren Sm-Protein-Rings aus [175].

Beachte die unmittelbare Nachbarschaft von SmF und SmD2. Diese ist gut kompatibel mit der beobachteten Kooperativität der Bindung der jeweiligen Heterooligomere am rekonstituierten dSMN-dGemin2-Dimer.

Dies untersuchte ich nach Rekonstitution des dSMN-Komplex mit allen Sm-Proteinen in freier Lösung (also nicht mit an der Matrix immobilisiertem Komplex). Dabei ließen sich die mit dem *TagIt*-dSMN-Komplex erhaltenen Resultate rekapitulieren. Wie in diesen Experimenten wurden *in vitro*-Transkripte der dU1snRNA, der dU1ΔSm sowie der scaRNA dU85 eingesetzt. Es zeigte sich wie beschrieben eine klare Abhängigkeit der Zusammenlagerung von der *Sm-site* und der Temperatur. Ein interessanter Befund ergab sich in der spontanen Assembly-Reaktion unter Einsatz von rekombinanten Sm-Proteinen. Dabei zeigte sich die Bildung unscharf begrenzter RNPs sowohl mit der U1snRNA, als auch mit der U1ΔSm-Deletionsmutante und der dU85scaRNA. Daraus ergibt sich die interessante Hypothese, dass der SMN-Komplex nicht nur die Zusammenlagerung von Sm-Proteinen und RNA erleichtert, sondern vor allem eine fehlerhafte Bindung der „klebrigen“ Sm-Proteine an „falsche“ RNAs verhindert. Dieser Überwindung intrinsischer Affinitäten der UsnRNP-Komponenten untereinander dient demnach auch die räumliche Trennung der UsnRNA-Transkription (Kern) von der Zusammenlagerung der *Sm-core*-Partikel (Zytoplasma).

4.9. SMN und Gemin2 genügen beim Menschen für die *Sm-core*-Bildung

Eine der überraschenden Erkenntnisse dieser Studie war der Befund, dass in *Drosophila* offensichtlich die Proteine dSMN und dGemin2 ausreichen, um die *UsnRNP-core*-

Komplexbildung durchzuführen. Daraus erhob sich die Frage, ob nicht auch im humanen System SMN und Gemin2 dafür hinreichend sind. Um diese Frage biochemisch anzugehen, griff ich auf Vorarbeiten von Otter und Chari zurück. Dazu co-exprimierte Ashwin Chari aus unserem Labor vorhandene Konstrukte von GST-Gemin2 und H₆-SMN in *E. coli* wie in [44] beschrieben. Analog zu den oben gezeigten Experimenten für *Drosophila* wurde das Heterodimer anschließend an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den Sm-Proteinen einzeln und in allen Kombinationen der Heterooligomere beladen. Nach Wegwaschen überschüssiger Sm-Proteine wurden die rekonstituierten Komplexe, anders als für das *Drosophila*-System etabliert, mit PreScission-Protease eluiert. Dabei zeigten sich feine Unterschiede zwischen dem humanen und dem *Drosophila*-System in der Bindung der Sm-Protein-Heterooligomere: SmE/F/G band alleine nicht in detektierbarem Umfang an den Komplex, während dies in Gegenwart von SmD1/D2 der Fall war. Somit ist die Bindung der beiden Heterooligomere zwar in beiden Fällen kooperativ, im *Drosophila*-SMN-Komplex liegt jedoch eine höhere Affinität für das SmE/F/G-Trimer vor. Davon unbeeinflusst blieb jedoch der Transfer der Sm-Proteine auf die UsnRNA. Auch das humane SMN/Gemin2-Dimer ist ausreichend für diese Reaktion.

Eine Kernaussage dieser vergleichenden evolutionsbiologischen und biochemischen Untersuchungen und Experimente lautet daher: Für die Zusammenlagerung von *Sm-cores* der UsnRNPs sind nur SMN und Gemin2 erforderlich.

Somit ergibt sich die wesentliche Frage, welche Rolle die übrigen Gemine (3-8) im humanen System spielen. Einen bedeutenden Beitrag zur Beantwortung dieser Frage kann die Rekonstitution des humanen SMN-Komplexes leisten. Es erscheint in diesem Zusammenhang ratsam, den humanen SMN-Komplex von seinen beiden Kernkomponenten ausgehend um Gemin8 und nachfolgend schrittweise die übrigen Komponenten zu ergänzen. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass Gemin8, für welches bereits in der initialen Beschreibung die Abwesenheit eines Orthologs in *Drosophila* notiert wurde, [176] SMN und Gemin2 überbrückt und als Bindungsplattform für weitere Komponenten dient. In diese Richtung weist auch der Befund, dass Gemin8 die Stabilität des humanen SMN/Gemin2-Dimers erhöht und somit wohl eine strukturell wichtige Rolle spielt.

Denkbare Funktionen für die Gemine 3-8 könnten zum einen in der *Sm-core*-Zusammenlagerung vorgeschalteten Prozessen liegen, so etwa der Remodellierung der UsnRNA, um sie für die Bindung der Sm-Proteine vorzubereiten, wie es der DEAD-box-Helikase Gemin3 zukommen könnte. Hier sollten Studien zu einer etwaigen Helikasefunk-

tion oder zur ATPase-Aktivität rekombinant exprimierten Gemin3-Proteins weiterführen. Weitere Funktionen der Gemine könnten im Kernimport oder der Rekrutierung UsnRNP-spezifischer Proteine bestehen. Experimentell untersuchbar wäre etwa der Einfluss der einzelnen Gemine auf die Translokation durch den Kernporenkomplex oder die Akkumulation in Gems des Zellkerns mit Hilfe von radioaktiv oder auch fluoreszenzmarkierten rekombinanten Proteinen. Da eine Untergruppe UsnRNP-spezifischer Proteine offenbar bereits von dem dSMN/dGemin2-Dimer gebunden wird, lässt sich auf sehr einfache Weise die Bindung in Anwesenheit oder Abwesenheit von RNA sowie der genaue Bindungsort am Komplex bestimmen. Auch hierfür stehen alle erforderlichen molekularen Werkzeuge zur Verfügung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zusammenlagerung spleißosomaler UsnRNPs erfolgt beim Menschen und anderen Vertebraten durch den makromolekularen SMN-Komplex. Dieser besteht aus insgesamt neun Proteinen, genannt SMN und Gemin2-8. In dieser Arbeit wurde die Evolution dieser molekularen Maschine untersucht. Dazu wurden die Genome mehrerer Modellorganismen bioinformatisch nach Orthologen von SMN und seinen Komplexpartnern durchsucht. Es zeigte sich, dass SMN und Gemin2 die Kernkomponenten des Komplexes darstellen. Von diesen ausgehend kamen weitere Komponenten im Laufe der Evolution hinzu und zwar blockweise, wie es ihrer physischen Assoziation im humanen Komplex entspricht. Um diese Befunde einer biochemischen Überprüfung zu unterziehen, wurde ein neues Affinitätspepitop, das *TagIt*-Epitop, entwickelt. Nach stabiler Transfektion von *Drosophila* Schneider2-Zellen konnte das Fusionsprotein effizient exprimiert und der *Drosophila*-SMN-Komplex nativ aufgereinigt werden. Die massenspektrometrische Untersuchung des Komplexes zeigte, dass SMN und Gemin2 seine einzigen stöchiometrischen Komponenten sind. Dies ist in eindrucksvoller Übereinstimmung mit den bioinformatischen Daten. Der aufgereinigte Komplex lagert *in vitro* Sm-Proteine mit der entsprechenden UsnRNA zum *UsnRNP-core*-Komplex zusammen. Diese Ergebnisse ließen sich nach rekombinanter Rekonstitution des SMN/Gemin2-Dimers rekapitulieren. Dabei zeigte sich, dass der SMN-Komplex die unkoordinierte Bindung der Sm-Proteine an „falsche“ RNAs verhindert. Folglich genügen SMN und Gemin2 zur Zusammenlagerung des *Sm-core*-Komplexes, während die übrigen Gemine weitere Funktionen im Kontext der UsnRNP-Biogenese spielen könnten. Aus evolutionsbiologischer Sichtweise ist der SMN-Komplex aus *Drosophila* ein eindruckliches Beispiel, wie die Vereinfachung eines biochemischen Prozesses zur Kompaktierung des Genoms beitragen kann.

6. SUMMARY

In vertebrates, assembly of spliceosomal UsnRNPs is mediated by the SMN-complex, a macromolecular entity composed of the proteins SMN and Gemins 2-8. In this study, the evolution of this machinery has been investigated using complete genome assemblies of multiple model organisms. The SMN-complex has gained complexity in evolution by a block-wise addition of Gemins onto an ancestral core complex composed of SMN and Gemin2. In contrast to this overall evolutionary trend to higher complexity in metazoans, orthologs of most Gemins are missing in dipterans. In order to challenge these findings by biochemical means, I have developed a novel affinity epitope suitable for use in transfected *Drosophila* Schneider2-cells. Using protein mass spectrometry, the composition of the *Drosophila* SMN-complex has been determined. In accordance with the bioinformatic data, it consists of the core components SMN and Gemin2 only. Purified complex mediates assembly of UsnRNP core complexes in a manner very similar to its vertebrate counterpart. These results were recapitulated after recombinant reconstitution of the dSMN/dGemin2-dimer, demonstrating that the *Drosophila* complex also prevents mis-assembly of Sm-proteins onto non-target RNAs. Hence, only a minority of Gemins is required for the assembly reaction *per se*, whereas others may serve additional functions in the context of UsnRNP biogenesis. From a more general point of view, the evolution of the SMN-complex is an interesting example of how the simplification of a biochemical process contributes to genome compaction.

