



**Biochemische Rekonstitution und funktionelle
Charakterisierung der Zusammenlagerungsmaschinerie
spleißosomaler U snRNPs**

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Clemens Englbrecht

aus Geiselhöring

Würzburg 2014



Diese Arbeit wurde angefertigt
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Utz Fischer,
am Lehrstuhl für Biochemie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Eingereicht am _____
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Buchberger

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Utz Fischer
2. Prüfer: Prof. Dr. Alexander Buchberger
3. Prüfer: PD Dr. Sibylle Jablonka

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder 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, März 2014

Clemens Englbrecht

"Es ist verrückt,
die Dinge immer gleich zu machen
und dabei auf andere Ergebnisse zu hoffen."

Albert Einstein (1879 - 1955)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Summary	6
3	Einleitung	8
3.1	Ribonukleoprotein-Partikel (RNPs) - wichtige makromolekulare Maschinen der Zelle	8
3.2	Das Spleißosom	9
3.2.1	Architektur von snRNPs	12
3.2.2	Biogenese der U snRNPs	13
3.3	Zytoplasmatische Phase der snRNP-Biogenese	16
3.3.1	Die „frühe“ Phase der U snRNP-Zusammenlagerung	17
3.3.2	Die „späte“ Phase der U snRNP-Zusammenlagerung	17
3.4	Ziel der Arbeit	20
4	Material	22
4.1	Chemikalien und Enzyme	22
4.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
4.3	Antikörper	24
4.4	Medien und Zusätze für Bakterienkultur	24
4.5	Plasmide und Bakterienstämme	25
4.5.1	Plasmide	25
4.5.2	Transkriptionsvektoren	26
4.5.3	Bakterienstämme	26
4.6	Chromatographische Matrices	26
4.7	Enzyme	27
5	Methoden	28
5.1	Molekularbiologische Methoden	28
5.1.1	Agarosegelelektrophorese	28
5.1.2	Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
5.1.3	Präparation und Transformation kompetenter Zellen	29
5.1.4	Klonierung von DNA-Fragmenten und Sequenzierungen	30
5.1.4.1	Enzymatischer Verdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	30
5.1.4.2	Sequenzierung	30
5.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) und PCR colony screen	31
5.1.5.1	PCR	31
5.1.5.2	PCR Colony screen	31
5.1.6	Herstellung der mutanten SMN-Sequenzen durch ortsspezifische Mutagenese	32
5.1.7	Subklonierung	33
5.2	Biochemische Methoden	34
5.2.1	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
5.2.2	Herstellung eines Gradientengels (12-16%)	35

5.2.3	Coomassiefärbung	35
5.2.4	Silberfärbung nach Merril	36
5.2.5	Proteinaufreinigung	36
5.2.5.1	Aufreinigung des trimeren SMN-Komplexes	36
5.2.5.2	Aufreinigung des Dimers Gemin6/Gemin7	37
5.2.5.3	Aufreinigung und Rekonstitution des pentameren SMN-Komplexes	38
5.2.5.4	Aufreinigung von Gemin3-5 aus Sf21 Insektenzellen	39
5.2.5.5	Rekonstitution des gesamten SMN Komplexes.....	40
5.2.5.6	Aufreinigung der Sm Proteine	40
5.2.5.7	Aufreinigung pICln.....	40
5.2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
5.2.7	Rekonstitution des 6S-Komplexes und von pICln-D3-B	41
5.2.8	Klonierung der humanen U1 snRNA und der pre-snRNA	42
5.2.9	Arbeiten mit RNA	43
5.2.9.1	<i>In vitro</i> -Transkription.....	43
5.2.9.2	Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA.....	45
5.2.9.3	Aufreinigung von RNA mit Trizol	45
5.2.9.4	RNA-Spezifitätstest	45
5.2.9.5	3'-Endmarkierung von RNA.....	46
5.2.9.6	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	46
5.2.10	Transferassay	47
5.2.11	Herstellung von HeLa-Zellextrakt.....	48
5.2.12	RNP-Verdrängungsassay	48
5.2.13	Präparation von TPs aus snRNPs	48
5.3	Immunologische und immunobiochemische Methoden	49
5.3.1	Immunoblot	49
5.3.2	Immunopräzipitation von Proteinen	50
5.3.2.1	Kovalente Kopplung von Antikörpern und Proteinen an Sepharosematrix.....	50
5.3.2.2	Immunopräzipitation (IP).....	51
5.3.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern	51
6	Ergebnisse.....	52
6.1	Aufbau des SMN-Komplexes und Rekonstitutionsstrategie.....	52
6.1.1	Klonierung und Expression eines SMN/Gemin2/Gemin8 Trimers	53
6.1.2	Expression und Aufreinigung für Gemin6/Gemin7.....	54
6.1.3	Rekombinante Herstellung eines pentameren SMN-Komplexes	55
6.1.4	Gemin3-5 ergänzen das SMN-Pentamer zum vollständigen SMN-Komplex	57
6.1.5	Totalrekonstitution des SMN-Komplexes	58
6.2	Biochemische und funktionelle Charakterisierung des SMN-Komplexes.....	59
6.2.1	Sm-Proteintransfer.....	60
6.2.2	snRNP-Zusammenlagerung.....	61

6.2.3	Die Bedeutung von Gemin3-5 für das snRNP-Zusammenlagerung.....	63
6.3	Charakterisierung des SMN-Pentamers.....	66
6.3.1	Sm-Protein-Transfer auf das SMN-Pentamer.....	66
6.3.2	Analyse des SMN-Pentamers in der snRNP-Zusammenlagerung.....	67
6.3.3	Die Subcore-Zusammenlagerung läuft weniger effizient ab	70
6.3.4	Der SMN-Komplex wirkt als Spezifitätsfaktor bei der snRNP-Biogenese und verhindert eine Fehlzusammenlagerung	74
6.3.5	Methylierung des Sm-Proteine hat keinen Einfluss auf die snRNP-Zusammenlagerung	75
6.4	Untersuchung der pathogenen SMN-Mutation E134K in der RNP-Zusammenlagerung	79
6.4.1	Aufbau des mutierten SMN-Komplexes	80
6.4.2	Analyse des Sm-Protein-Transfers des SMN(E134K)Komplexes	82
6.4.3	Die Mutante SMN(E134K) zeigt Defizite in der snRNP-Zusammenlagerung	83
7	Diskussion	87
7.1	Rekonstitution des SMN-Komplexes.....	87
7.2	Charakterisierung des rekombinanten SMN-Komplexes.....	88
7.3	Die Rolle individueller Komponenten des SMN-Komplexes bei der snRNP Biogenese	90
7.4	Was sind die Funktionen der „peripheren“ SMN-Komplexkomponenten?.....	93
7.5	Charakterisierung der SMA-Mutation SMN(E134K) im rekombinanten SMN-Komplex..	95
8	Ausblick.....	98
9	Literaturverzeichnis	100
10	Abkürzungen	112
11	Anhang.....	116
11.1	Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superose 6 10/300 GL.....	116
11.2	Tabellen.....	117
11.3	Nukleotidbasen	120
11.4	Aminosäuren	120
11.5	Publikationen	121
11.6	Lebenslauf.....	122
11.7	Danksagung.....	123

1 Zusammenfassung

Das Spleißen von prä-mRNAs stellt in der Expression eukaryontischer Gene einen essentiellen Reifungsschritt dar. Erst durch das exakte Entfernen von nicht-kodierenden Introns und Verbinden der kodierenden Exons kann die genetische Information am Ribosom in funktionelle Proteine umgesetzt werden. Spleißen wird durch das Spleißosom katalysiert, welches sich aus den small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) U1, U2, U4, U5 und U6 und einer großen Anzahl weiterer Proteinfaktoren zusammensetzt. Die snRNPs bestehen aus einer Uridinreichen snRNA, spezifischen und generellen (Sm-)Proteinen. Die Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F, und G bilden einen heptameren Ring um die sog. Sm-Bindungsstelle der snRNAs. Während die Zusammenlagerung von Sm-Proteinen mit der RNA *in vitro* spontan ablaufen kann, wird dieser Prozess *in vivo* von zwei makromolekularen Proteinkomplexen assistiert, die als PRMT5- bzw. SMN-Komplex bezeichnet werden. Der PRMT5-Komplex (bestehend aus PRMT5, WD45 und pICln) agiert in der frühen Phase der Zusammenlagerung. Seine Hauptfunktion ist die symmetrische Dimethylierung der Sm-Proteine und die Stabilisierung von Sm-Proteinkomplexen durch das Chaperon pICln in zwei Intermediaten. Einhergehend mit dieser Aktivität werden auch Aggregation bzw. unspezifische Wechselwirkungen der Sm-Proteine mit RNAs verhindert. In der späten Phase der Zusammenlagerung löst der SMN-Komplex (bestehend aus SMN, Gemin2-8 und unrip) pICln-Intermediate auf, wobei dieser die Sm-Proteine *en bloc* übernimmt und sie auf die snRNA überträgt. Während dieser Reaktion wird pICln aus den Komplexen verdrängt. Ein Fehlen des SMN-Proteins, einer Schlüsselkomponente des SMN-Komplexes, führt zur autosomal rezessiven Erbkrankheit 'Spinale Muskelatrophie' (SMA) wobei der Schweregrad der Krankheit invers mit der Menge an funktionellem SMN-Protein korreliert. Es wird vermutet, dass eine gestörte snRNP-Biogenese die Ursache der SMA ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte die U snRNP-Zusammenlagerungsmaschinerie aus rekombinanten Bausteinen rekonstituiert werden und so funktionellen und strukturellen Studien zugänglich gemacht werden. Folgende Resultate wurden in dieser Arbeit erhalten:

- 1) Im ersten Teil der Arbeit wurde eine experimentelle Strategie etabliert, welche die Rekonstitution des humanen SMN-Komplexes aus rekombinanten Untereinheiten erlaubte. Entscheidend hierfür war die Definition von Subkomplexen aufgrund einer Protein-Interaktionskarte. Die Subkomplexe konnten separat hergestellt und anschließend zum Gesamtkomplex vereinigt werden.

- 2) Die erfolgreiche Etablierung eines rekonstitutiven Systems erlaubte eine detaillierte biochemische Charakterisierung des SMN-Komplexes. Es konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Komplex alle für die Biogenese von U snRNPs nötigen Schritte bewerkstelligen konnte. Dies schließt sowohl die Übernahme der Sm-Proteine aus den pICln-Intermediaten als auch das Verdrängen des Chaperons pICln und die Übertragung der Sm-Proteine auf die snRNAs ein.
- 3) Durch die Reduzierung des SMN-Gesamtkomplexes um Gemin3-5 auf einen SMN-Pentamer konnte dieser als ein funktioneller Kernbereich identifiziert werden, der die einzelnen Schritte der U snRNP-Biogenese vergleichbar mit dem gesamten Komplex bewerkstelligen konnte. Zudem agierte dieser reduzierte Komplex als notwendiger und ausreichender Spezifitätsfaktor der RNP-Zusammenlagerung.
- 4) Das rekombinante System ermöglichte erstmals SMN-Komplexe mit SMA-pathogenen Mutationen herzustellen und einer eingehenden funktionellen und strukturellen Untersuchung zu unterziehen. Die detaillierte Analyse der SMA-verursachenden Punktmutation SMN(E134K) offenbarte spezifische Defekte im Zusammenlagerungsprozess und damit Einblicke in die Pathophysiologie der Krankheit.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Rekonstitution des rekombinanten SMN-Komplexes wurde die Grundlage für die detaillierte biochemische und strukturbiologische Untersuchung der Zusammenlagerungsmaschinerie spleißosomaler U snRNPs gelegt. Dieses experimentelle System wird auch bei der Aufdeckung der biochemischen Defekte hilfreich sein, die zur neuromuskulären Krankheit SMA führen.

2 Summary

The splicing of pre-mRNAs is an essential step in the expression of eukaryotic genes. The precise excision of non-coding introns and joining of coding exons ensures that the genetic information can be translated into functional proteins at the ribosome. The spliceosome, which catalyzes the splicing reaction, is composed of the small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) U1, U2, U4, U5 and U6 and a large number of additional proteins. These RNPs consist of a uridine-rich snRNA, individual and common (Sm) proteins. The Sm proteins, termed B/B', D1, D2, D3, E, F and G form a heptameric ring around the so-called Sm-site of snRNAs and thus form a structural framework of all snRNPs termed Sm core. Although the assembly of the Sm core occurs spontaneously *in vitro*, this process is assisted by two macromolecular protein complexes *in vivo* referred to as PRMT5 and SMN complexes. The PRMT5 complex (consisting of PRMT5, WD45 and pICln) acts in the early phase of assembly. Its main functions are the symmetric dimethylation of Sm proteins and the stabilization of Sm protein complexes within two intermediates via the chaperone pICln. Along with this activity also aggregation and non-specific interactions of Sm proteins with RNAs are prevented. In the late phase of assembly, the SMN complex (consisting of SMN, Gemins 2-8 and unrip) binds to pICln-Sm intermediates, thereby taking over the Sm proteins *en bloc* and transfers them onto the snRNA. During this reaction pICln is displaced from the complexes. Reduced levels of the SMN protein are associated with the autosomal recessive disease 'spinal muscular atrophy' (SMA) and the severity of the disease correlates inversely with the amount of functional SMN protein. It is therefore believed that the impaired biogenesis of snRNP is directly linked to the etiology of the disease.

The aim of this thesis was to reconstitute the SMN complex from recombinant sources, thereby providing the basis for mechanistic and structural studies of this unique assembly machinery. The following results were obtained in the context of this study:

- 1) An experimental strategy was established, which allowed the reconstitution of the human SMN complex from recombinant subunits. To accomplish this goal, defined subcomplexes were identified based on a previously published protein interaction map. Components of these subcomplexes were co-expressed, purified and could eventually be combined to the complete SMN complex.
- 2) The successful establishment of a reconstitution system allowed the detailed biochemical characterization of the SMN complex. It was shown that the recombinant

complex executed all necessary steps in the biogenesis of U snRNPs. This included proper transfer of Sm proteins from the pICln intermediates, the displacement of the chaperone pICln and the transfer of Sm proteins onto snRNAs.

- 3) The reconstitution of a SMN complex lacking Gemin3-5 allowed the definition of a minimal functional core, which was sufficient to commit all individual steps of the U snRNP biogenesis *in vitro*. This minimal complex was also necessary and sufficient to confer specificity of the assembly reaction.
- 4) The recombinant system established in this thesis further opened the possibility to analyze mutant SMN proteins implicated in SMA. The investigation of the SMA-causing missense mutation SMN(E134K) revealed specific defects in the assembly process, shedding light on the etiology of the disease.

The reconstitutive system established in this thesis provides the basis for a detailed biochemical and structural investigation of the assembly machinery. It will also help to uncover biochemical defects directly linked to the neuromuscular disorder SMA.

3 Einleitung

3.1 Ribonukleoprotein-Partikel (RNPs) - wichtige makromolekulare Maschinen der Zelle

Viele zelluläre Prozesse werden durch makromolekulare Zusammenschlüsse (sog. makromolekulare Komplexe) vermittelt bzw. katalysiert. Diese makromolekularen Komplexe bestehen zur überwiegenden Mehrheit aus Proteinen; jedoch ist auch der Zusammenschluss von Proteinen mit RNAs zu RNPs (Ribonukleoprotein-Partikel) ein weit verbreitetes Prinzip. Das bekannteste Beispiel für ein makromolekulares RNP stellt das für die Translation verantwortliche Ribosom dar. Aber auch diverse Faktoren der mRNA-Prozessierung bzw. Regulation bestehen maßgeblich aus RNPs. Hier ist insbesondere das Spleißosom zu nennen, welches das komplexeste bislang bekannte RNP-Gebilde darstellt (Gesteland, R.F. *et al.*, 1999; Lin, R.-J., 2008).

Ein weit verbreitetes Prinzip beim Aufbau höherer Strukturen ist es, vorgefertigte Untereinheiten aufzubauen, die erst bei der eigentlichen Reaktion zusammengelagert werden und die Funktion gemeinsam ausführen (Staley, J.P. and Woolford, J.L., Jr., 2009). Während die Information für den Zusammenschluss zum funktionellen RNP oft in den Untereinheiten selbst liegt, wird der Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten häufig assistiert von Zusammenlagerungsfaktoren, sog. Chaperone (*engl.*: Anstandsdame). Diese Chaperone helfen den Proteinen sich korrekt zu falten oder mit anderen Proteinen zu interagieren. Zudem vermitteln sie auch die Verbindung der Proteine mit den entsprechenden RNAs (Chari, A. and Fischer, U., 2010). Im Laufe der Evolution ist den diversen Aufgaben entsprechend ein perfekt ineinandergreifendes System von ausführenden und assistierenden Faktoren entstanden, das den Betrieb in der Komplexität der Zelle aufrechterhält.

Im Folgenden werden beispielhaft die Funktion und der Aufbau des Spleißosoms als makromolekulare Maschine dargestellt, die für die Prozessierung von prä-mRNAs verantwortlich ist - eine essentielle Aufgabe im Zuge der Genexpression eukaryontischer Zellen.

3.2 Das Spleißosom

Die Entdeckung, dass das primäre Transkript eines proteincodierenden Gens im Vergleich zur reifen zytoplasmatischen mRNA wesentlich länger ist, revidierte die bis dahin geltende Meinung, die Struktur eines Gens läge als kontinuierliche Abfolge von Nukleinbasen auf der DNA vor, von der die Information für die Synthese eines Proteins übertragen würde (Berget, S.M. *et al.*, 1977; Chow, L.T., 1977). Heute weiß man, dass viele eukaryontische Gene von nicht-kodierenden Sequenzen unterbrochen sind. Diesen Abschnitten hat man den Namen *Introns* gegeben (Gilbert, W., 1978). Von den wenigen intronfreien Ausnahmen beim Menschen, sind Histongene die bekanntesten (Hentschel, C.C. and Birnstiel, M.L., 1981).

Um die genetische Information korrekt in die Aminosäuresequenz übersetzen zu können, muss die Zelle diese Introns aus der Vorläufer-mRNA (prä-mRNA) ausschneiden und die kodierenden Exons zusammenfügen. Ein typisches Intron ist als solches durch bestimmte in Abbildung 3.1a dargestellte Consensussequenzen definiert. Diese sind erstaunlich kurz und beschränken sich im Wesentlichen auf ein invariantes GU-Dinukleotid am 5'-Ende des Introns und ein AG-Dinukleotid am 3'-Ende. Weitere wichtige Elemente für die Intronerkennung und den Spleißprozess selbst sind eine sog. Verzweigungsstelle und eine Abfolge von mehreren Pyrimidinen (Will, C.L. and Luhrmann, R., 2011).

Der Chemismus der Spleißreaktion ist relativ simpel und besteht im Wesentlichen aus zwei Umesterungsreaktionen. Im ersten Schritt wird die prä-mRNA durch einen nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe des Adenosins in der Verzweigungsstelle auf die 5'-Spleißstelle gespalten. Dadurch wird das 5'-Ende des Introns an den Verzweigungspunkt ligiert und eine Lasso (Lariat)-Struktur entsteht. Bei einer zweiten Umesterungsreaktion greift nun die freie 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons die 3'-Spleißstelle an. Dies endet in der Ligation der beiden Exons und dem Entlassen des Intron-Lariats (Moore, M.J. and Sharp, P.A., 1993) (Abbildung 3.1b).

Der gesamte Vorgang wird vom Spleißosom katalysiert, das sich aus verschiedenen U snRNPs (U1, U2, U4, U5 und U6) zusammensetzt (Wahl, M.C. *et al.*, 2009). U snRNPs wiederum bestehen aus einer namensgebenden Uridin-reichen snRNA und einer Vielzahl von Proteinen. Während des Spleißvorgangs wird durch Zu- und Abwanderung einzelner Untereinheiten und massive Umlagerungsprozesse das katalytische RNA-Netzwerk gebildet, welches dann die beiden Teilreaktionen ermöglicht (Abbildung 3.1c).

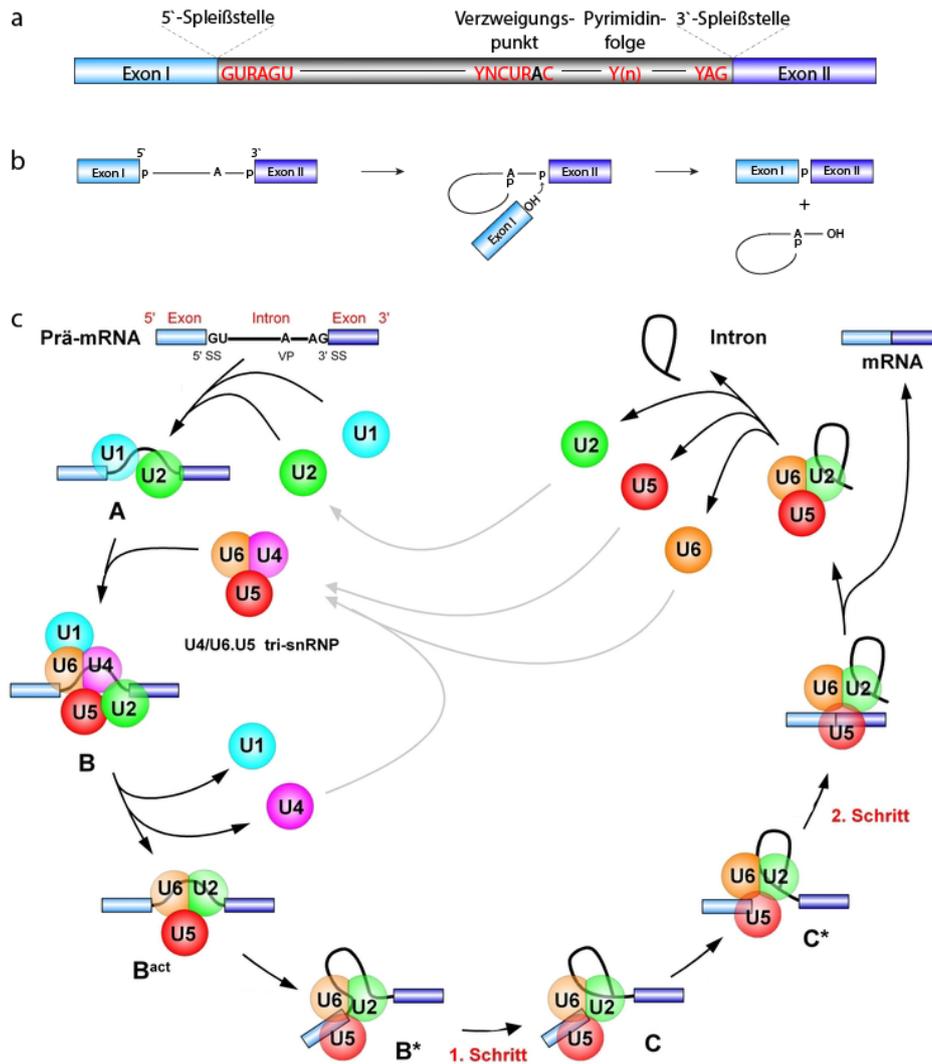


Abbildung 3.1: Prä-mRNA-Spleißen und der Spleißzyklus

a) Darstellung der *cis*-Sequenzelemente einer Modell-prä-mRNA: Exon I und Exon II sind durch eine nichtkodierende Sequenz unterbrochen, die 5' mit GU beginnt und 3' mit AG endet. Dazwischen liegen der Verzweigungspunkt mit einem Adenosin und eine Pyrimidinabfolge. b) Transester-Reaktionen des Spleißens: Das Adenosin des Verzweigungspunktes greift die 5'-Spleißstelle an und bildet ein Lariat aus. Mit der zweiten Reaktion werden die beiden Exons ligiert und das Lariat entlassen und abgebaut. c) Der Spleißzyklus: Die einzelnen U snRNPs bauen auf der prä-mRNA das Spleißosom schrittweise auf. Nach Abwandern von U1 und U4 und massiven Restrukturierungen innerhalb und zwischen den verbleibenden U snRNPs, können die beiden Transester-Reaktionen ablaufen. Die ligierten Exons werden entlassen und die U snRNPs stehen für die nächste Spleißreaktion zur Verfügung (mit Erlaubnis von Cold Spring Harbor Laboratory Press. Verändert nach Will, C.L. and Luhrmann, R., 2011).

Der Spleißprozess beginnt typischerweise mit der Bindung und damit der Definition der 5' Spleißstelle durch das U1 snRNP. Hierbei kommt es einerseits zu einer Basenpaarung zwischen der U1 snRNA und der konservierten Sequenz an der 5'-Spleißstelle, andererseits zu einer Stabilisierung dieser Interaktion durch das U1-spezifische C Protein (Ruby, S.W. and Abelson, J., 1988). Es folgt die Rekrutierung des U2 snRNP an die Verzweigungsstelle. Auch diese

Interaktion erfolgt maßgeblich durch Basenpaarung und wird durch Faktoren begünstigt, die den Pyrimidintrakt erkennen (Madhani, H.D. and Guthrie, C., 1994). U1 und U2 zusammen bilden den spleißosomalen A-Komplex. Das Spleißosom wird durch die Bindung eines vorgeformten U4/U6.U5 tri-snRNPs, bestehend aus den beiden snRNPs U4/6 und U5 komplettiert (B-Komplex). Obwohl nun alle spleißosomalen snRNPs am Intron versammelt sind, ist dieser Komplex katalytisch noch inaktiv. Für die Aktivierung muss dieser Multi-Megadalton-große Komplex strukturelle Veränderungen durchlaufen, bei denen das katalytische Netzwerk ausgebildet wird (Lamond, A.I. *et al.*, 1988; Staley, J.P. and Guthrie, C., 1998). Durch die Dissoziation von U1 und U4 aus dem Komplex B wird die Ausbildung des Geflechts zwischen den verbleibenden snRNAs U2, U5 und U6 ermöglicht (Komplex C). In dieser Konformation bzw. Konfiguration ist das Spleißosom in der Lage, die erste Transesterifikation zu bewerkstelligen. Mit der anschließenden Ligation der beiden Exons und dem Entlassen des Lariats löst sich das Spleißosom von der mRNA und dissoziiert in seine Bestandteile, die somit für eine neue Spleißreaktion zur Verfügung stehen (Brow, D.A., 2002; Will, C.L. and Luhrmann, R., 2011) (Abbildung 3.1c). Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass die snRNA des U6-Partikels für die beiden Transesterifikationen verantwortlich ist; somit stellt das Spleißosom ein Ribozym dar (Fica, S.M. *et al.*, 2013). Als Ribozym (abgeleitet von Ribonukleinsäure und Enzym) wird ein RNA-Moleküle bezeichnet, das ohne Hilfe von Proteinen katalytisch aktiv ist, ähnlich einem Enzym (Cech, T.R., 2002).