7. ANHANG

Im Folgenden sollen Schritte zur Verbesserung und genaueren Charakterisierung des *TagIt*-Reinigungsverfahrens geschildert werden. Im Einzelnen sollte zum einen ein verbessertes Reinigungsverfahren für den monoklonalen Antikörper 7B10 aus Kulturüberständen von Hybridoma-Zellen etabliert werden, zum anderen das Epitop des Antikörpers genau bestimmt und damit die Anwendbarkeit des *TagIt*-Epitops in Verbindung mit dem Antikörper 7B10 in anderen Organismen untersucht werden.

7.1. Isotypisierung des monoklonalen Antikörpers 7B10

Für jede Art antikörperbasierter Verfahren ist nach der Gewinnung des biologischen Ausgangsmaterials (Serum bzw. Hybridoma-Zelllinie) die Anreicherung des spezifischen Antikörpers entscheidend. Dazu bieten sich im Regelfall epitopbasierte affinitätschromatographische Verfahren an. So wurde bislang der monoklonale Antikörper 7B10 an einer Affinitätsmatrix mit kovalent gekoppeltem Fusionsprotein GST-SMN1-160 aufgereinigt. Dies gelang mit zufriedenstellender Ausbeute, zumal der Antikörper lediglich für die Immunpräzipitation des humanen SMN-Komplexes verwendet wurde, mithin also die benötigten Mengen gering waren. Da der Mengenbedarf an diesem Antikörper mit Entwicklung des *TagIt*-Epitops deutlich zunahm, bestand die Notwendigkeit einer leicht handhab-, skalier- und automatisierbaren Aufreinigungsstrategie. Neben dem Paratop eines gegebenen Antikörpers besitzt auch das F_c-Fragment Eigenschaften, die seine Aufreinigung zulassen. So wurden für einige IgG-Isotypen Verfahren vorgestellt, die ihre Aufreinigung aus Rohmaterial, etwa dem durch Rinderserum „verunreinigten“ Hybridoma-Zellüberstand zulassen [177, 178]. Um solche Verfahren einzusetzen war jedoch die Bestimmung des Isotyps des monoklonalen Antikörpers erforderlich. Dies erfolgte mittels eines Isotypisierungskits der Fa. SIGMA, der auf einem Antikörper-ELISA basiert. Dazu wurde das Antigen, in diesem Falle GST-SMN1-160, an das Polycarbonat der 96-well-Platte adsorbiert und nach Blockierung freier Proteinbindungsstellen der Antikörper an das Antigen gebunden. Nach Waschen der Platte wurden dann isotypspezifische Sekundärantikörper jeweils im Duplikat zugegeben. Deren Bindung an den immobilisierten 7B10-Antikörper wurde anschließend nach Inkubation mit einem peroxidasegekoppelten Tertiärantikörper in einer Farbreaktion mit 5-Aminosalicylsäure visualisiert. Es zeigte sich für 7B10 die Bildung eines braunen Farbstoffs ausschließlich in den Näpchen, in denen anti-Maus-IgG1-Sekundärantikörper eingesetzt wurde. Mit dem Wissen um den Isotyp konnte nun nach [179] das bei [102] beschriebene IgG1-spezifische Reinigungsverfahren angewandt werden. Es basiert auf der

selektiven Bindung von Maus-IgG1 an ProteinA-Sepharose unter der Bedingung einer hohen Kochsalzkonzentration (3,3 M NaCl) und eines alkalischen pH-Werts (pH 8,3) unter Nutzung eines Dinatriumtetraboratpuffers. Andere IgG-Moleküle binden unter diesen Bedingungen nur schlecht an das ProteinA und werden folglich stark abgereichert. Im Labormaßstab gelang die Präparation des Antikörpers mit diesem Verfahren unter Nutzung einer Kreislaufpumpe, in Abwandlung der Beschreibung von Abel bei Raumtemperatur. Die Methode ist hervorragend skalierbar und in einer FPLC-Anlage anwendbar.

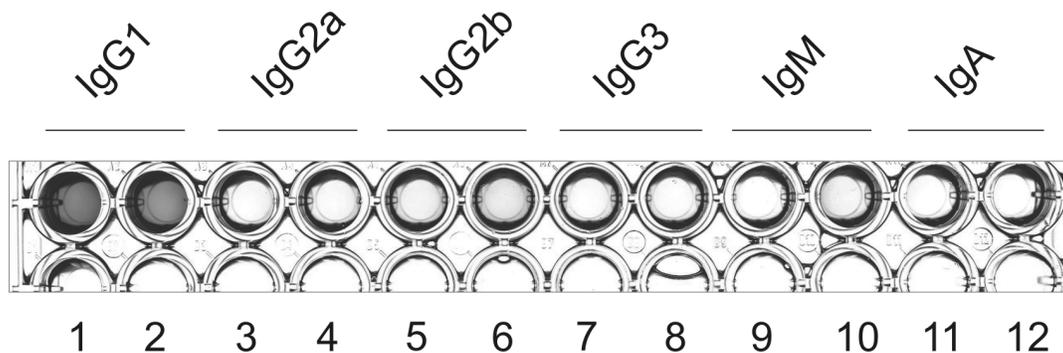


Abbildung 22: Isotypisierung des monoklonalen Antikörpers 7B10

Der monoklonale Antikörper 7B10 wurde mithilfe des „Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents“ der Fa. SIGMA isotypisiert. In einem Antikörper-ELISA wurde die Bindung von 7B10 an die mit Antigen beschichtete Platte mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern und peroxidasegekoppeltem Tertiärantikörper nachgewiesen. Das Experiment zeigt die im Duplikat bestimmte Subklasse IgG1 durch die Farbreaktion in den Nöpfchen 1 und 2 an.

7.2. Feinanalyse des 7B10-Epitops

Die exakte Analyse des Epitops des 7B10-Antikörpers war aus mehreren Gründen von Interesse: Zum einen erlaubt die genaue Kenntnis der erkannten Peptidsequenz Vorhersagen über die Anwendbarkeit des Antikörpers in weiteren Organismen oder Zellen. Zum anderen war nicht zu erwarten, dass die gesamten 30 Aminosäuren hSMN1-30 vom Antikörper 7B10 erkannt werden. Typische Epitope liegen zwischen sechs und zwölf Aminosäuren Länge. Eine solche Eingrenzung des Epitops ließe darüber hinaus eine Verkürzung des Tags zu, womit sich die Differenz des Molekulargewichts zu endogenem Protein minimieren und darüber hinaus möglicherweise eine durch ein zu großes Tag bedingte, fehlerhafte Proteinfaltung vermeiden ließe. Insbesondere jedoch standen einer ökonomischen Anwendung des *TagIt*-Epitops hohe Kosten für das kompetierende Peptid entgegen. 30 Aminosäuren lange Peptide lassen sich nur unter Inkaufnahme relativ hoher Mengenverluste festphasensynthetisch darstellen. Dies liegt an der inhärenten (In-)Effizienz der einzel-

nen Kopplungsschritte, so dass der Anteil an Peptid gewünschter Sequenz an der Gesamtausbeute mit zunehmender Länge abnimmt.

A

1 MAM	11 MAMSSGGSGGGVP	21 GGGVPEQEDSVLFRR	31 VLFRRGTGQSDD
2 MAMS	12 MAMSSGGSGGGVPE	22 GGVPEQEDSVLFRRG	32 LFRRGTGQSDD
3 MAMSS	13 MAMSSGGSGGGVPEQ	23 GVPEQEDSVLFRRGT	33 FRRGTGQSDD
4 MAMSSG	14 AMSSGGSGGGVPEQE	24 VPEQEDSVLFRRGTG	34 RRGTTGQSDD
5 MAMSSGG	15 MSSGGSGGGVPEQED	25 PEQEDSVLFRRGTGQ	35 RGTGQSDD
6 MAMSSGGS	16 SGGSGGGVPEQEDS	26 EQEDSVLFRRGTGQS	36 GTGQSDD
7 MAMSSGGSG	17 SGGSGGGVPEQEDSV	27 QEDSVLFRRGTGQSD	37 TGQSDD
8 MAMSSGGSGG	18 GSGGGVPEQEDSVL	28 EDSVLFRRGTGQSDD	38 GQSDD
9 MAMSSGGSGGG	19 GSGGGVPEQEDSVLF	29 DSVLFRRGTGQSDD	39 QSDD
10 MAMSSGGSGGGV	20 SGGGVPEQEDSVLFR	30 SVLFRRGTGQSDD	40 SDD

B

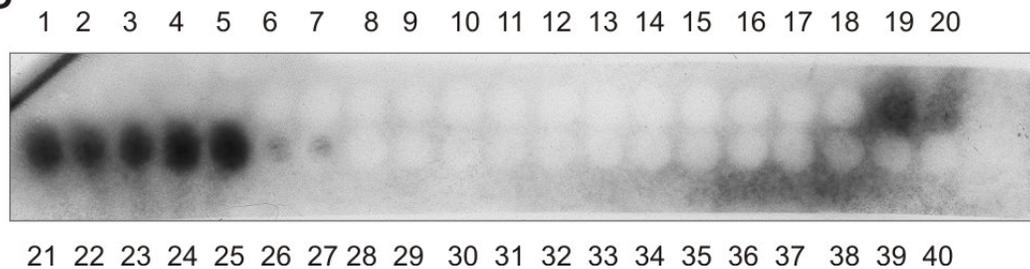


Abbildung 23: Peptidarray nach Reineke für den Antikörper 7B10

A Die Aminosäuren 1-30 des humanen SMN-Proteins wurden ausgehend von einem 3-mer bis zu 15-meren auf einer Zellulosemembran synthetisiert. Die Nummer der auf die Zellulosemembran gekoppelten Peptide ist links der Sequenz angegeben (siehe B). Die vollständige Epitopsequenz ist rot, die minimale orange gekennzeichnet. **B** Chemilumineszenzfilm des Peptidarrays für 7B10. Den Peptiden 19 bis 25 sind die Aminosäuren PEQEDSVLF gemeinsam. Beachte das schwächere Signal des Antikörpers mit den Peptiden 26 und 27: QEDSVLF werden bereits vom Antikörper schwach erkannt, die N-terminalen Reste Prolin und Glutaminsäure sind jedoch für die volle Bindung des Antikörpers erforderlich.