Nahezu alle Introns der menschlichen prä-mRNAs werden durch das oben beschriebene „Major“-Spleißosom herausgeschnitten. Erst kürzlich konnte jedoch ein weiteres, das „Minor“-Spleißosom identifiziert werden, das für das Herausschneiden atypischer Introns verantwortlich ist. Diese Introns besitzen die Erkennungssequenz AT und AC an der 5'- bzw. 3'-Spleißstelle (die Introns werden daher ATAC-Introns genannt); auch die Sequenz der Verzweigungsstelle variiert leicht und die Pyrimidinabfolge fehlt (Jackson, I.J., 1991). Die ATAC-Introns machen weniger als 1% aller Intronsequenzen im menschlichen Genom aus (Steitz, J.A. *et al.*, 2008). Das „Minor“-Spleißosom ist dem „Major“-Spleißosom strukturell und funktionell prinzipiell ähnlich, jedoch sind die U1, U2 und U4/6 Partikel durch U11 und U12 snRNP bzw. U4atac bzw. U6atac ersetzt (Montzka, K.A. and Steitz, J.A., 1988).

3.2.1 Architektur von snRNPs

Aufgrund struktureller, biochemischer und genetischer Studien ist sowohl die Komposition als auch die Struktur der spleißosomalen U snRNPs sehr gut etabliert. Generell lässt sich feststellen, dass die unterschiedlichen snRNPs-Spezies sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene Gemeinsamkeiten aufweisen. Alle snRNAs sind durch ausgiebige Sekundärstrukturbereiche (doppelsträngige Bereiche und Haarnadelstrukturen) charakterisiert. Bei den snRNAs U1, U2, U4 und U5 findet man darüber hinaus auch ein konserviertes U-reiches Sequenzmotiv (Consensussequenz PuAU₄₋₆GPu (Pu = Purin)), das stets von Haarnadelstrukturen flankiert ist (Branlant, C. *et al.*, 1982). Dieser Bereich wird 'Sm-Bindungsstelle' genannt und dient als Anker für ein allen snRNPs gemeinsames Set an Proteinen, den Sm-Proteinen (SmB/B', D1, D2, D3, E, F, und G; B' stellt eine Spleißvariante von SmB dar) (Kambach, C. *et al.*, 1999; Luhrmann, R. *et al.*, 1990; van Dam, A. *et al.*, 1989). Die Sm-Proteine bilden einen heptameren Ring um die Sm-Bindungsstelle, wobei jedes Protein mit einer Base interagiert (Raker, V.A. *et al.*, 1996; Pomeranz Krummel, D.A. *et al.*, 2009) (Abbildung 3.2). Die snRNA in Verbindung mit den Sm-Proteinen wird als Sm-Kern-Partikel (Sm Core-RNP) bezeichnet (Kastner, B. *et al.*, 1990).

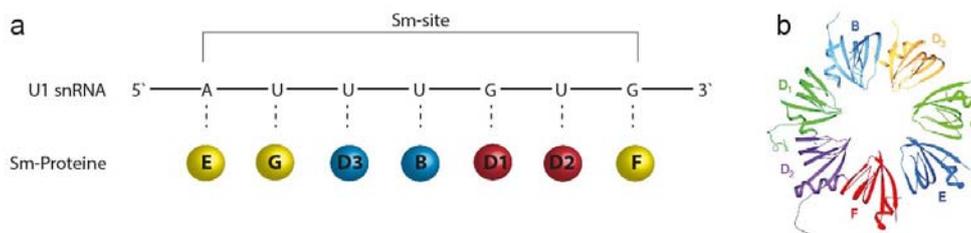


Abbildung 3.2: Die Sm-Bindungsstelle der U1 snRNA

a) Die Sm-Bindungsstelle besteht aus sieben Nucleotiden, von denen jedes einzelne ganz spezifisch von jeweils einem der Sm-Proteine gebunden wird. Beginnend mit SmE am 5'-Ende bildet das Sm Core einen Ring um die snRNA. **b)** Anordnung der Sm-Proteine innerhalb des Sm Core-Rings (mit Erlaubnis von Elsevier. Kambach, C. *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu den snRNPs U1, U2, U4 und U5 besitzt das U6 Partikel keine Sm Core-Proteine. Stattdessen formt sich am 3'-Ende der U6 snRNA ein heptamerer Ring bestehend aus „like-Sm (LSm) Proteinen“ (Zhou, L. *et al.*, 2013). Sowohl Sm- als auch LSm-Proteine stammen von einem Vorläufergen ab, das bereits vor der Auftrennung in Archaea und Eukaryonten existierte und deren Genprodukt ebenfalls RNA band (Achsel, T. *et al.*, 2001).

Neben dem allgemeinen Sm Core, den man in allen snRNPs findet (mit Ausnahme von U6) besitzen die individuellen Partikel darüber hinaus noch eine Ausstattung mit spezifischen Proteinen. Diese sind unter anderem für individuelle Aufgaben der snRNP beim Spleißprozess verantwortlich. Ein prominentes Beispiel dafür ist das Protein prp8 (*engl.*: pre-mRNA-processing-splicing factor 8) (Galej, W.P. *et al.*, 2013), ein Bestandteil des U5 snRNPs. Im aktiven Spleißosom (Komplex C) nimmt prp8 eine zentrale Stellung ein und ist für kritische molekulare Umlagerungsprozesse von Bedeutung, was dadurch deutlich wird, dass verschiedene Mutationen innerhalb dieses Proteins zur Krankheit Retinitis Pigmentosa (RP) führen ([OMIM #268000](#)) (Grainger, R.J. and Beggs, J.D., 2005).

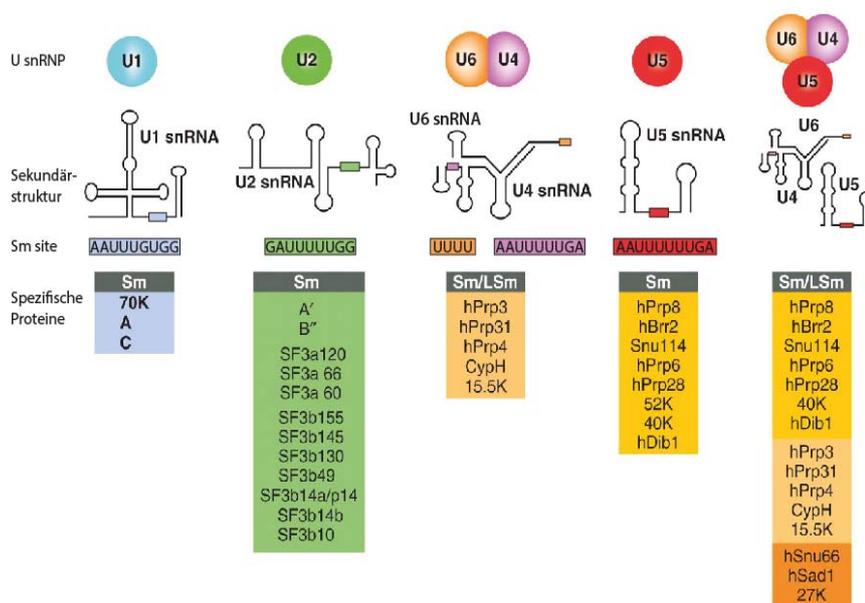


Abbildung 3.3: Die Zusammensetzung der U snRNPs des „Major“-Spleißosoms

Gezeigt sind die einzelnen U snRNPs mit der Sekundärstruktur der snRNAs und ihren Sm-Bindungsstellen. Neben den gemeinsamen Sm/LSm-Proteinen besitzen die snRNPs jeweils spezifische Proteine, die individuelle Aufgaben des jeweiligen Partikels im Spleißprozess wahrnehmen (mit Erlaubnis von Cold Spring Harbor Laboratory Press. Verändert nach Will, C.L. and Luhrmann, R., 2011).

3.2.2 Biogenese der U snRNPs

SnRNPs werden in der Zelle aus den Einzelkomponenten (Proteine und snRNA) in einem komplexen Vorgang zusammengebaut. Dieser Prozess beinhaltet sowohl nukleocytoplasmatische Transportprozesse als auch *trans*-agierende Faktoren, die bei der Biogenese assistieren. Die folgende Beschreibung der Biogenese der snRNPs bezieht sich auf die

Bestandteile des „Major“-Spleißosoms, wobei ein ähnlicher Mechanismus auch für das „Minor“-Spleißosom angenommen wird (Yong, J. *et al.*, 2004).

U1, U2, U4 und U5 werden als prä-snRNAs von der RNA-Polymerase II transkribiert, U6 dagegen wird von der Polymerase III in RNA umgeschrieben (Reddy, R. *et al.*, 1987). Während U6 den Zellkern nicht verlässt und dementsprechend in diesem Kompartiment zum reifen Partikel reift, müssen die anderen snRNAs zur Reifung vorübergehend in das Zytoplasma transportiert werden. Voraussetzung dafür ist eine an das 5'-Ende co-transkriptionell angefügte 7-Methylguanosinkappe (m⁷G-cap) (Hamm, J. and Mattaj, I.W., 1990). Diese Modifikation wird vom heterodimeren Proteinkomplex CBC20/80 (*engl.*: cap binding complex) erkannt und gebunden (Izaurrealde, E. *et al.*, 1995), der selbst wiederum von PHAX (*engl.*: phosphorylated adaptor for RNA export) komplexiert wird. Nach dessen Phosphorylierung wird das Partikel aufgrund der Erkennung eines NES (*engl.*: nuclear export signal) durch CRM1·(Ran-GTP)-Komplexes aus dem Nukleus exportiert (Ohno, M. *et al.*, 2000; Askjaer, P. *et al.*, 1999). Nach Passieren des Kernporenkomplexes wird die prä-snRNA nach Umwandlung von Ran-GTP in Ran-GDP und De-Phosphorylierung von PHAX in das Zytoplasma entlassen (Ohno, M. *et al.*, 2000) (Abbildung 3.4).

In diesem Kompartiment binden dann die Sm-Proteine an die Sm-Bindungsstelle und bilden hierdurch das Sm Core. Die Ausbildung dieser Struktur erlaubt dann die weitere Reifung des snRNPs. Hierzu gehören unter anderem die Umwandlung des m⁷G-Caps zum m₃^{2,2,7}G-cap (m₃G-cap) durch Hypermethylierung (Mattaj, I.W., 1986; Plessel, G. *et al.*, 1994) und die Prozessierung des 3'-Endes durch eine Exo-Ribonuklease. Das gereifte Core-Partikel wird schließlich in den Kern zurücktransportiert (Dahlberg, J.E. *et al.*, 1990), wobei der Transport durch ein bipartites Signal, bestehend aus dem m₃G-Cap und der Sm Core-Struktur vermittelt wird (Fischer, U. and Luhrmann, R., 1990; Hamm, J. *et al.*, 1990; Fischer, U. *et al.*, 1991; Fischer, U. *et al.*, 1993).