Zur Bestimmung des Epitops wurde ein Peptidarray nach Reineke (siehe [180]) angewandt. Dazu wurde das bekannte Epitop SMN1-30 in Fragmenten auf einer Zellulose-Membran punktweise kovalent synthetisiert (Fa. JPL, Berlin). Als untere Längengrenze wählten wir drei Aminosäuren, als obere 15, so dass in jedem Fall das vollständige Epitop durch den Peptidarray abgedeckt sein würde. Die Peptide wurden wie in Abbildung 23 A beschrieben auf die Membran aufgebracht. Die Prozessierung der Membran erfolgte dann wie bei einem Immunoblot mit einer Chemilumineszenzreaktion zur Detektion. Es zeigte sich eine vollständige Reaktion des Antikörpers mit den Peptiden 20 bis 25, wobei ein relativ schwaches Signal bereits in der von den Peptiden 26 bis 27 eingeschlossenen Aminosäuresequenz beobachtet wurde. Demnach wird bereits eine schwache Bindung des Antikörpers an nur sechs Aminosäuren beobachtet. Die komplette Epitopsequenz lautet demnach PEQEDSVLF (SMN13-21), wobei der C-Terminus besondere Bedeutung besitzen, da ohne

sie keine Reaktion von 7B10 zu beobachten ist. Das C-terminale Drittel des Epitops ist relativ hydrophob, verglichen mit dem deutlich hydrophileren kommerziellen FLAG-(DYKDDDDKC) und dem etwas hydrophileren HA-Epitop (YPYDVPDYA). Um zu überprüfen, ob die neun Aminosäuren ausreichen, um mit dem Antigen um die Paratopbindung zu kompetieren, wurde humanes SMN-Protein mit 7B10 immunpräzipitiert und die SMN1-30 mit SMN13-21 verglichen (Abbildung 24).

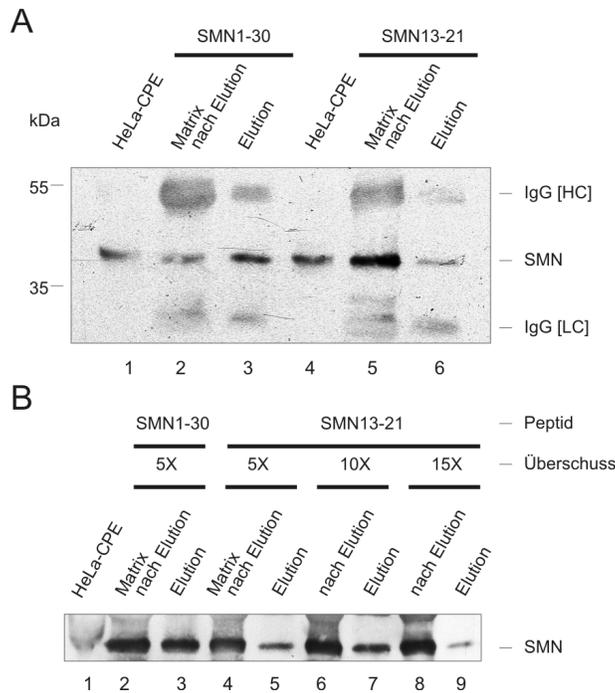


Abbildung 24: Konkurrenz um die Antigenbindung für SMN1-30 und SMN13-21

A Humaner SMN-Komplex wurde aus zytoplasmatischem HeLa-Zellextrakt mit 7B10 immunpräzipitiert. Die Elution erfolgte mit 5-fach molarem Überschuss der Peptide SMN1-30 oder SMN13-21 (AcO-PEQEDSVLF-NH₂). Nach Elution wurde die Matrix in SDS-Probenpuffer aufgenommen und zum Vergleich aufgetragen. Im Immunoblot mit 7B10 erkennt man mit dem verkürzten Peptid eine Elutionseffizienz von etwa einem Drittel der mit SMN1-30 erzielten. **B** Dasselbe Experiment wurde anschließend mit steigenden Konzentrationen des SMN13-21-Peptids durchgeführt. Bei 10-fachem Peptid-Überschuss erkennt man eine deutlich bessere Elution verglichen mit 5-fachem Exzess. Bei 15-fachem Überschuss nimmt die Effizienz wieder ab. Ursache könnten pH-Verschiebungen durch den relativ hohen Anteil an Peptid im Elutionspuffer (PBS) sein.

Ich verwendete dabei ein N-terminal acetyliertes und C-terminal amidiertes Nonapeptid, da bekanntermaßen in vielen Fällen die terminale Peptidbindung neben den Aminosäureseitenketten für die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung bedeutsam ist. Ob dies im Falle von 7B10 so ist, wurde hier nicht gesondert untersucht, jedoch ist der Kostenmehraufwand für Acetylierung und Amidierung vertretbar gering und wird unabhängig von Synthesemaßstab meist pauschal verrechnet. Beim Lösen des Peptidlyophilisats zeigte sich eine merklich ge-

ringere Löslichkeit verglichen mit dem Peptid SMN1-30. Dies dürfte vor allem auf die angesprochenen hydrophoben Sequenzbereiche zurückzuführen sein. Die Konkurrenzeffizienz war verglichen mit SMN1-30 ebenfalls ineffizienter, bei 10-fach molarem Peptidüberschuss wurde jedoch eine vertretbar gute Konkurrenz erreicht (vergleiche Abbildung 24 B, Spur 3 für SMN1-30 mit Spur 7 für SMN13-21). Für die Antikörperbindung an das Epitop ist demnach sehr wahrscheinlich die Sequenz SMN13-21 ausreichend. Das Epitoptag könnte folglich verkürzt werden. Ursache für die vergleichsweise geringere Konkurrenzeffizienz mit dem synthetischen Peptid dürfte dessen Hydrophobizität sein. Eine einfache Abhilfe wäre die Verlängerung um eine oder zwei Aminosäuren (dann könnte ggf. auch die C-terminale Modifikation entfallen), zweckmäßigerweise um ein oder zwei Arginine, die sich in der Sequenz des humanen SMN-Proteins anschließen. Zusätzlich könnten Unterschiede in der Peptidsynthese und damit einhergehende pH-Unterschiede im Elutionspuffer die beobachtete, geringere Elutionseffizienz mit SMN13-21 erklären, da die Peptide aus unterschiedlichen Syntheselaboren stammen.

Nach Beschreibung des genauen Epitops stellte ich erneut die Frage, welche Organismen Proteine besitzen, die das Epitop des 7B10-Antikörpers einschließen. Dazu führte ich eine BLAST-Suche mit geeignet an kurze Peptidsequenzen angepassten Parametern durch (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dabei zeigte sich, dass die Epitopsequenz PEQEDSVLF lediglich in einigen Säugern vorkommt, während in den meisten anderen Organismen auf Grund des Fehlens einer Aminosäure oder einer Substitution nicht mit einer Reaktivität des Antikörpers zu rechnen ist. Zu diesen Beispielen zählen beispielsweise Maus und Ratte. Es bleibt aber im Einzelfall zu testen, inwieweit tatsächlich eine Kreuzreaktion vorkommt.

Accession #	Start	Sequenz	Ende	Organismus
XP_001504747	10	PEQEDSVLF	18	E. caballus
XP_001156488	13	PEQEDSVLF	21	P.troglodytes
XP_001096348	13	PEQEDSVLF	21	M.mulatta
BAE02007	13	PEQEDSVLF	21	M.fascicularis
NP_075012	13	PEQEDSVLF	21	H.sapiens
NP_001009328	10	PEQEDSVLF	18	F.catus
CAH89989	13	PEQEDAVLF	21	P.pygmaeus
XP_001729885	268	PEQEDSVL	275	M. furfur
XP_426654	166	PEQEDSVL	173	G.gallus
AAI48904	23	PEPEDSVLF	31	B.taurus
AAP42462	4	PEPEDSVLF	12	C.familiaris

AAO15639	11	PEPDSVLF	19	B.taurus
NP_001003226	8	PEPDSVLF	16	C.familiaris
XP_971902	439	PEQIDSVLF	447	T.castaneum
EDM10193	11	(S)EQEDTVLF	18	R.norvegicus
EDL00819	11	(S)EQEDTVLF	18	M.musculus
XP_001452783	7	EQEDTVLF	14	P.tetraurelia
NP_001005015	561	PEEEDSVL	568	X.tropicalis
XP_001103626	14	EQEDSVLF	21	M.mulatta
NP_001096733	124	PE-EDSVLF	131	B.taurus
XP_001497551	124	PE-EDSVLF	131	E. caballus
XP_001386447	101	PEQEDSVL	108	P.stipitis
AAI45814	124	PE-EDSVLF	131	M.musculus
XP_001373451	235	PE-EDSVLF	242	M.domestica
XP_001582651	22	PEQEDSVIF	31	T.vaginalis
EAW90973	124	PE-EDSVLF	131	H.sapiens
XP_514012	310	PE-EDSVLF	317	P.troglodytes
NP_001100660	124	PE-EDSVLF	131	R.norvegicus
XP_001103091	87	PE-EDSVLF	94	M.mulatta
CAH90391	124	PE-EDSVLF	131	P.pygmaeus
NP_055672	124	PE-EDSVLF	131	H.sapiens
NP_038890	124	PE-EDSVLF	131	M.musculus
BAC04635	124	PE-EDSVLF	131	H.sapiens
AAF24092	66	PE-EDSVLF	73	M.musculus
XP_861321	124	PE-EDSVLF	131	C.familiaris
XP_662789	227	EQEDEVLF	234	A. nidulans
CAO49572	121	PEQTDSILF	129	V.vinifera
AAK83042	1	EPEDSVLF	8	B.taurus
AAH78116	594	DQDDSVLF	601	X.laevis
NP_001080653	475	PEQEASVL	482	X.laevis

Tabelle 5: BLAST-Suchergebnis für die Epitopsequenz PEQEDSVLF

Mit der Aminosäuresequenz PEQEDSVLF des 7B10-Epitops wurde eine BLAST-Suche gegen die nicht-redundante Proteindatenbank des NCBI mit den folgenden Parametern durchgeführt: Expect: 3000, Word Size: 2, Matrix: PAM30, Gap Costs: Existence 7, Extension 2. Duplikate wurden manuell entfernt, ebenso Proteine aus Prokaryoten. Die Epitopsequenz kommt nur bei einigen höheren Säugern vor (SMN-Protein). Bereits in *X. laevis* ist sie deutlich divergent.