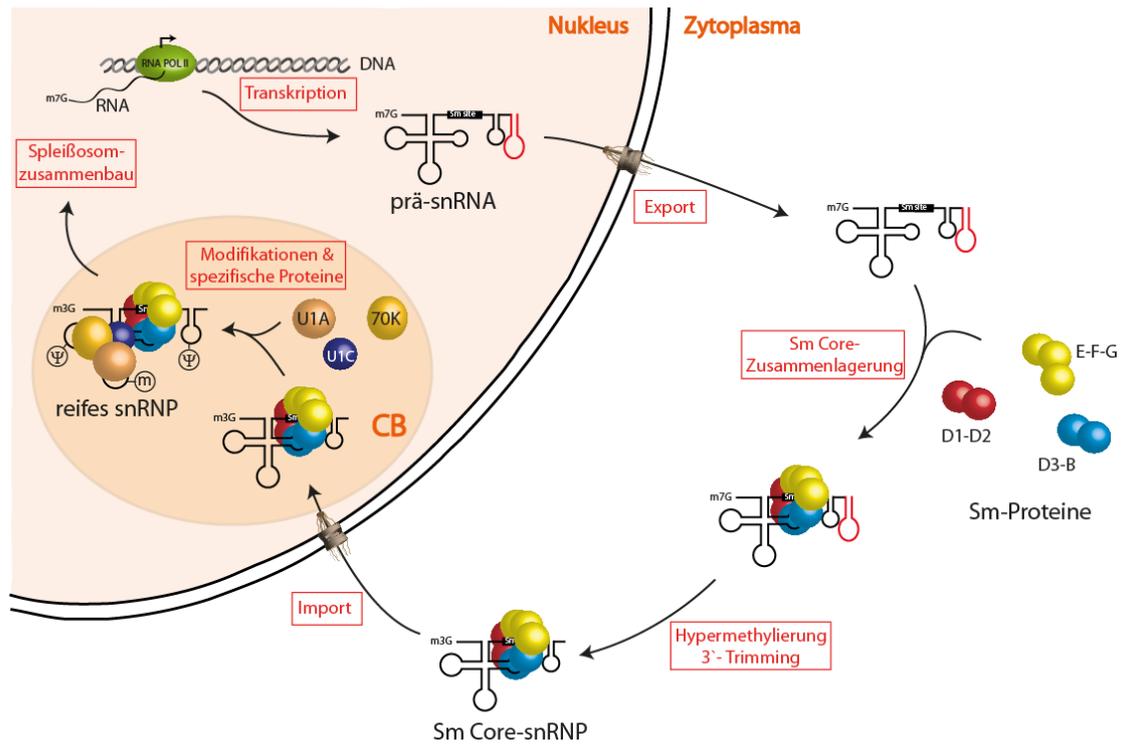


Abbildung 3.4: U1 snRNP-Biogenese

Nach der Transkription der prä-snRNA und deren Export in das Zytoplasma, binden die Sm-Proteine an die Sm-Bindungsstelle. Das 5'-Ende wird hypermethyliert und das 3'-Ende verkürzt. Das Core-Partikel wird in den Zellkern reimportiert und in den Cajal Bodies mit spezifischen Proteinen ausgestattet. Zusätzlich findet eine Modifikation der snRNA statt. Das reife snRNP kann nun am Spleißzyklus teilnehmen. m = Methylierung, Ψ = Pseudouridyl, CB = Cajal Body.

Nach Import in den Kern und der Auflösung des Transport-Cargokomplexes erfolgt eine Sublokalisierung des snRNPs in Cajal Bodies (CB). Hier erfolgt die weitere Reifung der snRNPs. Zum einen werden weitere Modifikationen wie z.B. Pseudouridylierung und 2'-O-methylierung der Ribose in der RNA vollzogen (Sleeman, J.E. and Lamond, A.I., 1999) (siehe Abbildung 3.4). Zum anderen wird in dieser subnukleären Domäne auch die Verbindung des Core-Partikels mit spezifischen Proteinen vollzogen (Jantsch, M.F. and Gall, J.G., 1992) und das U5 snRNP mit dem U4/U6 Partikel zum U4/U6·U5 tri-snRNP vereinigt (Will, C.L. and Luhrmann, R., 2001). Wie sich kürzlich herausstellte, sind Cajal Bodies nicht nur der Ort der finalen Phase der *de novo*-Zusammenlagerung der snRNPs, sondern dienen auch als Anlaufstelle zum Recycling von snRNPs nach dem Spleißprozess (Stanek, D. *et al.*, 2008).

Die vollständig gereiften U snRNPs können schließlich die CBs verlassen und ins Nucleoplasma (Perichromatin-Fibrillen und Interchromatin-Granula) gelangen, um ihre Funktion bei der Reifung von prä-mRNAs zu erfüllen (Mintz, P.J. *et al.*, 1999).

3.3 Zytoplasmatische Phase der snRNP-Biogenese

In vitro-Studien wiesen nach, dass die Sm-Proteine nicht einzeln, sondern als RNA-freie Heterooligomere D1-D2, D3-B und E-F-G vorliegen (Hermann, H. *et al.*, 1995). Dabei bilden in jedem Protein zwei Sm-Motive (Sm1 und Sm2) und angrenzende Sequenzen die Sm-Domänen, mit denen die einzelnen Sm-Proteine untereinander interagieren (Kambach, C. *et al.*, 1999). Keines der Heterooligomere kann *per se* an eine snRNA binden, erst die Kombination aus D1-D2 und E-F-G erlaubt die Bildung eines sog. Sm Subcore-Intermediates. Dieses kann durch die Addition vom SmD3-B Heterooligomer zum reifen Sm Core vervollständigt werden (Raker, V.A. *et al.*, 1996). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Sm Core-Domäne *in vitro* spontan, d.h. ohne weitere assistierende Faktoren bilden kann, zeigt, dass die strukturellen Informationen für die Ausbildung des Core allein in den individuellen Bausteinen (Sm Proteine und snRNA) liegen müssen.

Demgegenüber steht die Beobachtung, dass *in vivo* zwei makromolekulare Maschinen und metabolische Energie vonnöten sind, um die zytoplasmatische snRNP-Biogenese zu ermöglichen (Abbildung 3.5). In einem ersten (frühen) Zusammenlagerungsschritt werden Sm-Proteine durch ein Zusammenlagerungschaperon zu definierten Intermediaten am PRMT5-Komplex (*engl.*: protein arginine N-methyltransferase 5 complex) zusammengefügt. Diese Intermediate werden dann in einem zweiten Schritt vom SMN-Komplex (*engl.*: survival motor neuron complex) von ihrem Chaperon befreit und gezielt auf die snRNA übertragen (Fischer, U. *et al.*, 1997; Meister, G. *et al.*, 2001; Meister, G. and Fischer, U., 2002). Der Name für SMN rührt daher, dass das Fehlen des Gens mit der Krankheit Spinale Muskelatrophie (SMA) assoziiert ist, die sich durch eine Degeneration von α -Motorneuronen in den Vorderhornzellen der grauen Substanz des Rückenmarks äußert (Markowitz, J.A. *et al.*, 2012). Der Schweregrad der autosomal rezessiv vererbten Krankheit korreliert dabei invers mit der Menge an exprimiertem SMN-Protein (Lefebvre, S. *et al.*, 1997; Monani, U.R. *et al.*, 2000).

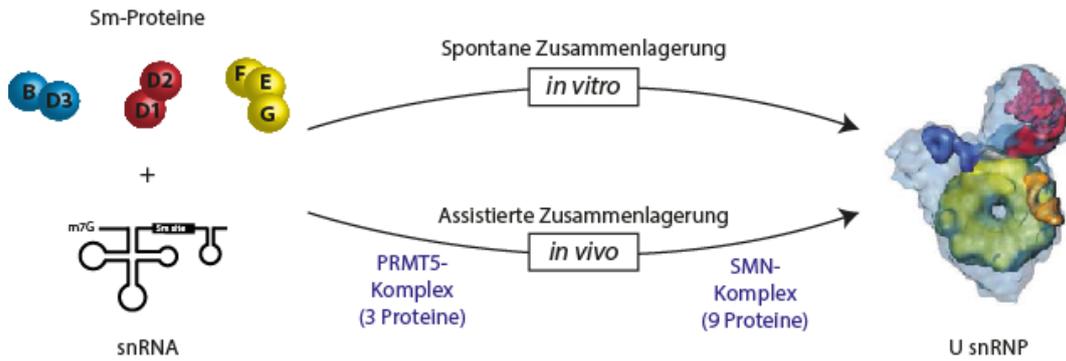


Abbildung 3.5: Assistierte U1 snRNP-Biogenese

Die Zusammenlagerung von snRNPs kann *in vitro* spontan ablaufen, *in vivo* dagegen werden zwei makromolekulare Maschinen benötigt. Der PRMT5-Komplex bereitet in der frühen Phase die Sm-Proteine vor, die der SMN-Komplex in der späten Phase auf die Sm-Bindungsstelle der snRNA überträgt. Die Sm-Proteine sind auf der rechten Seite als Ring erkennbar (mit Erlaubnis von Nature. Verändert nach Stark, H. *et al.*, 2001).

3.3.1 Die „frühe“ Phase der U snRNP-Zusammenlagerung

Ziel der frühen Zusammenlagerungsphase der snRNPs ist es, die Sm-Proteine vor der unspezifischen Aggregation zu schützen und gleichzeitig zu höher-geordneten Oligomeren zusammenzufügen. Diese Aufgabe übernimmt der PRMT5-Komplex, der aus den Proteinen PRMT5, WD45 und pICln besteht (Friesen, W.J. *et al.*, 2002; Meister, G. *et al.*, 2001).

Hierbei spielt die PRMT5-Komplexkomponente pICln die entscheidende Rolle. pICln agiert als Zusammenlagerungschaperon, indem es mit den Proteinen der Subcore-Struktur (D1, D2, E, F und G) einen stabilen Komplex bildet (Pu, W.T. *et al.*, 1999; Chari, A. *et al.*, 2008). In diesem Komplex sind die Sm-Proteine, die ohne pICln nicht miteinander in Wechselwirkung treten würden, bereits so angeordnet, wie sie in der reifen Core-Struktur auftreten. Dieses, als 6S Komplex bezeichnete Zusammenlagerungsintermediat, bindet nur transient an den PRMT5 Komplex. Auch SmD3-B bildet einen Komplex mit pICln; im Gegensatz zum 6S-Komplex liegt dieser aber stabil mit dem PRMT5-Komplex assoziiert vor (Chari, A. *et al.*, 2008) (Abbildung 3.6).

3.3.2 Die „späte“ Phase der U snRNP-Zusammenlagerung

Die am PRMT5-Komplex initiierten Zusammenlagerungsschritte führen zu einer Situation, die bei der Zusammenlagerung von makromolekularen Komplexen nicht unüblich ist: Die über das Chaperon pICln induzierte Stabilisierung der Sm-Proteinkomplexe führt in eine kinetische

Falle, die das weitere Voranschreiten der Zusammenlagerungsreaktion zunächst verhindert. Dies ist dadurch begründet, dass piCln durch seine Bindung an Sm-Proteine sterisch deren Interaktion mit der snRNA und damit die Ausbildung einer thermodynamisch sehr viel stabileren Verbindung blockiert (Grimm, C. *et al.*, 2013). Die kinetische Arretierung der Reaktion durch piCln ist vermutlich einer der Gründe, weshalb in der späten Phase der snRNP Biogenese weitere Faktoren in *trans* notwendig sind. Diese Funktion übernimmt für die snRNPs der makromolekulare SMN-Komplex (Chari, A. *et al.*, 2008).

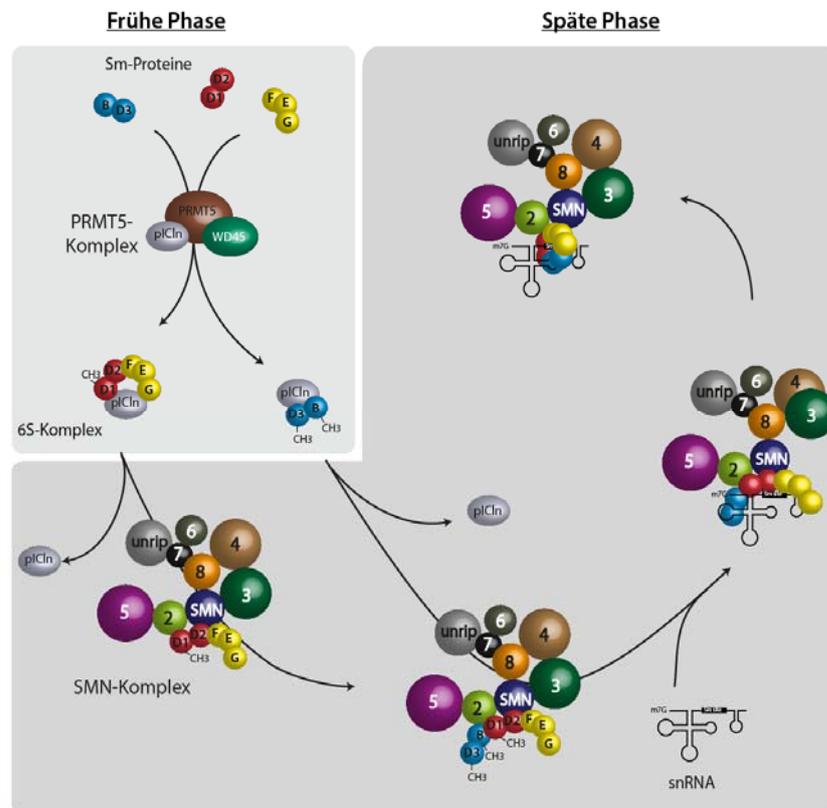


Abbildung 3.6: Zytoplasmatische snRNP-Biogenese

In der frühen Phase der zytoplasmatischen snRNP-Biogenese werden SmD1, D3 und B/B' an ihren RG-reichen Sequenzen durch den PRMT5-Komplex symmetrisch di-methyliert. Dabei bilden sich zwei piCln-Sm-Intermediate aus, der 6S-Komplex und piCln/D3-B. Diese Zwischenformen werden in der späten Phase vom SMN-Komplex aufgelöst, indem piCln verdrängt wird. Der mit Sm-Proteinen beladene Komplex kann diese im Anschluss auf die Sm-Bindungsstelle der snRNA übertragen. CH₃ = Methylgruppe (mit Erlaubnis von John Wiley & Sons Ltd. Verändert nach Fischer, U. *et al.*, 2011).