Insgesamt ergibt sich der Eindruck eines gering bis mäßig häufig vorkommenden Peptids. Einschränkung der BLAST-Suche auf *Drosophila melanogaster* zeigte darüber hinaus, dass hier nur sehr divergente Peptidsequenzen auftreten, so dass die grundsätzliche Eignung des Epitops bestätigt wurde.

7.3. Mögliche weitere Anwendungen des *TagIt*-Epitops

Die genaue Eingrenzung des Epitops hat, wie wir gesehen haben, Bedeutung für seine Anwendbarkeit in anderen Organismen oder Zellen. Während das *TagIt*-Epitop bislang ausschließlich in *Drosophila* und hier insbesondere Schneider2-Zellen verwendet wurde, lassen fehlende Kreuzreaktion in Extrakten aus *C. elegans* und die geringe Übereinstimmung des Epitops mit Sequenzen aus Proteinen anderer Organismen eine breite Anwendung vorherzusagen. Eine wesentliche zukünftige Anwendung könnte in der Generierung von transgenen *Drosophila*-Stämmen bestehen, welche Fusionsproteine aus dem (verkürzten) Epitop und einem Protein von Interesse exprimieren. Dabei ergibt sich die interessante Möglichkeit, das Fusionsprotein gewebespezifisch zu exprimieren und seine gewebespezifischen Interaktionspartner zu isolieren, indem man entweder den endogenen Promotor oder das GAL4-UAS-System unter Verwendung einer geeigneten Treiberlinie [69] nutzt. In der Tat wurde bereits eine solche Fliege gewonnen und wird derzeit charakterisiert (B.T. Mentzel, T. Raabe, unpublizierte Daten). Einschränkend sind jedoch folgende Punkte zu beachten: Die Verwendung des Epitop-Tags in ganzen Fliegen ist Neuland. Vieles hängt von der Generierung eines geeigneten Gewebeextrakts ab, wofür ich in dieser Arbeit keine Vorarbeiten leisten konnte. Jedoch sind je nach Forschungsinteresse gewebespezifische Extrakte in vielen Laboren etabliert. Zur Kontrolle des gewebspezifischen Expressionserfolgs wäre der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis nützlich. Ich habe hier nicht untersucht, in welchem Umfang der (in humanen Zellen hervorragend reagierende) Antikörper 7B10 zur Immunfluoreszenzmikroskopie in *Drosophila*-Embryonen oder adulten Fliegen geeignet ist. Für mit SMN1-30-getaggte Proteine steht jedoch bereits ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen zur Verfügung, der je nach Anwendung 7B10 ersetzen kann, z.B. wenn eine Kolokalisationsstudie mit einem anderen murinen Antikörper angestrebt wird.

Der Nutzen von 7B10 in Verbindung mit dem *TagIt*-Epitop wurde jedoch bereits in einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung demonstriert. Katharina Apfel konnte in ihrer von mir betreuten Diplomarbeit [116] den dPRMT5-Komplex sowie als noch größeren RNA-Protein-Komplex H/ACA-Box snoRNPs (small nucleolar ribonucleoprotein particles) mit der *TagIt*-Methode aus Schneider2-Zellen isolieren und charakterisieren.

In einer anderen Anwendung wurde die Methode zur Affinitätsreinigung RNA-bindender Proteine verwendet. Dazu wurde ein Hybrid aus SMN1-30 und einer RNA von Interesse synthetisiert. Zu diesem Zweck wurden ein C-terminal mit einem Cystein modifiziertes

SMN1-30-Peptid und ein in 3' mit einem C6-Aminolinker derivatisiertes RNA-Oligonukleotid mit dem heterobifunktionellen Reagenz Sulfo-SMCC quervernetzt. Das Produkt wurde effizient an einer mit 7B10 gekoppelten Matrix immobilisiert und konnte zur Aufreinigung von putativ an das RNA-Oligonukleotid bindende Faktoren aus HeLa-zytoplasmatischem Zellextrakt eingesetzt werden. Die an die RNA gebundenen Proteine wurden dann durch Konkurrenz mit dem Peptid eluiert und im silbergefärbten SDS-PAGE analysiert.

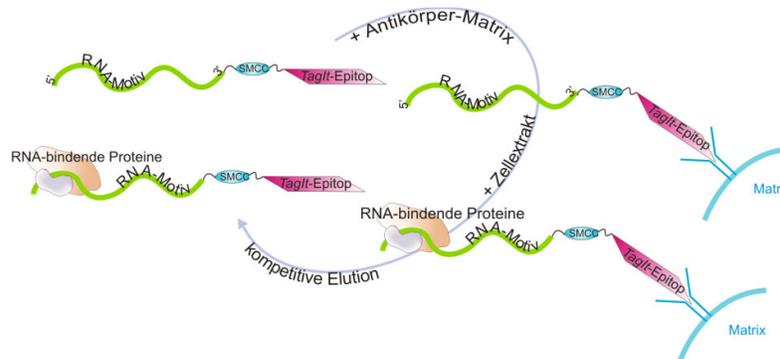


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Affinitätsreinigung von RNA-bindenden Proteinen mittels Peptid-RNA-Hybrid

Das *TagIt*-Epitop wurde mit einem C-terminalen Cysteinrest synthetisiert und mit einem in 3' kovalent mit einem C6-Aminolinker modifizierten RNA-Oligonukleotid kovalent gekoppelt (SMCC). Nach Bindung an eine 7B10-Matrix wurde diese mit Zellextrakt inkubiert und die an das Hybrid gebundenen Proteine durch Konkurrenz mit Peptid eluiert. Aus [116].

Für diese Versuche wurde das 5'-terminale Oligopyrimidin-Motiv ausgewählt. Es kommt in 3' nach dem Cap von mRNAs v.a. ribosomaler Proteine vor. Unter zellulären Stressbedingungen, z.B. bei Mangel an Aminosäuren, werden diese mRNAs translational inaktiviert, um die globale Proteinsynthese rasch und effizient abzuschalten [181]. Die Signalprozesse stromauf der Translationsregulation sind inzwischen gut bekannt und beinhalten u.a. mTOR (mammalian target of rapamycin) und die S6-Kinase [182]. Während zudem die *cis*-Elemente von TOP-mRNAs gut charakterisiert sind [183-185], ist der putative *trans*-agierende Faktor, der an das TOP-Motiv bindet, bis heute unbekannt. Für die Experimente wurde ein ungecapptes synthetisches RNA-Oligonukleotid eingesetzt, welches das bekannte TOP-Motiv umfasst. Als Kontrolle diente ein in einigen Pyrimidinen mutiertes Oligonucleotid sonst gleicher Länge. Im Ergebnis zeigten sich drei Kandidatenproteine, die an das TOP-Motiv-tragende Oligonucleotid banden, jedoch nicht an die Kontrolle. Ihre experimentelle Bestätigung steht jedoch bislang noch aus. Der Befund ist aus mehrerer Hinsicht von großem Interesse: Zum einen handelt es sich um das erste Mal, dass ein Peptid zur

Immobilisierung einer RNA-Affinitätsreinigung eingesetzt wurde. Dies könnte eine nützliche Option für zahlreiche Reinigungen RNA-bindender Proteine sein, da die existierenden Methoden offenbar nur unzureichend effizient sind. Ein Beispiel solcher Reinigungsmethoden ist z.B. das Tobramycin-Aptamer. Fusionen aus RNA mit diesem Aptamer können von der Säule durch das toxische Tobramycin eluiert werden, jedoch schädigt dieses zahlreiche biologische Prozesse und ist relativ ineffizient. Zum anderen ist bislang die Reinigung des TOP-Motiv-bindenden Faktors noch nicht gelungen. Es bleibt abzuwarten, ob der entsprechende Faktor sich unter den drei Kandidatenproteinen befindet.