Der SMN-Komplex ist eine große makromolekulare Maschine, die neben SMN acht zusätzliche integrale Komponenten enthält (Gemin2-8 und unrip) und durch eine Vielzahl von Protein-Protein-Kontakte zusammengehalten wird. Mithilfe von *in vitro*-Interaktionsstudien konnte eine detaillierte Übersichtskarte erstellt werden, in der SMN, Gemin7 und Gemin8 als Rückgrat des Komplexes beschrieben werden, welches eine Plattform für die restlichen Gemine bildet (Abbildung 3.7) (Otter, S. *et al.*, 2007).

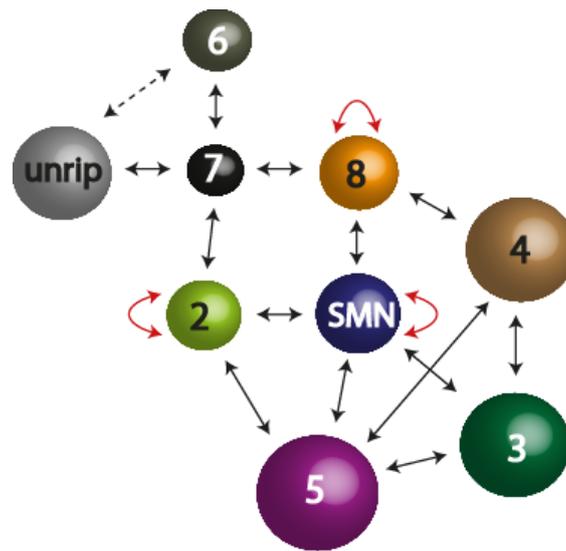


Abbildung 3.7: Interaktionskarte des SMN-Komplexes

Der SMN-Komplex besteht aus neun Proteinen, SMN, Gemin2-8 und unrip. Unrip ist nur im Zytoplasma mit dem Komplex assoziiert. Schwarze Pfeile markieren Protein-Protein-Kontakte. Rote Pfeile zeigen die Selbstinteraktion der betreffenden Proteine an (mit Erlaubnis von American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Verändert nach Otter, S. *et al.*, 2007; Neuenkirchen, N. *et al.*, 2008).

Eine wichtige Funktion des SMN-Komplexes ist es, die von pICln bzw. dem PRMT5-Komplex zusammengefügt Sm-Protein-Oligomere *en bloc* zu übernehmen und dabei pICln zu verdrängen (Chari, A. *et al.*, 2008). Dies führt zur Beladung des SMN-Komplexes mit dem kompletten Satz an Sm-Proteinen, die dann auf die snRNAs übertragen werden können.

Einblicke in den Mechanismus der Funktionsweise des SMN-Komplexes konnten durch die Röntgenstrukturanalyse von Zusammenlagerungsintermediaten gewonnen werden. Diese Studien offenbarten zum einen, dass Gemin2 eine lange Extension enthält, welche die Sm-Proteine des 6S-Komplexes bindet und regelrecht „umarmt“ (Zhang, R. *et al.*, 2011; Grimm, C. *et al.*, 2013). Zum anderen konnte aus den Strukturen ein möglicher Mechanismus für die pICln-Dissoziation aus dem 6S-Komplex abgeleitet werden (Grimm, C. *et al.*, 2013). Obwohl

pICln keinen Sm Fold besitzt, kann es dennoch im 6S-Komplex mit den Sm-Proteinen D1 und SmG interagieren und so den Platz von SmD3-B einnehmen. Dies ist deshalb möglich, weil die dreidimensionale Struktur von pICln der von Sm-Proteinen sehr ähnlich ist (molekulares Mimikry) (Grimm, C. *et al.*, 2013). pICln agiert daher in der RNP-Zusammenlagerung als `topologischer Organisator` für die Ausbildung des Sm-Rings (Grimm, C. *et al.*, 2013). Durch die strukturbiochemische und moleküldynamische Untersuchung eines Intermediates, das neben dem 6S-Komplex zudem verkürzte Versionen von SMN und Gemin2 beinhaltet (8S-Komplex), konnte eine Verschiebung von pICln quer zum pICln-Sm-Ring beobachtet werden, die im 6S-Komplex nicht zu sehen war. Es wird daher vermutet, dass das Verdrängen von pICln aus der 6S-Ringebene die Dissoziation von pICln aus dem Komplex induziert. Diese Konformationsänderungen werden sehr wahrscheinlich durch eine definierte Domäne in SMN, die sog. Tudor-Domäne, ermöglicht. Eine Beteiligung anderer Komponenten des SMN-Komplexes kann derzeit jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Energetisch gesehen stellt der 6S-Komplex eine stabile Übergangsform dar, welche den Reaktionsfortgang zum reifen Sm Core-Partikel aufgrund einer kinetischen Inhibition nicht spontan erreichen kann. Für diesen Prozess ist der SMN-Komplex nötig, der die energetische Hürde durch pICln-Dissoziation verringert. Somit kann der SMN-Komplex als Katalyst bezeichnet werden (Chari, A. *et al.*, 2008).

3.4 Ziel der Arbeit

Mit der Identifikation von SMN als „Krankheits-Gen“ für SMA im Jahr 1995 wurde der Grundstein für das Verständnis der Krankheit gelegt. Im Lauf der Zeit wurden bis heute acht mit SMN assoziierte Proteine identifiziert, die den SMN-Komplex aufbauen. Erste Hinweise bezüglich der Aufgabenteilung innerhalb der Maschinerie geben Aufschluss über die Wirkungsweise des Proteinkomplexes bei der U snRNP-Biogenese. Über dessen mechanistisches Agieren ist dagegen nur sehr wenig bekannt, was nicht zuletzt an der schlechten Manipulierbarkeit des Komplexes liegt.

Aufgabe der vorliegenden Dissertation ist es, ausgehend von in den letzten Jahren etablierten Interaktionskarten (Otter, S. *et al.*, 2007; Ogawa, C. *et al.*, 2009), den humanen SMN-Komplex *in vitro* aus rekombinanten Quellen in größeren Mengen zu rekonstruieren. Hierdurch soll ein manipulierbares System geschaffen werden, mit dem man einzelne Schritte der U snRNP-Biogenese gezielt untersuchen kann.

Die Generierung des SMN-Komplexes durch Co-Expression aller Einzelkomponenten in Bakterien erscheint unrealistisch, da zumindest drei Proteine (Gemin3, 4 und 5) sehr groß und damit sehr wahrscheinlich nicht exprimierbar sind. Stattdessen sollen einzelne Subkomplexe separat in *E. coli* bzw. im Baculovirus-System hergestellt und anschließend zu einer funktionellen Einheit zusammengesetzt werden.

Der rekonstituierte Komplex wird anschließend biochemisch, über Interaktionsstudien und chromatographische Techniken untersucht. Das schließt sowohl Analysen von Protein-Protein- als auch Protein-RNA-Interaktionen mit ein.

Die erfolgreiche Rekonstitution eröffnet in der finalen Phase der Arbeit die Möglichkeit, funktionelle Studien zu initiieren. Dabei kann auf etablierte *in vitro*-Assays zurückgegriffen werden. Der rekonstituierte Komplex wird auf die Sm-Proteinbindung und das korrekte Verdrängen von pICln getestet. Auch der letzte Schritt in der U snRNP-Biogenese, der Transfer der Sm-Proteine auf die snRNA, ist Teil der Untersuchungen. Zudem soll durch Wegnahme einzelner Proteinkomponenten oder -subkomplexe deren Aufgabe innerhalb des SMN-Komplexes näher beleuchtet werden.

Die Fähigkeit des SMN-Komplexes, mit sich selbst zu interagieren, machte es bislang schwer, aus Zellextrakten endogene SMN-Komplexe zu gewinnen, die rein aus SMA-relevanten, mutierten SMN-Proteinen bestanden. Mit der Etablierung des rekombinanten Systems zur Rekonstitution des SMN-Komplexes soll auch die SMA-Mutante SMN(E134K) neben den Funktionsstudien des Wildtyps auf mögliche Defekt im U snRNP-Aufbau hin untersucht werden.

4 Material

4.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Feinchemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen GE Healthcare/Amersham (München), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München/Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen, soweit nicht anders vermerkt. Enzyme wurden verwendet von Promega (Mannheim), Fermentas/Thermo Fisher Scientific (Schwerte) und New England Biolabs (Frankfurt am Main).

Alle Radiochemikalien stammten von GE Healthcare/Amersham oder Hartmann Analytic. Das verwendete Wasser wurde über eine TKA-LAB-HP-Filteranlage destilliert. Es wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätschaften	Hersteller
Apparatur für horizontale Gelelektrophorese	Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg, Deutschland
Apparatur für vertikal Gelelektrophorese	Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg, Deutschland
Äkta prime/prime plus	GE Healthcare, Giles, GB
Äkta purifier	GE Healthcare, Giles, GB
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, Giles, GB
Avanti® J-20-XP Zentrifuge	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
Avanti® J-HC Zentrifuge	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CEA RP NEW Medical X-ray Screen	AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien
Certomat® BS-1 Inkubatorschüttler	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Certomat® Schüttler	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
CL-1000 Crosslinker	UVP, Upland, CA, USA
Dialyseschlauch ZelluTrans	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Dry-block cooling thermostat Sample cooler SC-2M (Kühlblock)	Talron Biotech. L.T.D., Rehovot, Israel
Geldokumentationssystem	Peqlab QUANTUM, Erlangen Deutschland
Geltrockner Model 583	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Gradientenmischer Gradient Mate	Biocomp, Fredericton, NB, Kanada
Gradienten-Mischkammer	Mechanische Werkstatt Biozentrum, Universität Würzburg
Heraeus TK 6060 Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
HiTrap Q 1 ml Ionentauschersäule	GE Healthcare, Giles, GB
HT Labotron Schüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Inkubator BK600	Kendro Laboratory Products, Langensebold, Deutschland
Innova® 44 Inkubatorschüttler	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Innova™ 4300 Inkubatorschüttler	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Optima™ L-80XP Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
OPTIMAX Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	PROTEC® Medical Systems, Oberstenfeld, Deutschland
Photospektrometer NanoVue plus	GE Healthcare, Giles, GB
Poly-Prep columns	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reaktionsgefäße 15; 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße PCR; 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotoren – Ultrazentrifugen (45Ti, 70Ti, SW60Ti)	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
Rotoren – Zentrifugen (JLA 8.1000, JA 25.50)	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA
Semidry Blotapparatur	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
SilverFast32 Scanner	Seiko Epson Corporation, Tokio, Japan
Slide-A-Lyzer® Dialyse caps	Pierce/VWR, Radnor, PA, USA
Sonifier 250	Branson, Danbury, CT, USA
Specord 50, UV Vis spectrophotometer	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Superdex200 10/300GL Gelfiltrationsäule	GE Healthcare, Giles, GB
Superose6 10/300GL Gelfiltrationsäule	GE Healthcare, Giles, GB

Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifugen (5415D, 5804R, 5415R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Überkopffrotor	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Folienschweißgerät Vacupack Plus	Krupps GmbH, Offenbach am Main Deutschland
Vakuumpumpe	Greifenberger Antriebstechnik Deutschland
Vakuumzentrifuge	Savant/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Varioklav® Steam Sterilizer	H + P Labortechnik, Oberschleißheim Deutschland
Variomag Biomodul 40B	H + P Labortechnik, Oberschleißheim Deutschland
Variomag Biosystem	H + P Labortechnik, Oberschleißheim Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Whatman paper	VWR, Radnor, PA, USA

4.3 Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller
α -SMN (7B10)	Maus, monoklonal	Meister et al., 2000
α -pICln	Kaninchen, polyklonal	Diplomarbeit Clemens Englbrecht
α -Sm (Y12)	Maus, monoklonal	Lerner <i>et al.</i> , 2001
α -Maus IgG Peroxidase-konj.	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -Kaninchen IgG Peroxidase-konj.	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -Ratte IgG Peroxidase-konj.	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.4 Medien und Zusätze für Bakterienkultur

Super broth Medium (SB)	3,5% (w/v) Bactotrypton 2% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl
Luria-Bertani-Medium (LB)	1% (w/v) Bactotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl

Für LB-Agarplatten wurden zu dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agarose zugegeben, erhitzt, autoklaviert und in Petrischalen gegossen. Für Selektionsplatten wurde dem Medium nach dem Autoklavieren je nach Bedarf Ampicillin (100 mg/ml), Kanamycin (25 mg/ml) oder Chloramphenicol (30 mg/ml) beigemischt.