7.4. Ergänzende Daten und Sequenzvergleiche

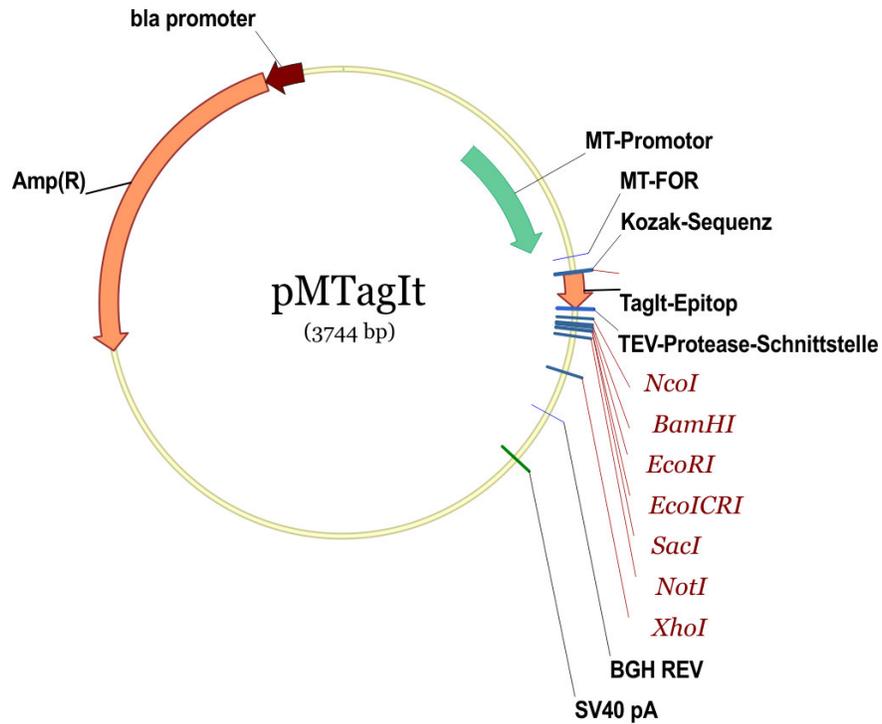


Abbildung 26: Der Expressionsvektors pMTagIt

Das Plasmid pMTagIt besitzt einen Metallothionein- (MT-) Promotor und erlaubt die Expression von Fusionsproteinen mit dem Epitoptag SMN1-30 in Schneider2-Zellen. Er codiert für die β -Lactamase (Amp(R)) und besitzt Bindungsstellen für die Primer MT-FOR (metallothionein) und BHG-REV (*bovine growth hormone* polyA-Signal).

7. Anhang

Spezies	SMN	Gemin2	Gemin5	Gemin3	Gemin4	Gemin8	Gemin7	Gemin6
Homo sapiens	2498924	6094289	22001417	12643886	122939157	34531032	13376001	41393577
Danio rerio	7674338	62955193	125848666	125824010	125837883	120538703	125882644	125830092
Branchiostoma floridae	Brafl1 121736	Brafl1 205562	Brafl1 93160	Brafl1 123431	Brafl1 99221	Brafl1 117877	Brafl1 270123	Brafl1 253351
Ciona intestinalis	ENSCINP00000026142	ENS-CINP00000022944	ENS-CINP00000012233	26554509	37874109	26554705	26554715	26554705
S. purpuratus	115698848	115663092	115772524	72021085	115619072	115666277	72009598	111799074
D. melanogaster	10444398	27819903	45550470	17647335	-	-	-	-
Anopheles gambiae	119115770	158294153	158299195	158294110	-	-	-	-
Apis mellifera	Amel GB13986-PA	66514142	110760819	110758233	-	110756316	110760436	110771578
Nasonia vitripennis	156554158	156553626	156552235	156543626	-	156541308	Scaffold13	156543489
C. elegans	71981679	71993428	-	154147106	-	71984344	154147316	17506317
N. vectensis	156380554	156359607	156372854	156398602	156401356 (?)	156375116	156389177	156355941
S. pombe	1175479	74624906	-	-	-	-	-	-
S. cerevisiae	-	6325314	-	-	-	-	-	-
Lacaria bicolor	scaf-fold_1 351837 352609	Lacbi1 311626	-	-	-	-	-	-
D. discoideum	66819065	66807205	66806047	66817852	-	-	-	-
Arabidopsis thaliana	30678010	4585999	-	-	-	-	-	-
Oryza sativa	115474435	115485137	-	-	-	-	-	-
Ostreococcus tauri	116054748	116059894	116056752	-	-	-	-	116000861

Tabelle 6: Protein-Accession Numbers der Orthologen von SMN und Gemin2-8

Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Jörg Schultz, Lehrstuhl für Bioinformatik, erhoben und sind in Abbildung 6 übersichtlich zusammengestellt.

	1	10	20	30	44		
dGemin2	-----MQHEP	EDQTFQ	LQALE	ICEPDSS	FDPQK		
hGemin2	MRRRAELAGLKTMAWVPAESAV	EELMPRL	LPVE	PCDLTEG	FDP		
	45	50	60	70	88		
dGemin2	PPESGE	EYLMHM	FYERKR	CPAVV	TKRSSKI	RNNTGNT	TEMLDN
hGemin2	PPRT	PQEYL	RRVQIE	AAQCP	DVVVAQ	IDPKK	LKR-KQSVN
	89	100	110	120	132		
dGemin2	PEL	PPFKCLL	PTPEWRDE	QVKS	FQAARS	QVLVLR	RKELANN
hGemin2	GCQ	PAPEGYS	PTLQW	QQQV	AQFSTV	RQNVN	KHRSHWKS
	133	140	150	160	176		
dGemin2	SGEP	PLTSD	QEKWKE	FCR-----	NQQP	-----	
hGemin2	NVTM	PKSE	DEEGWK	KFCLG	EKLCADG	AVGPATN	ESPGIDYVQIG
	177	190	200	210	220		
dGemin2	---	LLS	TLHL	TQND	LELLE	MLSKW	LQDPNT
hGemin2	FPP	LLS	IVSR	MNQAT	VTSV	LEYLS	NWFG
	221	230	240	250	264		
dGemin2	WLYAT	LVCL	HLPLE	PHVFS	TLRY	IART	CIHLR
hGemin2	WLYAL	LACLE	EKPLL	PEAHS	LI	RQLAR	RCSEVR
	265	270	287				
dGemin2	PY	NLLIT	TVQV	FAQ	NDFK	DI-	
hGemin2	AL	NLLIC	IVSRY	FDQ	DLA	DEPS	

Abbildung 27: Sequenzvergleich von hGemin2 (GI:6094289) und dGemin2 (CG10419)

Die Proteinsequenzen von hGemin2 und dGemin2 wurden mit dem Programm AlignX (Invitrogen) verglichen. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, ähnliche grün.

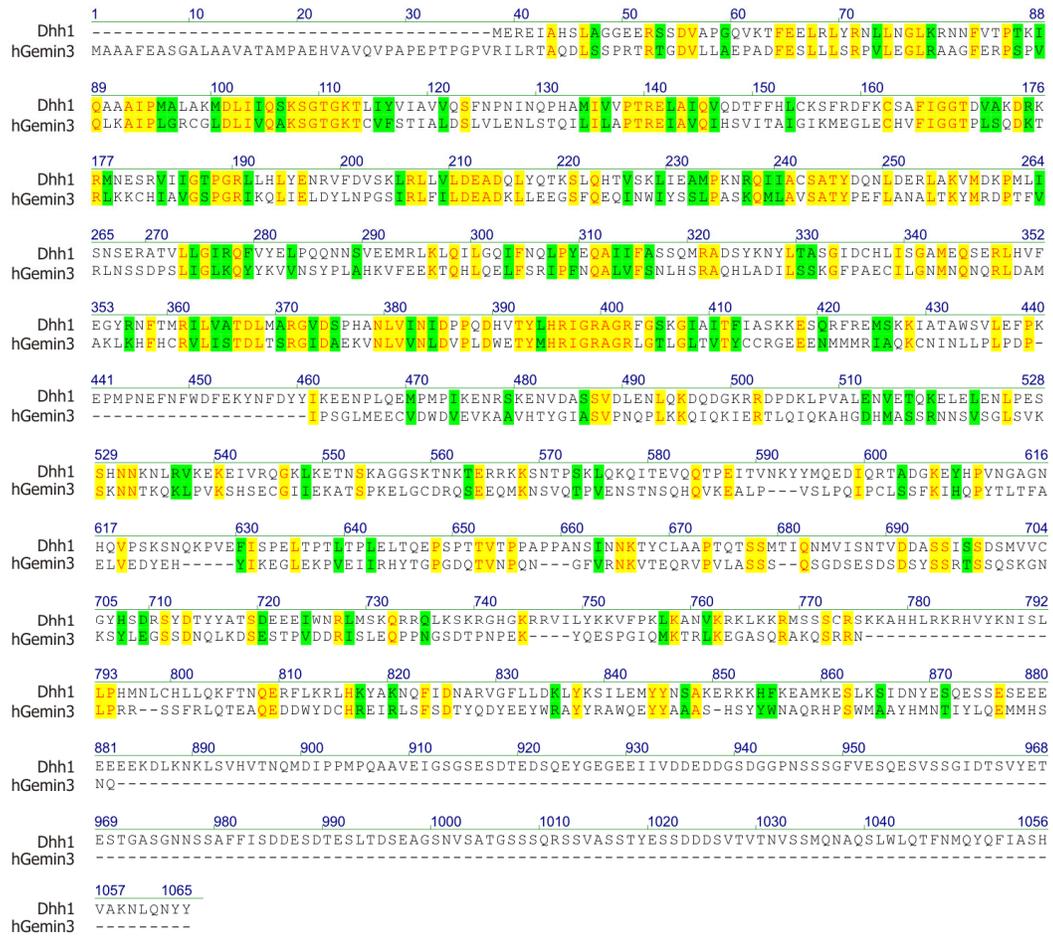


Abbildung 28: Sequenzvergleich von hGemin3 (GI: 12643886) und Dhh1 (CG6539)

Die Proteinsequenzen von hGemin3 und Dhh1 wurden mit dem Programm AlignX (Invitrogen) verglichen. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, ähnliche grün. Beachte die geringe Homologie der beiden Proteine im Bereich des C-Terminus.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. 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.
2. Werdnig, G. (1891) Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* **22**, 437-481.
3. Hoffmann, J. (1891) Weitere Beiträge zur Lehre von der progressiven neurotischen Muskeldystrophie. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* **1**, 95-120.
4. Kugelberg, E. & Welander, L. (1956) Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *AMA. Arch. Neurol. Psychiatry* **75**, 500-509.
5. Speer, C. P. & Gahr, M. (2001) *Pädiatrie* (Springer, Berlin).
6. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Violette, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. *et al.* (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155-165.
7. Lefebvre, S., Burglen, L., Frezal, J., Munnich, A. & Melki, J. (1998) The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1531-1536.
8. Schrank, B., Gotz, R., Gunnensen, J. M., Ure, J. M., Toyka, K. V., Smith, A. G. & 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.
9. Monani, U. R., Sendtner, M., Covert, D. D., Parsons, D. W., Andreassi, C., Le, T. T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Prior, T. W. *et al.* (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.
10. Owen, N., Doe, C. L., Mellor, J. & Davies, K. E. (2000) Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 675-684.
11. Rochette, C. F., Gilbert, N. & 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.
12. Violette, L., Bertrand, S., Bueno Brunialti, A. L., Lefebvre, S., Burlet, P., Clermont, O., Cruaud, C., Guenet, J. L., Munnich, A. & Melki, J. (1997) cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (*Smn*). *Genomics* **40**, 185-188.