Ampicillin	Roth, Mannheim, Deutschland
Bacto-Agar	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Trypton	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Yeast-Trypton	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Chloramphenicol	Roth, Mannheim, Deutschland
Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG)	Roth, Mannheim, Deutschland
Kanamycin	Roth, Mannheim, Deutschland

4.5 Plasmide und Bakterienstämme

4.5.1 Plasmide

pETM30	codiert für ein N-terminales His ₆ -Tag, gefolgt von einem GST-Tag und einer Erkennungssequenz für TEV-Protease, <i>Kan^R</i> , T7-Promoter (EMBL protein expression group)
pET21a	prokaryotischer Expressionsvektor, trägt Sequenz für N-terminales T7-Tag und optionalen C-terminalen His ₆ -Tag, <i>lacI</i> , <i>Amp^R</i> , T7-Promoter (Novagen, Madison, WI, USA)
pET28b`	prokaryotischer Expressionsvektor, codiert für N- oder C-terminales His ₆ -Tag, gefolgt von einer Schnittstelle für Thrombin-Protease und einem T7-Tag, <i>Kan^R</i> , <i>lacI</i> , T7-Promoter; ` = MCS umgedreht im Vergleich zu pET28b (Novagen, Madison, WI, USA)
pRARE	kodiert für 10 eukaryotische tRNAs, <i>Cam^R</i> , pLysS (aus <i>E. coli</i> BL21 Rosetta2 TM gereinigt)
pUC9	Klonierungsvektor, <i>Kan^R</i>
pUC19	Klonierungsvektor, <i>Amp^R</i> (Vieira, J. and Messing, J., 1982)

4.5.2 Transkriptionsvektoren

<i>Xenopus laevis</i> U1 pUC9 T7	(Zeller, R. <i>et al.</i> , 1984)
<i>Xenopus laevis</i> U1ΔSm pUC9 T7	(Hamm, J. <i>et al.</i> , 1987)
Human pUC19-U1-T7	diese Arbeit
Human pUC19-U1ΔSm-T7	diese Arbeit
Human pUC19-pre-U1-T7	diese Arbeit
Human pUC19 pre-U1ΔSm-T7	diese Arbeit

4.5.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3) {pLysS}	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>rne131</i> , (DE3) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21 Rosetta2 TM (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pRARE2 (Cam ^R) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-arg-F</i>), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K-</i> , <i>m_K+</i>), <i>gal</i> ⁻ , <i>phoA</i> , <i>ksupE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Horii <i>et al.</i> , 1980)
<i>E. coli</i> XL1 Blue	F' ::Tn10 <i>proA+B+</i> <i>lacI_q</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (<i>Nal_r</i>) <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K- m_K+</i>) <i>glnV44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> (Stratagene, La Jolla, CA, USA) (Bullock, W.O. <i>et al.</i> , 1987)

4.6 Chromatographische Matrices

DEAE-Sepharose	GE Healthcare, Giles, GB
Glutathion-Sepharose	GE Healthcare, Giles, GB
Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, Giles, GB

4.7 Enzyme

2× PCR MasterMix	Roche, Basel, Schweiz
<i>Pfu</i> DNA polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNasin - RNase-Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
SP6 RNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 RNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T7 RNA-Polymerase	Bakterielle Expression Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg
Tabakäzvirus-Protease (TEV)	Bakterielle Expression Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Standardmethoden wurden nach Sambrook und Russel (Sambrook, J. and Russel, J., 2006) durchgeführt. Die dabei verwendeten Lösungen und Gefäße wurden, wenn nicht anders angegeben, autoklaviert (20', 120°C, 1 bar).

5.1.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von Deoxy- (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) wurde ein 1 - 2%iges Agarosegel auf der Basis von 1x TBE hergestellt. An eine horizontale Gelelektrophorese-apparatur wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Das Ergebnis wurde anschließend mit Hilfe der Quantum Geldokumentationsanlage von Preqlab analysiert und digital archiviert.

DNA-Probenpuffer, 6x	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 30% (v/v) 86%iges Glyzerin 0,1% (w/v) XC 0,1% (w/v) BPB
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
MassRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Agarosegel (1 - 2%)	100 ml TBE 1 g, 2 g Agarose 10 µl EtBr
TBE-Puffer, 10x	890 mM Tris 890 mM H ₃ BO ₄ 20 mM Na ₂ EDTA pH 8,3 mit HCl
Agarosegelpuffer	1x TBE

5.1.2 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Sollte ein DNA-Fragment nach einer Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert (5.1.1) oder ein DNA-Fragment direkt nach Amplifikation durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR 5.1.5.1) aufgereinigt werden, so wurde ein NucleoSpin®Extrakt II Kit von Macherey-Nagel verwendet und den Anleitungen des Herstellers Folge geleistet.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen im analytischen Maßstab wurden 5 ml einer LB-Selektionskultur angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt. Die weiterführenden

Schritte folgten der Anleitung von NucleoSpin® Plasmid der Firma Macherey-Nagel (Mini-Präparation).

Das NucleoBond® AX 500 Kit diente zur Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation). Dafür wurde eine 500 ml SB-Selektionskultur ÜN bei 37°C geschüttelt und der Gebrauchsanweisung gefolgt.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch das Messen der Extinktion bei 260 nm mit einem Biophotometer von Eppendorf bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/µl.

5.1.3 Präparation und Transformation kompetenter Zellen

Eine Möglichkeit, Bakterienzellen für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen, ist die Rubidium-Chlorid-Methode (RbCl) nach Hanahan (Hanahan, D., 1983). Dafür wurden 500 ml LB-Medium mit 1 ml einer 10 ml Übernacht-Kultur (ÜN-Kultur) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,48 bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde für 15` auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (4°C, 4000 g, 5`). Das Pellet wurde in 0,4 Volumen eiskühlem Transformationspuffer Tfb I resuspendiert, 15` auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert (4°C, 4000 g, 5`). Der Zelleniederschlag wurde in 0,04 Volumen eiskaltem Tfb II aufgenommen, 15` auf Eis gestellt, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und entweder sofort benutzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Um das gewünschte Plasmid in die Bakterienzellen einzuschleusen, wurden 100 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 –100 ng der Plasmid-DNA 25` auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeschockbehandlung für 45`` und weitere 2` auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt. Abschließend wurden 100 µl der Lösung auf einer LB-Agaroseplatte mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde zentrifugiert (11000 rpm, 1`), der Überstand abgenommen, das Pellet in 100 µl SB-Medium resuspendiert und die Suspension ebenfalls auf einer LB-Agaroseselektionsplatte verteilt. Die Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

Tfb I-Lösung

30 mM KOH
100 mM Rubidiumchlorid
10 mM Calciumchlorid
50 mM Manganchlorid
15% (v/v) Glyzerin
pH 5,8 mit 0,1 M Essigsäure

Tfb II-Lösung	10 mM MOPS 75 mM Calciumchlorid 10 mM Rubidiumchlorid 15% Glyzerin pH auf 6,5 mit 0,1 M NaOH
---------------	--

5.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten und Sequenzierungen

5.1.4.1 Enzymatischer Verdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Für den enzymatischen Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden zu den Ansätzen 2-5 U des Enzyms pro μg DNA zugegeben. Die Dauer der Reaktion betrug 2 h bei vom Enzym abhängigen Bedingungen. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von 6x DNA-Probenpuffer für anschließende Auftrennung in einem Agarosegel beendet (5.1.1) oder durch direkte Dephosphorylierung. Bei gleichzeitiger Verwendung von zwei verschiedenen Enzymen (DNA-Doppelverdau) wurde ein für beide Enzyme geeignetes Puffersystem gewählt. Um die Religation des Plasmids für spätere Ligationsansätze zu verhindern, wurden die Vektoren am 5`-Ende durch 3 U CIAP pro μg eingesetzte DNA dephosphoryliert und dann mit NucleoSpin®Extrakt II aufgereinigt.

DNA-Fragmente können in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen DNA-Überhängen ligiert werden. Dabei bildet z.B. die T4-DNA-Ligase die Phosphodiesterbindung zwischen der 5`-Phosphat und der 3`-Hydroxylgruppe. Für solche Reaktionen wurden 50 – 100 ng Plasmid-DNA mit einem dreifach molaren Überschuss des Inserts mit 2 μl T4-DNA-Ligase und 2 μl des T4-DNA-Ligasepuffers versetzt und mit ddH₂O auf 20 μl aufgefüllt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 1 h wurde der gesamte Ansatz in kompetente Zellen transformiert (5.1.3), und am nächsten Tag ein PCR colony screen durchgeführt (5.1.5.2).

5.1.4.2 Sequenzierung

Um die Richtigkeit der klonierten Vektoren zu verifizieren wurden diese zur Medigenomix GmbH nach Martinsried oder zur GATC GmbH nach Konstanz geschickt und nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Sequenzierung (Sanger, F. *et al.*, 1977), kombiniert mit der Thermal Cycling-Methode, sequenziert.

5.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) und PCR colony screen

5.1.5.1 PCR

Zur Vervielfältigung von dsDNA-Fragmenten wurde die von Mullis entwickelte PCR-Technik angewandt (Mullis, K. *et al.*, 1986). Dabei wurden zum Template zwei synthetische Oligonukleotidprimer gegeben, deren Sequenzen jeweils zum 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA komplementär sind, außerdem Magnesiumionen und neben einer hitzestabilen Polymerase ein geeigneter Puffer.

Zur Berechnung der Annealingtemperatur T_a für die Primer diente die vereinfachte Formel:

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = (2^\circ\text{C} \times [A + T] + 4^\circ\text{C} \times [G + C]) - 5^\circ\text{C}$$

(T_m = Schmelztemperatur der Primer)

Tabelle 5.1: Allgemeines PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5'	
94°C	30''	1
x°C	1'	25x
x°C	1	1
72°C	7'	
4°C	∞	

Die Elongationszeit wurde abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der DNA-Polymerase gewählt.

5.1.5.2 PCR Colony screen

Um festzustellen, ob eine Ligation erfolgreich war, wurde ein PCR colony screen durchgeführt (Gussow, D. and Clackson, T., 1989). Von der Selektionsplatte wurde eine einzelne Kolonie gepickt und zuerst in einen 20 µl PCR-Ansatz (10 µl PCR-Master-Mix, 0,5 µl rev Primer, 0,5 µl fwd Primer, 9 µl ddH₂O) gemischt und anschließend zu 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika gegeben. Die Kultur wurde ÜN bei 37°C geschüttelt und die PCR mit folgendem Programm gestartet; die Elongationszeit variierte je nach Länge des Insert (*Taq*-Polymerase: 1000 Nukleotide pro Minute).

Tabelle 5.2: Programm für PCR colony screen

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5`	
94°C	30``	1
50°C	1`	25x
72°C	x	↓
72°C	7`	
4°C	∞	

Wurde in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ein positiver Klon gefunden, so wurde eine Mini-Präparation durchgeführt, gefolgt von einer Sequenzierung. Bei Richtigkeit der Sequenz wurde von dem Plasmid eine Maxi-Präparation durchgeführt.

PCR-Mastermix, 2x (Roche)

0,05 U/μl *Taq* DNA-Polymerase
 20 mM Tris-HCl
 100 mM KCl
 3 mM MgCl₂
 0.01% Brij 35 (v/v)
 0,4 mM je dNTP

5.1.6 Herstellung der mutanten SMN-Sequenzen durch ortsspezifische Mutagenese

Für die Herstellung der mutanten SMN-Sequenzen wurde der Anleitung des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene gefolgt, die Transformation erfolgte allerdings in *E. coli* DH5α. Die cDNA von *SMN1* lag bereits als GST-Fusionsprotein in einem pETM30-Vektor vor. Um die Sequenzen der SMA-Mutante SMN(E134K) zu erhalten, wurden die Primer SMN(E134K)_lwr und SMN(E134K)_upr designed, die sich an der entsprechenden Stelle (siehe unterstrichenes Nukleotid in den Primersequenzen) von der wildtypischen Sequenz unterscheiden.

SMN(E134K)_lwr 5`-CACTGGATATGGAAATAGAAAGGAGCAAAATCTGTCCG-3`

SMN(E134K)_upr 5`-CGGACAGATTTTGCTCCTTTCTATTTCCATATCCAGTG-3`

Ein Mutagenese-Ansatz enthielt:

PWO-Puffer	5 µl
PWO-Polymerase	1 µl
Plasmid pET M30-SMN	50 ng
je Primer	10 pmol
dNTPs	1 µl
ddH ₂ O	ad. 50 µl

Tabelle 5.3: PCR-Programm für ortsspezifische Mutagenese von SMN(E134K)

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	30``	
94°C	30``	1
55°C	1`	16x
72°C	7`30``	1
72°C	10`	
4°C	∞	

Nach der PCR wurde den Ansätzen je 1 µl *DpnI* zum Verdau der methylierten Ausgangs-DNA zugegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 20 µl des Ansatzes in *E. coli* DH5α transformiert (5.1.3) und mit einigen Kolonien der Mutante SMN(E134K) ein PCR colony screen durchgeführt (5.1.5.2), dem ein Testverdau mit *MnlI* folgte (5.1.4.1). Durch den Nukleotidaustausch sollte die Erkennungssequenz für *MnlI* so verändert sein, dass bei einem Verdau mit *MnlI* ein differierendes DNA-Bandenmuster im Vergleich zur Wildtypsequenz auftritt. Positive Klone wurden sequenziert (5.1.4.2) und das mutierte SMN-Fragment subkloniert.

5.1.7 Subklonierung

Sowohl die mutierte als auch die WT Sequenz von SMN wurde als GST- Fusion aus pET M30 mit *XbaI* und *XhoI* ausgeschnitten, über Agarosegelelektrophorese vom Rest des Plasmids getrennt, über NucleoSpin®Extrakt II aufgereinigt und in einen *NheI* und *XhoI* geschnittenen, dephosphorylierten pET28b` ligiert. *NheI* und *XbaI* besitzen dieselben Überhänge; nach Ligation befindet sich an dieser Stelle nur noch eine *XbaI* Schnittstelle. In pET28b` lagen bereits Gemin2 und Gemin8 kloniert vor. Das neu gebildete Tricistron hatte folgende Reihenfolge: Gemin2/Gemin8/pL/(GST(His)₆TEV-SMN) (Chari, A. *et al.*, 2008).

Für die Herstellung des Bicistrons Gemin7-6 wurde zuerst Gemin6 in einem *EcoRI* und *XhoI* geschnittenen pET28a-Vektor mit einem His₆-Tag versehen. Nach Ausschneiden mit *XbaI* und *XhoI* wurde das Fragment in einen mit *NheI* und *XbaI* geschnittenen pET21a-Vektor

subkloniert. Dieser Vektor enthielt bereits Gemin7 zwischen den Schnittstellen *NdeI* und *NotI*. Das generierte Bicistron setzt sich wie folgt zusammen: Gemin7/Gemin6(His)₆.

5.2 Biochemische Methoden

5.2.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Beim Prozess der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, U.K., 1970) werden Proteine praktisch nach ihrer Masse aufgetrennt. Das SDS im Probenpuffer denaturiert die Proteine durch Erhitzen bei 95°C und DTT bricht Disulfidbrücken auf. Ein SDS-Molekül bindet im Schnitt zwei Aminosäuren und verleiht so dem Protein eine gleichmäßig verteilte negative Ladung, die der Masse des Proteins in etwa proportional ist. Etwaige negative Ladungen des Proteins werden so überdeckt.

Verwendet wurden 10- oder 16% Trenngele mit einem hohen Anteil an TEMED, da gezeigt werden konnte, dass dadurch die Trennung der niedermolekularen Sm Proteine, speziell SmD1, D2 und D3, erhöht wird (Lehmeier, T. *et al.*, 1990). Die Trenngele wurden mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet und in einer Gelelektrophoresekammer mit Laemmli-Puffer einer Spannung von 75 mA ausgesetzt.

SDS-Proteinprobenpuffer, 6x	7 ml (v/v) 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 3 ml (v/v) 86%iges Glyzerin 1 g (w/v) SDS 1 g (w/v) DTT 0,1% BPB
Unstained Protein Molecular Weight Marker, Protein-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Protein-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
High-TEMED Sammelgel (5%)	3 ml PAA (37,5:1) 6,75 ml 0.5 M Tris/HCl pH 6,8 8,25 ml ddH ₂ O 90 µl 10% APS 45 µl TEMED
High-TEMED Trenngel (10 - 16%)	10 ml, 12 ml, 13 ml bzw. 16 ml PAA (37,5:1) 11,25 ml 1 M Tris/HCl pH 8,8 ad. 30 ml ddH ₂ O 100 µl 10% APS 100 µl TEMED

SDS-PAGE-Puffer	1x Lämmli
Lämmli-Puffer, 10x	250 mM Tris 1,92 M Glycin 35 mM SDS

5.2.2 Herstellung eines Gradientengels (12-16%)

2,5 ml einer 16%igen PAA-Lösung werden mit je 8,3 µl APS und TEMED in der Ausflusskammer und 2,5 ml einer 12%igen PAA-Lösung werden mit je 8,3 µl APS und TEMED in der Zuflusskammer gemischt. Nach Öffnen des Ausflussschlauches wird die Verbindung zwischen den beiden Kammern geöffnet und unter weiterem Mischen der Ausflusskammer die PAA-Lösung zwischen die Gelplatten geleitet.

Bei Gebrauch von kommerziell gefertigten Gelen wurden von BioRad NuPAGE Novex 4 - 12% Bis-Tris-Gradientengele verwendet.

Laufpuffer für BioRad NuPAGE-Gele	1x MES
MES-Puffer, 20x	1 M MES-H ₂ O 1 M Tris-Base 69,3 mM SDS 20,5 mM EDTA (372 g/mol) pH ~ 7,3

5.2.3 Coomassiefärbung

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel für 30' in Coomassiefärbelösung geschüttelt. Diese Färbung ist eine Methode für den quantitativen Nachweis von Proteinen. Der Farbstoff Serva Blue R250 bindet im Sauren positiv geladene Aminosäurereste, die Detektionsgrenze liegt dabei bei etwa 100 ng Protein. Aufgrund seiner Affinität zu Proteinen färbt er Proteine stärker als die Gelmatrix, so dass nach Behandlung mit Coomassie-Entfärbelösung nur die Proteine im Gel als blaue Banden sichtbar bleiben.

Coomassie-Färbelösung	45% (v/v) MeOH 10% (v/v) Essigsäure 0,2% Serva Blue R
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Essigsäure

5.2.4 Silberfärbung nach Merril

Zur besseren Visualisierung von schwachen Proteinbanden wurden SDS-PAGEs mit der Silberfärbemethoden angefärbt (Merril, C.R. *et al.*, 1981). Dazu wurde das Gel ÜN oder für mindestens 1 h bei RT fixiert, anschließend dreimal 20 Sekunden mit 50% Ethanol gewaschen und eine Minute mit Natrium-Thiosulfatlösung behandelt. Dreimaligem Waschen mit dd.H₂O für 20 Sekunden folgte die Imprägnierung mit Silberlösung für 20 Minuten. Erneutem dreimaligen Waschen mit dd.H₂O für 20 Sekunden folgte die Zugabe der Entwicklerlösung. Das Gel wurde darin so lange behandelt, bis die gewünschte Intensität der Banden erreicht war, anschließend mit dd.H₂O gespült und sofort digital archiviert.

Fixierlösung (100 ml)	50% MeOH 12% Essigsäure, frisch mit 50 µl an 35% Formaldehyd versetzen
Waschlösung (200 ml)	50% EtOH (Geldicke = 1 mm) 30% EtOH (Geldicke < 1 mm)
Na-Thiosulfatlösung (100 ml) (wichtig: frisch und genau ansetzen)	0,02 g Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
Silberimprägnierung (50 ml)	0,1 g AgNO ₃ 37,5 µL 37% Formaldehyd
Entwickler (50 ml Natriumcarbonatlösung)	3 g Na ₂ CO ₃ , frisch mit 25 µl 37% Formaldehyd versetzen

5.2.5 Proteinaufreinigung

5.2.5.1 Aufreinigung des trimeren SMN-Komplexes

Das Plasmid pET28a mit der cDNA für Gemin2/Gemin8/(GST(His)₆TEV-SMN) wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Star transformiert, in dem bereits pRARE vorlag. Sowohl die Vor- als auch die Hauptkultur enthielten 2% Glukose, die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Chloramphenicol (alle 1:1000), außerdem 0,5 M Sorbitol. Zudem wurde der Hauptkultur noch 1 mM Betain zugefügt. *E. coli* nimmt aufgrund der erhöhten extrazellulären Sorbitolkonzentration vermehrt Betain in die Zelle auf, was wiederum die Stabilität und Löslichkeit der überexprimierten Proteine steigert (Blackwell, J.R. and Horgan, R., 1991).

Die Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,2 OD, bei 15°C bis OD 0,4 inkubiert und dann die Expression mit 0,5 mM IPTG gestartet. Die Ernte der Zellen erfolgte 20 h nach Induktion (Zentrifugation bei 4°C, 4 000 rpm, 15'), wobei immer zwei Liter sequentiell in einen Becher geerntet wurden; deswegen beziehen sich alle folgenden Angaben

immer auf ein Ausgangsvolumen von zwei Liter zentrifugierter Bakterienkultur. Das Pellet wurde in 40 ml Waschpuffer I aufgenommen und mit einem Mix aus Proteaseinhibitoren (Leustatin/Pepstatin, AEBSF, PMSF und Aprotinin) versetzt. Nach Ultraschallbehandlung (Stärke 8, 50% output, 3x 1,5 Minuten) wurde die Lösung durch Ultrazentrifugation geklärt (Beckman 45Ti, 25.000 rpm, 1 h) und der Überstand mit 5 ml Glutathionsepharose 4B (GE Healthcare) für 2 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert.

Die Matrix wurde fünfmal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen, die Reaktionsgefäße mit Waschpuffer II aufgefüllt und 100 µl TEV-Protease (2 mg/ml) zugegeben (1:50 v/v). Nach 16 h auf dem Drehrad bei 4°C wurde der Überstand abgenommen, die Matrix viermal mit Waschpuffer II gespült und die geschnittenen Komplexe in einem 13%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Für Rekonstitutionen an anti-SMN-Matrix wurde der Durchfluss direkt mit entsprechender Sepharose zur Präzipitation inkubiert.

Waschpuffer I	50 mM Imidazol pH 6,8 350 mM NaSO ₄ 10 mM ETDA 10% Galaktose 1 mM TCEP 1 mM Spermidin
Waschpuffer II	50 mM Imidazol pH 6,8 150 mM NaSO ₄ 10% Galaktose 1 mM TCEP 1 mM Spermidin

5.2.5.2 Aufreinigung des Dimers Gemin6/Gemin7

Für die Aufreinigung von Gemin6/Gemin7 wurde das Plasmid pET21a Gemin7/Gemin6(His)₆ in *E. coli* BL21 Star transformiert. Die Kultur wurde bis zu einer OD von 0,7 bei 37°C inkubiert, auf 15°C abgekühlt und bei 0,8 OD mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach 5 h erfolgte die Ernte und das Pellet wurde in 40 ml Waschpuffer I resuspendiert und nach Zugabe von je 166 µl Proteaseinhibitoren Leustatin/Pepstatin, AEBSF, PMSF und Aprotinin mit Pausen auf Eis sonifiziert (Stärke 8, 50% output, 4 x 2'). Nach anschließender Zentrifugation bei 40 000 rpm, 4°C für 1 h, wurde der Überstand mit 500 µl Ni-NTA/Liter-Kultur bei 4°C auf dem Überkopffrotor 2 h lang inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Beads mit Ni-Waschpuffer wurden die Komplexe mit Ni-Elutionspuffer in 1 ml-Fractionen eluiert und durch SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen 20 mM Hepes pH

7,5, 100 mM NaCl und 5 mM DTT dialysiert. Die Probe wurde auf eine Gelfiltrationschromatographie (HiLoad 26/60 Superdex) angeschlossen. Die Fraktionen wurden durch eine SDS-PAGE analysiert. Fraktionen mit höchster Konzentration an Gemin6/Gemin7 wurden vereinigt und für die Rekonstitutionen gegen 1x PBS + 0,01% N-P40 dialysiert.

Waschpuffer I	20 mM Hepes pH 8.0 500 mM NaCl 5 mM β -ME
Waschpuffer II	20 mM Hepes pH 8.0 300 mM NaCl
Ni-Waschpuffer	20 mM Hepes pH 8,0 500 mM NaCl 10 mM Imidazol 5 mM β -ME
Ni-Elutionspuffer	20 mM Hepes pH 8,0 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 5 mM β -ME

5.2.5.3 Aufreinigung und Rekonstitution des pentameren SMN-Komplexes

Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 StarTM (DE3) {pLysS} wurde mit pRARE und pET21a-Gemin7-6 transformiert und davon kompetent Zellen hergestellt (5.1.3). Dieser neue Stamm *E. coli* BL21 Star pRARE/pET21aGemin7-6 wiederum wurde mit dem Plasmid pET28b` (Gemin2/Gemin8/(GST(His)₆TEV-SMN) transformiert. Sowohl die Vor- als auch die Hauptkultur enthielten 2% Glukose, die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Chloramphenicol (1:1000) und zudem 0,5 M Sorbitol. Der Hauptkultur wurde zusätzlich 1 mM Betain zugefügt.

Die Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,2 OD, bei 15°C bis OD 0,4 inkubiert und dann die Expression mit 0,5 mM IPTG gestartet. Die Ernte der Zellen erfolgte 20 h nach Induktion (Zentrifugation bei 4°C, 4 000 rpm, 15'), wobei immer zwei Liter sequentiell in einen Becher geerntet wurden; deswegen beziehen sich alle folgenden Angaben immer auf ein Ausgangsvolumen von zwei Liter zentrifugierter Bakterienkultur. Das Pellet wurde in 40 ml Waschpuffer I aufgenommen und mit einem Mix aus Proteaseinhibitoren (Leustatin/Pepstatin, AEBSF, PMSF und Aprotinin) versetzt. Nach Ultraschallbehandlung (Stärke 8, 50% output, 3x 1,5 Minuten) wurde die Lösung durch Ultrazentrifugation geklärt

(Beckman 45Ti, 25.000 rpm, 1 h) und der Überstand mit 5 ml Glutathionsepharose 4B (GE Healthcare) für 2 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert.