13. Vithana, E. N., bu-Safieh, L., Allen, M. J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Maghteh, M., Ebenezer, N. D., Willis, C., Moore, A. T. *et al.* (2001) A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol. Cell* **8**, 375-381.
14. Chakarova, C. F., Hims, M. M., Bolz, H., bu-Safieh, L., Patel, R. J., Papaioannou, M. G., Inglehearn, C. F., Keen, T. J., Willis, C., Moore, A. T. *et al.* (2002) Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 87-92.
15. Will, C. L. & Luhrmann, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 290-301.
16. Raker, V. A., Plessel, G. & Luhrmann, R. (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J* **15**, 2256-2269.
17. Raker, V. A., Hartmuth, K., Kastner, B. & Luhrmann, R. (1999) Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol Cell Biol* **19**, 6554-6565.
18. Fischer, U., Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90**, 1023-1029.
19. Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. & Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **90**, 1013-1021.
20. Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. & Fischer, U. (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell Biol.* **3**, 945-949.
21. Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L. & Luhrmann, R. (2000) The C-terminal RG Dipeptide Repeats of the Spliceosomal Sm Proteins D1 and D3 Contain Symmetrical Dimethylarginines, Which Form a Major B-cell Epitope for Anti-Sm Autoantibodies. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17122-17129.
22. Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. & Luhrmann, R. (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* **7**, 1531-1542.
23. Fisher, D. E., Conner, G. E., Reeves, W. H., Wisniewolski, R. & Blobel, G. (1985) Small nuclear ribonucleoprotein particle assembly in vivo: demonstration of a 6S RNA-free core precursor and posttranslational modification. *Cell* **42**, 751-758.
24. Fury, M., Andersen, J., Ponda, P., Aimes, R. & Zieve, G. W. (1999) Thirteen anti-Sm monoclonal antibodies immunoprecipitate the three cytoplasmic snRNP core protein precursors in six distinct subsets. *J Autoimmun.* **12**, 91-100.

25. Mouaikel, J., Narayanan, U., Verheggen, C., Matera, A. G., Bertrand, E., Tazi, J. & Bordonne, R. (2003) Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron. *EMBO Rep.* **4**, 616-622.
26. Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J. & Bordonne, R. (2002) Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol. Cell* **9**, 891-901.
27. Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. & Luhrmann, R. (1998) Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J* **17**, 4114-4126.
28. Meister, G., Eggert, C. & Fischer, U. (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* **12**, 472-478.
29. Fischer, U., Kroiss, M. & Chari, A. (2007) Wenn Muskeln die Nerven verlieren. *Bio-spektrum* **13**, 610-613.
30. Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* **15**, 3555-3565.
31. Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R. A., Shevchenko, A., Mann, M. & 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.
32. Campbell, L., Hunter, K. M., Mohaghegh, P., Tinsley, J. M., Brasch, M. A. & 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.
33. Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. & Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**, 17-37.
34. Linder, P. (2006) Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4168-4180.
35. Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R. A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M. & Dreyfuss, G. (2000) Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol.* **148**, 1177-1186.
36. Pellizzoni, L., Baccon, J., Rappsilber, J., Mann, M. & 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.
37. Baccon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M. & Dreyfuss, G. (2002) Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol. Chem.* **277**, 31957-31962.
38. Carissimi, C., Saieva, L., Baccon, J., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J. & Pellizzoni, L. (2006) Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron

- complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J Biol. Chem.* **281**, 8126-8134.
39. Gubitz, A. K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. & Dreyfuss, G. (2002) Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol. Chem.* **277**, 5631-5636.
 40. Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. & Neer, E. J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**, 181-185.
 41. Madrona, A. Y. & Wilson, D. K. (2004) The structure of Ski8p, a protein regulating mRNA degradation: Implications for WD protein structure. *Protein Sci* **13**, 1557-1565.
 42. Grimmler, M., Otter, S., Peter, C., Muller, F., Chari, A. & Fischer, U. (2005) Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3099-3111.
 43. Carissimi, C., Baccon, J., Straccia, M., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J. & Pellizzoni, L. (2005) Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.* **579**, 2348-2354.
 44. Otter, S., Grimmler, M., Neuenkirchen, N., Chari, A., Sickmann, A. & Fischer, U. (2007) A comprehensive interaction map of the human SMN-complex. *J Biol. Chem.* **282**, 5825-5833.
 45. Golumbeski, G. S., Bardsley, A., Tax, F. & Boswell, R. E. (1991) tudor, a posterior-group gene of *Drosophila melanogaster*, encodes a novel protein and an mRNA localized during mid-oogenesis. *Genes Dev.* **5**, 2060-2070.
 46. Ponting, C. P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci* **22**, 51-52.
 47. Maurer-Stroh, S., Dickens, N. J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F. & Ponting, C. P. (2003) The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* **28**, 69-74.
 48. Buhler, D., Raker, V., Luhrmann, R. & 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.
 49. Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U. & Sattler, M. (2001) SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 27-31.
 50. Sprangers, R., Selenko, P., Sattler, M., Sinning, I. & Groves, M. R. (2003) Definition of domain boundaries and crystallization of the SMN Tudor domain. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 366-368.
 51. Sprangers, R., Groves, M. R., Sinning, I. & Sattler, M. (2003) High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the

- binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. *J Mol. Biol.* **327**, 507-520.
52. Cote, J. & Richard, S. (2005) Tudor Domains Bind Symmetrical Dimethylated Arginines. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 28476-28483.
53. Gonsalvez, G. B., Rajendra, T. K., Tian, L. & Matera, A. G. (2006) The Sm-protein methyltransferase, *dart5*, is essential for germ-cell specification and maintenance. *Curr. Biol.* **16**, 1077-1089.
54. Chuma, S., Hosokawa, M., Kitamura, K., Kasai, S., Fujioka, M., Hiyoshi, M., Takamune, K., Noce, T. & Nakatsuji, N. (2006) *Tdrd1/Mtr-1*, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **103**, 15894-15899.
55. Hosokawa, M., Shoji, M., Kitamura, K., Tanaka, T., Noce, T., Chuma, S. & Nakatsuji, N. (2007) Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: domain composition, intracellular localization, and function in male germ cells in mice. *Dev. Biol.* **301**, 38-52.
56. Scadden, A. D. & Smith, C. W. (2001) RNAi is antagonized by A->I hyper-editing. *EMBO Rep.* **2**, 1107-1111.
57. Scadden, A. D. (2005) The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 489-496.
58. Scadden, A. D. (2007) Inosine-containing dsRNA binds a stress-granule-like complex and downregulates gene expression in trans. *Mol. Cell* **28**, 491-500.
59. Talbot, K., Ponting, C. P., Theodosiou, A. M., Rodrigues, N. R., Surtees, R., Mountford, R. & Davies, K. E. (1997) Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum. Mol. Genet.* **6**, 497-500.
60. Lorson, C. L., Strasswimmer, J., Yao, J. M., Baleja, J. D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A. H. & Androphy, E. J. (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* **19**, 63-66.
61. Pellizzoni, L., Charroux, B. & 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.
62. McWhorter, M. L., Monani, U. R., Burghes, A. H. & Beattie, C. E. (2003) Knock-down of the survival motor neuron (*Smn*) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol.* **162**, 919-931.
63. Beattie, C. E., Carrel, T. L. & McWhorter, M. L. (2007) Fishing for a mechanism: using zebrafish to understand spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* **22**, 995-1003.

64. Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Laggebauer, B. & Fischer, U. (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* **19**, 2320-2330.
65. Miguel-Aliaga, I., Chan, Y. B., Davies, K. E. & van den, H. M. (2000) Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **486**, 99-102.
66. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 5857-5864.
67. Miguel-Aliaga, I., Culetto, E., Walker, D. S., Baylis, H. A., Sattelle, D. B. & Davies, K. E. (1999) The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2133-2143.
68. Chan, Y. B., Miguel-Aliaga, I., Franks, C., Thomas, N., Trulzsch, B., Sattelle, D. B., Davies, K. E. & van den, H. M. (2003) Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1367-1376.
69. Phelps, C. B. & Brand, A. H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* **14**, 367-379.
70. Rajendra, T. K., Gonsalvez, G. B., Walker, M. P., Shpargel, K. B., Salz, H. K. & Matera, A. G. (2007) A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol* **176**, 831-841.
71. Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E. & Fraser, M. J. (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**, 156-169.
72. Handler, A. M., McCombs, S. D., Fraser, M. J. & Saul, S. H. (1998) The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 7520-7525.
73. Sumpter, V., Kahrs, A., Fischer, U., Kornstadt, U. & Luhrmann, R. (1992) In vitro reconstitution of U1 and U2 snRNPs from isolated proteins and snRNA. *Mol. Biol. Rep.* **16**, 229-240.
74. Branlant, C., Krol, A., Ebel, J. P., Lazar, E., Haendler, B. & Jacob, M. (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *EMBO J* **1**, 1259-1265.
75. Mattaj, I. W. & De Robertis, E. M. (1985) Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell* **40**, 111-118.
76. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

77. Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6. *Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. Distributed by the author.*
78. Yang, Z. (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1586-1591.
79. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.* **215**, 403-410.
80. Mount, S. M. & Steitz, J. A. (1981) Sequence of U1 RNA from *Drosophila melanogaster*: implications for U1 secondary structure and possible involvement in splicing. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6351-6368.
81. Thuring, R. W., Sanders, J. P. & Borst, P. (1975) A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal. Biochem* **66**, 213-220.
82. Tautz, D. & Renz, M. (1983) An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem* **132**, 14-19.
83. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
84. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
85. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol. Biol.* **189**, 113-130.
86. Cavener, D. R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1353-1361.
87. Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
88. Schneider, I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **27**, 353-365.
89. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* **162**, 156-159.
90. Di Nocera, P. P. & Dawid, I. B. (1983) Transient expression of genes introduced into cultured cells of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **80**, 7095-7098.
91. Ivey-Hoyle, M. (1991) Recombinant gene expression in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 704-707.
92. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
93. Eggert, C. Untersuchungen zur Biogenese spleißosomaler UsnRNPs und ihrer Bedeutung für die Pathogenese der SMA. 2005. Würzburg, Univ.

94. Echan, L. A. & Speicher, D. W. (2002) in *Current Protocols in Protein Science* (Wiley & Sons, p. 10.5.1-10.5.18.
95. Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S. & Sickmann, A. (2007) Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* **28**, 2095-2099.
96. Merril, C. R., Dunau, M. L. & Goldman, D. (1981) A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem* **110**, 201-207.
97. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4350-4354.
98. Brinkmann, U., Mattes, R. E. & Buckel, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**, 109-114.
99. Grossman, T. H., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R. & Osburne, M. S. (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**, 95-103.
100. Qiagen GmbH (Hrsg.) (2003) *The QLAexpressionist* (Qiagen, Hilden).
101. Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
102. Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
103. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
104. Kroiss, M., Leyerer, M., Gorboulev, V., Kuhlkamp, T., Kipp, H. & Koepsell, H. (2006) Transporter regulator RS1 (RSC1A1) coats the trans-Golgi network and migrates into the nucleus. *Am. J Physiol Renal Physiol* **291**, F1201-F1212.
105. Kroiss, M. Die subzelluläre Verteilung des Regulatorproteins RS1 in Nierenepithelzellen. 2005. Würzburg, Univ., Diss.
106. de Hoog, C. L. & Mann, M. (2004) Proteomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 267-293.
107. Schuchardt, S. & Sickmann, A. (2007) Protein identification using mass spectrometry: a method overview. *EXS* **97**, 141-170.
108. Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N. & Jackson, R. J. (1999) *unr*, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* **13**, 437-448.

109. Datta, P. K., Chytil, A., Gorska, A. E. & Moses, H. L. (1998) Identification of STRAP, a novel WD domain protein in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* **273**, 34671-34674.
110. Embley, T. M. & Martin, W. (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**, 623-630.
111. Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S. *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot. Microbiol.* **52**, 399-451.
112. Hannus, S., Buhler, D., Romano, M., Seraphin, B. & Fischer, U. (2000) The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 663-674.
113. Stanek, D. & Neugebauer, K. M. (2006) The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* **115**, 343-354.
114. Morgan, T. (1910) Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* **32**, 120-122.
115. Meister, G., Buhler, D., Laggerbauer, B., Zobawa, M., Lottspeich, F. & 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. *Human Molecular Genetics* **9**, 1977-1986.
116. Apfel, K. Entwicklung einer neuartigen Affinitätschromatographie für RNA bindende Proteinkomplexe und Analyse zweier Komplexe aus *Drosophila melanogaster*. 2008. Würzburg, Univ.
117. Salz, H. K., Mancebo, R. S., Nagengast, A. A., Speck, O., Psocka, M. & Mount, S. M. (2004) The *Drosophila* U1-70K protein is required for viability, but its arginine-rich domain is dispensable. *Genetics* **168**, 2059-2065.
118. Nagengast, A. A. & Salz, H. K. (2001) The *Drosophila* U2 snRNP protein U2A' has an essential function that is SNF/U2B" independent. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3841-3847.
119. Fabrizio, P., Laggerbauer, B., Lauber, J., Lane, W. S. & Luhrmann, R. (1997) An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2. *EMBO J* **16**, 4092-4106.
120. Bartels, C., Klatt, C., Luhrmann, R. & Fabrizio, P. (2002) The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome. *EMBO Rep.* **3**, 875-880.
121. Stützing, S. M., Conrad, T. R., Zachlin, A. M. & Salz, H. K. (1999) Functional analysis of SNF, the *Drosophila* U1A/U2B" homolog: identification of dispensable and indispensable motifs for both snRNP assembly and function in vivo. *RNA.* **5**, 1440-1450.

122. Wooley, J. C., Cone, R. D., Tartof, D. & Chung, S. Y. (1982) Small nuclear ribonucleoprotein complexes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 6762-6766.
123. Myslinski, E., Branlant, C., Wieben, E. D. & Pederson, T. (1984) The small nuclear RNAs of *Drosophila*. *J Mol. Biol.* **180**, 927-945.
124. Hamm, J., Kazmaier, M. & Mattaj, I. W. (1987) In vitro assembly of U1 snRNPs. *EMBO J.* **6**, 3479-3485.
125. Jarmolowski, A. & Mattaj, I. W. (1993) The determinants for Sm protein binding to *Xenopus* U1 and U5 snRNAs are complex and non-identical. *EMBO J.* **12**, 223-232.
126. Herrero, E. & Sentandreu, R. (1988) Protein secretion and compartmentalization in yeast. *Microbiologia* **4**, 73-85.
127. Chen, M. S., Obar, R. A., Schroeder, C. C., Austin, T. W., Poodry, C. A., Wadsworth, S. C. & Vallee, R. B. (1991) Multiple forms of dynamin are encoded by *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586.
128. Poodry, C. A. (1990) *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **138**, 464-472.
129. Munn, A. L. (2001) Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1535**, 236-257.
130. Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von, H. A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q. *et al.* (2005) Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* **433**, 156-160.
131. Canestro, C., Yokoi, H. & Postlethwait, J. H. (2007) Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 932-942.
132. Williams, J. G., Noegel, A. A. & Eichinger, L. (2005) Manifestations of multicellularity: Dictyostelium reports in. *Trends Genet.* **21**, 392-398.
133. Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V. *et al.* (2007) Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **317**, 86-94.
134. Copley, R. R., Letunic, I. & Bork, P. (2002) Genome and protein evolution in eukaryotes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 39-45.
135. Noble, S. M. & Guthrie, C. (1996) Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations. *Genetics* **143**, 67-80.
136. Noble, S. M. & Guthrie, C. (1996) Transcriptional pulse-chase analysis reveals a role for a novel snRNP-associated protein in the manufacture of spliceosomal snRNPs. *EMBO J* **15**, 4368-4379.

137. Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D. J. & Koonin, E. V. (2000) Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **97**, 11319-11324.
138. Braun, E. L., Halpern, A. L., Nelson, M. A. & Natvig, D. O. (2000) Large-Scale Comparison of Fungal Sequence Information: Mechanisms of Innovation in *Neurospora crassa* and Gene Loss in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research* **10**, 416-430.
139. Ast, G. (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat. Rev. Genet.* **5**, 773-782.
140. Battle, D. J., Kasim, M., Wang, J. & Dreyfuss, G. (2007) SMN-independent subunits of the SMN complex: Identification of a SNRNP assembly intermediate. *J. Biol. Chem.* **282**, 27953-27959.
141. Beltrao, P. & Serrano, L. (2007) Specificity and evolvability in eukaryotic protein interaction networks. *PLoS. Comput. Biol.* **3**, e25.
142. Krylov, D. M., Wolf, Y. I., Rogozin, I. B. & Koonin, E. V. (2003) Gene loss, protein sequence divergence, gene dispensability, expression level, and interactivity are correlated in eukaryotic evolution. *Genome Res.* **13**, 2229-2235.
143. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
144. Ponting, C. P. (2001) Plagiarized bacterial genes in the human book of life. *Trends Genet.* **17**, 235-237.
145. Andersson, J. O., Doolittle, W. F. & Nesbo, C. L. (2001) GENOMICS: Enhanced: Are There Bugs in Our Genome? *Science* **292**, 1848-1850.
146. Roelofs, J. & Van Haastert, P. J. M. (2001) Genomics: Genes lost during evolution. *Nature* **411**, 1013-1014.
147. Kortschak, R. D., Samuel, G., Saint, R. & Miller, D. J. (2003) EST Analysis of the Cnidarian *Acropora millepora* Reveals Extensive Gene Loss and Rapid Sequence Divergence in the Model Invertebrates. *Current Biology* **13**, 2190-2195.
148. Fontanillas, P., Hartl, D. L. & Reuter, M. (2007) Genome organization and gene expression shape the transposable element distribution in the *Drosophila melanogaster* euchromatin. *PLoS. Genet.* **3**, e210.
149. Cam, H. P., Noma, K., Ebina, H., Levin, H. L. & Grewal, S. I. (2008) Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins. *Nature* **451**, 431-436.
150. Birney, E. (2007) Evolutionary genomics: Come fly with us. *Nature* **450**, 184-185.
151. Sidow, A. & Lacroute, P. (2007) Fruit fly family fun. *Cell* **131**, 1222-1223.

152. Stark, A., Lin, M. F., Kheradpour, P., Pedersen, J. S., Parts, L., Carlson, J. W., Crosby, M. A., Rasmussen, M. D., Roy, S., Deoras, A. N. *et al.* (2007) Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature* **450**, 219-232.
153. *Drosophila* 12 Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* **450**, 203-218.
154. Ilangovan, R., Marshall, W. L., Hua, Y. & Zhou, J. (2003) Inhibition of apoptosis by Z-VAD-fmk in SMN-depleted S2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 30993-30999.
155. Liu, J. L., Murphy, C., Buszczak, M., Clatterbuck, S., Goodman, R. & Gall, J. G. (2006) The *Drosophila melanogaster* Cajal body. *J Cell Biol.* **172**, 875-884.
156. Shiio, Y., Itoh, M. & Inoue, J. (1995) Epitope tagging. *Methods Enzymol.* **254**, 497-502.
157. Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A. B., Hoeijmakers, W. A., Cohen, A., Lasonder, E. & Stunnenberg, H. G. (2006) MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol. Cell Biol.* **26**, 843-851.
158. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* **17**, 1030-1032.
159. Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. & Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
160. Malik, S. & Roeder, R. G. (2003) Isolation and functional characterization of the TRAP/mediator complex. *Methods Enzymol.* **364**, 257-284.
161. Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. & Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-744.
162. Yang, P., Sampson, H. M. & Krause, H. M. (2006) A modified tandem affinity purification strategy identifies cofactors of the *Drosophila* nuclear receptor dHNF4. *Proteomics.* **6**, 927-935.
163. Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E. *et al.* (2003) A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736.
164. Patton, J. R. & Pederson, T. (1988) The Mr 70,000 protein of the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle binds to the 5' stem-loop of U1 RNA and interacts with Sm domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 747-751.
165. Patton, J. R., Habets, W., van Venrooij, W. J. & Pederson, T. (1989) U1 small nuclear ribonucleoprotein particle-specific proteins interact with the first and second stem-

- loops of U1 RNA, with the A protein binding directly to the RNA independently of the 70K and Sm proteins. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3360-3368.
166. Surowy, C. S., van, S., V, Scheib-Wixted, S. M. & Spritz, R. A. (1989) Direct, sequence-specific binding of the human U1-70K ribonucleoprotein antigen protein to loop I of U1 small nuclear RNA. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4179-4186.
167. Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N. A., Kambach, C., van Venrooij, W. J. & Mattaj, I. W. (1990) Binding specificity determinants of U1A and U2B["] proteins. *Mol. Biol. Rep.* **14**, 181-182.
168. Jessen, T. H., Oubridge, C., Teo, C. H., Pritchard, C. & Nagai, K. (1991) Identification of molecular contacts between the U1 A small nuclear ribonucleoprotein and U1 RNA. *EMBO J.* **10**, 3447-3456.
169. Scherly, D., Dathan, N. A., Boelens, W., van Venrooij, W. J. & Mattaj, I. W. (1990) The U2B["] RNP motif as a site of protein-protein interaction. *EMBO J.* **9**, 3675-3681.
170. Price, S. R., Evans, P. R. & Nagai, K. (1998) Crystal structure of the spliceosomal U2B["]-U2A['] protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* **394**, 645-650.
171. Brenner, T. J. & Guthrie, C. (2006) Assembly of Snu114 into U5 snRNP requires Prp8 and a functional GTPase domain. *RNA.* **12**, 862-871.
172. Sheth, U. & Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808.
173. Battle, D. J., Lau, C. K., Wan, L., Deng, H., Lotti, F. & Dreyfuss, G. (2006) The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol. Cell* **23**, 273-279.
174. Gates, J., Lam, G., Ortiz, J. A., Losson, R. & Thummel, C. S. (2004) rigor mortis encodes a novel nuclear receptor interacting protein required for ecdysone signaling during *Drosophila* larval development. *Development* **131**, 25-36.
175. Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J. M., de la, F. E., Raker, V. A., Luhrmann, R., Li, J. & Nagai, K. (1999) Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**, 375-387.
176. Gabanella, F., Butchbach, M. E., Saieva, L., Carissimi, C., Burghes, A. H. & Pellizzoni, L. (2007) Ribonucleoprotein Assembly Defects Correlate with Spinal Muscular Atrophy Severity and Preferentially Affect a Subset of Spliceosomal snRNPs. *PLoS ONE.* **2**, e921.
177. Garcia-Gonzalez, M., Bettinger, S., Ott, S., Olivier, P., Kadouche, J. & Pouletty, P. (1988) Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation. *J. Immunol. Methods* **111**, 17-23.
178. Thompson, P. W., Kenney, A. C., Moulding, P. & Wormald, D. (1990) Intelligent purification of monoclonal antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **589**, 529-539.

179. Abel, K. Charakterisierung der Phosphorylierung / Dephosphorylierung des Mikrofilamentproteins VASP und funktionelle Zuordnung von Proteinbereichen durch monoklonale Antikörper. 1995. Würzburg, Univ.
180. Schneider-Mergener, J., Kramer, A. & Reineke, U. (1996), ed. Cortese, R. (Walter de Gruyter, Berlin), pp. 53-68.
181. Perry, R. P. & Meyuhas, O. (1990) Translational control of ribosomal protein production in mammalian cells. *Enzyme* **44**, 83-92.
182. Hamilton, T. L., Stoneley, M., Spriggs, K. A. & Bushell, M. (2006) TOPs and their regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 12-16.
183. Levy, S., Avni, D., Hariharan, N., Perry, R. P. & Meyuhas, O. (1991) Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3319-3323.
184. Avni, D., Biberman, Y. & Meyuhas, O. (1997) The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* **25**, 995-1001.
185. Biberman, Y. & Meyuhas, O. (1999) TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate. *FEBS Lett.* **456**, 357-360.

9. PUBLIKATIONEN

Patentantrag

Kroiss, M., Fischer U., Grimmer, M.: Immunoaffinity chromatography system based on the Survival of Motor Neurons protein, Europäisches Patentamt, Anmeldungsnummer EP 07108779.5

Zeitschriftenbeiträge

Fischer U., Kroiss M., Chari A.: Wenn Muskeln die Nerven verlieren, *Biospektrum* 6/2007, S. 610-613 (Übersichtsbeitrag)

Kroiss, M., Schultz, J., Wiesner, J., Chari A., Sickmann A., Fischer U.: Evolution of an RNP assembly system: A minimal SMN-complex facilitates formation of UsnRNPs in *Drosophila melanogaster*, *PNAS*, im Druck (Originalarbeit)

Linder, B., Plöttner, O., Kroiss, M., Hartmann, E., Laggerbauer, B., Meister, G., Fischer, U.: TDRD3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP, eingereicht (Originalarbeit)

Konferenzbeiträge

Kroiss, M., Schultz, J., Wiesner, J., Chari A., Sickmann A., Fischer U.: Evolution of an RNP assembly system: A minimal SMN-complex facilitates formation of *UsnRNPs* in *Drosophila melanogaster*, *RNA* 2007, Kongress der *RNA-Society*, Madison, WI, 29.05.-03.06.2007, Poster

Kroiss, M.: A novel epitope tag for (in-)vertebrate proteomics, *3rd International Symposium of the Graduate School of Life Sciences*, Würzburg, 08.10.2007, Vortrag

Kroiss, M., Apfel, K., Wiesner, J., Grimmer M., Sickmann A., Fischer U.: A novel epitope tag for purification of macromolecular complexes from invertebrates, 49th Annual *Drosophila* Research Conference 2008, Konferenz der *American Genetics Society*, San Diego, CA, 2.-6. April 2008, Poster

Kroiss, M., Schultz, J., Wiesner, J., Chari A., Sickmann A., Fischer U.: Evolution of an RNP assembly system: A minimal SMN-complex facilitates formation of *UsnRNPs* in *Drosophila melanogaster*, *Experimental Biology* 2008, Kongress der *Federation of the American Societies of Experimental Biology*, San Diego, CA, 05.-09.04.2008, Vortrag

DANKSAGUNG

Ich danke

- Prof. Dr. Erich Buchner für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Prof. Dr. Utz Fischer für die fachliche Betreuung dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Jörg Schultz für die entscheidenden evolutionsbiologischen Untersuchungen.
- Prof. Dr. Albert Sickmann und Julia Wiesner für die massenspektrometrischen Analysen
- allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie für ihren jeweiligen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.
- Johannes Kroiß, Univ. Regensburg, für interessante evolutionsbiologische Einblicke
- dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Würzburg für die Finanzierung des Promotionsvorhabens.

LEBENS LAUF

Matthias Kroiß

geboren am 24.11.1977

in Würzburg

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Kitzingen-Siedlung und „St. Hedwig“

1988-1997 Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen

Wehrdienst

1997-1998 Grundwehrdienst am Bundeswehrkrankenhaus Ulm

Hochschulstudium

9/1998 – 11/2004 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg mit Aufenthalten am Universitätsklinikum Grenoble
und am Hôpital des Cadolles, Neuchâtel (Universität Lausanne)

12/2006 Promotion zum Dr. med. am Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

10/2004 – 4/2008 Stipendiat im MD/PhD-Programm der Universität Würzburg am
Lehrstuhl für Biochemie, Biozentrum

Berufliche Tätigkeit

seit 4/2008 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums
Würzburg, Schwerpunkt Endokrinologie/Diabetologie

Würzburg, im Mai 2008

ERKLÄRUNGEN

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Reinigung und funktionelle Charakterisierung der SMN-Komplexes von *Drosophila melanogaster*“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, 01. Mai 2008