Die Matrix wurde fünfmal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen, die Reaktionsgefäße mit Waschpuffer II aufgefüllt und 100 µl TEV-Protease (2 mg/ml) zugegeben (1:50 v/v). Nach 16 h auf dem Drehrad bei 4°C wurde der Überstand abgenommen, die Matrix viermal mit Waschpuffer II gespült und die geschnittenen Komplexe in einem 13%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf die korrekte Sm-Beladung überprüft. Für Rekonstitutionen an anti-SMN-Matrix wurde der Durchfluss direkt mit entsprechender Sepharose zur Präzipitation inkubiert.

Waschpuffer I	50 mM Imidazol pH 6,8 350 mM NaSO ₄ 10 mM ETDA 10% Galaktose 1 mM TCEP 1 mM Spermidin
Waschpuffer II	50 mM Imidazol pH 6,8 150 mM NaSO ₄ 10% Galaktose 1 mM TCEP 1 mM Spermidin

5.2.5.4 Aufreinigung von Gemin3-5 aus Sf21 Insektenzellen

Die für Gemin3 und Gemin4 codierenden Sequenzen wurden N-terminalen mit einem His₆-Affinitätstag in die MCS2 des Vektors pFBDM4 kloniert (*NcoI* und *NotI*). Um erfolgreich transduzierte Zellen bereits im Vorfeld identifizieren zu können, diente EGFP als Transduktionsmarker in der MCS1 (*NdeI* und *StuI*). Allen Tags folgte eine TEV-Schnittstelle. Die erhaltenen Vektoren wurden in *Sf21*-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) transduziert, um damit einen P2 Titer der Baculoviren zu generieren. *Sf21*-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit 3 MOI (*engl.*: Multiplicity of infection) aus einer Kombination von Baculoviren (His₆-Gemin3/EGFP + His₆-Gemin4/EGFP + GST-Gemin5/EGFP) transduziert und für 72 bis 79 Stunden inkubiert (Detaillierte Klonierungsstrategie siehe Dissertation Nils Neunkirchen, 2012).

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (4 000 rpm, 15', 4°C), in Puffer I mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation (45Ti, Beckman; 40.000 rpm, 1h, 4 °C) konnte ein klarer Überstand gewonnen werden, der mit 10 ml Glutathionsepharose FF (GE Healthcare) für 2h bei 4°C auf

einem Überkopffrotor inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml Puffer I wurde der Proteinkomplex mit 40 mM Glutathion eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels 10%iger SDS-PAGE analysiert, gegen 1 x PBS + 0,01% N-P40 dialysiert und der Komplex zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Puffer I:	50 mM Natrium-Phosphat, pH 7.5 500 mM NaCl 10 mM EDTA 10% Glyzerin 1 mM Spermidin 1 mM TCEP
PBS, 10x	1,4 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5 mit NaOH

5.2.5.5 Rekonstitution des gesamten SMN Komplexes

Um den gesamten SMN Komplex zu generieren, wurde der gereinigte pentamere Komplex (5.2.5.3) ohne Sm Proteine oder mit gebundenem Sm Subcore oder Core an Protein G-Sepharose mit gekoppeltem 7B10-Antikörper präzipitiert, gewaschen und mit einem 4-fachen Überschuss des Trimers aus Gemin3-5 inkubiert (ÜN, 4 °C, Intervallschüttler 1200 rpm: 7` schütteln, 2` Pause). Die Beads wurden gewaschen und die Rekonstitution des gesamten SMN Komplexes mittels Gradienten-SDS-PAGE überprüft.

5.2.5.6 Aufreinigung der Sm Proteine

Die Proteinreinigung der Heterooligomere Sm D1/D2, Sm D3/B und Sm E/F/G wurde nach dem Protokoll von Christian Kambach durchgeführt (Kambach, C. *et al.*, 1999)

5.2.5.7 Aufreinigung pICln

Die Proteinreinigung von pICln wurde nach dem Protokoll aus Chari *et al.* durchgeführt (Chari, A. *et al.*, 2008).

5.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um den Proteingehalt von Lösungen zu bestimmen, wurde ein UV-Absorptionsspektrum von 240-340 nm gemessen. Mit Hilfe des von ProtParam berechneten Extinktionskoeffizienten (www.expasy.org/tools/protparam.html) und der nachstehenden Formel konnte die Molarität der Lösung ermittelt werden und durch Multiplikation mit dem Molekulargewicht die Konzentration in mg/ml berechnet werden.

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} * d}$$

c = Konzentration in mol/l

A₂₈₀ = gemessene Absorption bei 280 nm

ε₂₈₀ = berechneter Extinktionskoeffizient in M⁻¹ cm⁻¹

d = Abstand in cm

5.2.7 Rekonstitution des 6S-Komplexes und von pICln-D3-B

Um die für das Transferexperiment benötigten Komplexe 6S (pICln-D1/D2-E/F/G) und pICln-B/D3 zu erhalten, wurden die aufgereinigten Proteine pICln, SmD1/D2, SmB/D3 und SmE/F/G entsprechend äquimolar gemischt. Die Ansätze wurden mit 4x Rekonstitutionspuffer versetzt und mit ddH₂O auf 400 µl aufgefüllt. Nach Dialyse ÜN und bei 4°C gegen 1x Rekonstitutionspuffer und Zentrifugation (30', 4°C, 13000 rpm) konnte die Komplexformierung durch eine Gelfiltration (Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)) kontrolliert werden. Die den Komplex enthaltenden Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE analysiert, die proteinreichsten Fraktionen vereinigt und ÜN gegen 1x PBS + 0,01% N-P40 dialysiert.

Rekonstitutionspuffer, 4x	80 mM Hepes, pH 7,5 4 M NaCl 20 mM DTT
Gelfiltrationspuffer (filtriert und entgast)	20 mM Hepes pH 7,5 200 mM NaCl 5 mM DTT

Es wurden folgende Standardproteine für die Kalibrierung des Säule Superose 6 10/300 G1 (GE Healthcare) verwendet:

Protein	nativ	Svedberg	denaturiert
Serum-Albumin (Rind), BSA	67 kDa	4,6 S	67 kDa
Aldolase (Kaninchenmuskel)	158 kDa	7,3 S	36 kDa
Catalase (Rind)	232 kDa	11,3 S	60 kDa
Thyroglobulin (Rind)	669 kDa	19 S	320 kDa

5.2.8 Klonierung der humanen U1 snRNA und der pre-snRNA

Aus 100 ng genomischer DNA (Dr. Mirijam Mannefeld) wurde die Sequenz der humanen U1 snRNA mittels PCR mit den Primern hU1-for-*EcoRI*-T7 und Pre-hU1-rev-*Bam*HI amplifiziert.

hU1-for-*EcoRI*-T7:

5`-GGAATTCCTTAATACGACTCACTATAGGATACTTACCTGGCAGGGGAGATACC-3`

Pre-hU1-rev-*Bam*HI:

5`-CGGGATCCCGAAAAGATATGACCCTTGGCGTACAGTCTG-3`

Tabelle 5.4: PCR-Programm für die Amplifizierung der humanen snRNAs

Temperatur	Zeit	Zyklen
94° C	10`	1x
94° C	30``	1
54° C	30``	35x
72° C	20``	1
72° C	2`	1x
4° C	∞	

Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde mit den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Bam*HI geschnitten und anschließend in einen analog linearisierten Vektor pUC19 ligiert.

Um eine Mutante der Sm-Bindungsstelle herzustellen wurde eine ortsspezifische Mutagenese mit folgenden Primern durchgeführt.

hU1-ΔSm-upr 5`-GGAAACTCGACTGCATACCGGACTCGTAGTGGGGGACTG-3`

hU1-ΔSm-lwr 5`-CAGTCCCCCACTACGAGTCCGTTATGCAGTCGAGTTTCC-3`

Um die Richtigkeit der Sequenz neu klonierter Vektoren zu verifizieren, wurden diese zur Sequenzierung an die Firma GATC (Konstanz) versandt.

5.2.9 Arbeiten mit RNA

5.2.9.1 *In vitro*-Transkription

Für die *X. laevis* U1 snRNA und deren Sm Bindungsstellen-Mutante U1ΔSm wurden 100 µg des entsprechenden Vektors ÜN durch Zugabe von *Bam*HI direkt nach der kodierenden Sequenz linearisiert, das Enzym bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert und der Vektor mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die Endkonzentration wurde mit Tris pH 7,4 auf 1 mg/ml eingestellt.

Die Transkription der humanen U1 snRNAs wurde mit aus PCR gewonnen Templates bewerkstelligt. Dazu wurden zu den Vektoren pUC19-U1-T7 bzw. pUC19-pre-U1-T7 die Primer hU1-for-*Eco*RI-T7 und hU1-rev respektive pre-hU1-rev gemischt.

hU1-rev: 5`-CAGGGGAAAGCGCGAACGCAGTCCCCCACTACCACAAATTATGC-3`

pre-hU1-rev: 5`-AAAAGATATGACCCTTGGCGTACAGTCTG-3`

Tabelle 5.5: PCR-Programm für *in vitro*-Transkription

Temperatur		Zeit	Zyklen
hU1/hU1ΔSm	pre-hU1/pre-hU1ΔSm		
94°C	94°C	5`	1x
94°C	94°C	30``	1
63°C	57°C	30``	25x
72°C	72°C	20``	1
72°C	72°C	2`	1x
4°C	4°C	∞	

Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden aufgereinigt und in 40 µl Tris pH 7,4 gelöst (5.1.2). Jeder Transkriptionsansatz enthielt folgende Bestandteile.

	Konzentration	Vol in µl
Template		1 (linearisierter Vektor)/10 (PCR)
ddH ₂ O		10 1
T7 RNA Polymerasepuffer	5x	6
DTT	0,1 M	2,5
G, A, C + U	je 5 mM bzw. 1 mM	5
RNAsin	10 U/µl	1
T7 RNA-Polymerase	1 U/µl	1,5
α[³² P]-UTP	10 µCi/µl	<u>3</u>
	Endvolumen	30

Nach 2 h bei 37°C wurde 1 µl T7 RNA-Polymerase hinzupipettiert und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert.

Nach Auftrennung der RNA auf einem 5%-Polyacrylamid/8 M Harnstoffgel wurde die entsprechende Bande nach einer Exposition auf einem Röntgenfilm ausgeschnitten und anschließend ÜN in 400 µl Acetat-EDTA-SDS-Puffer (AES) bei 4°C auf dem Überkopfrötor aus dem Gel eluiert. Nach Zentrifugation wurde das Transkript präzipitiert.

Dazu wurde der Überstand zu 1 ml EtOH (100%) gegeben und für 2 h bei -20°C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 400 µl 80 EtOH (80%) bei RT resuspendiert. Nach halbstündiger Zentrifugation bei 4°C, 13.000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde mit 50 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Für die einzelnen Experimente wurde eine entsprechende Verdünnung hergestellt.

Denaturierender RNA-Probenpuffer 2x	80% (v/v) Formamid 0,1% (w/v) XC 0,1% (w/v) BPB
Harnstoffgel (5%)	24 g Harnstoff 6.25 mL 40% PAA (19:1) 16 mL ddH ₂ O 10 mL 5x TBE 500 µL 10% APS 50 µL TEMED
Harnstoffgelpuffer	1x TBE
AES-Puffer	300 mM Na ⁺ -Acetat pH 5,2 2 mM EDT 0,1% (w/v) SDS

5.2.9.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA

Die zu behandelnde Probe wurde mit DEPC-H₂O auf 200 µl aufgefüllt und mit 200 µl Phenol (Roti®-Aqua-Phenol für RNA-Isolation) versetzt, geschüttelt und bei RT für 10 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, anschließend mit gleichem Volumen an Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol im Verhältnis 25:24:1 gemischt und geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) und Abnehmen der wässrigen Phase wurde dem Ansatz 1/10 Volumen an 5 molarem Ammoniumacetat und das dreifache Volumen an 100% Ethanol zugegeben und für zwei Stunden bei -20 °C gelagert. Einer Zentrifugation (30', 13000 g, 4 °C) folgte das Waschen des Pellets mit 500 µl 80% Ethanol und ein letzter Zentrifugationsschritt (30', 13000 g, RT). Das Pellet wurde anschließend an der Luft getrocknet und in DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels Absorption bei 260 nm bestimmt.

5.2.9.3 Aufreinigung von RNA mit Trizol

Sollte RNA aus Zellen oder Extrakten extrahiert werden, so konnte dies auch mit Trizol oder TRG-Reagenz (Life-Technologies) bewerkstelligt werden. Zellsuspensionen oder Extrakte wurden auf 1 ml mit Trizol/TRG aufgefüllt, 5' bei RT inkubiert, gegebenenfalls wurde durch Scheren der DNA die Viskosität der Lösung durch mehrmaliges Pipettieren reduziert und die Lösung für 30-60' bei -80 °C in einem vorgekühlten Aluminiumblock gelagert. Nach dem Auftauen wurden 150 µl 1-bromo-3-chloropropan zugegeben. Anschließend wurde 15'' geschüttelt, 10' bei RT inkubiert und 10' bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 2 µl eines Präzipitationsträgers vorgelegt worden waren (Glykogen 35 mg/ml). Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und einer Inkubation auf Eis für 20 Minuten folgte das Pelletieren der RNA (10', 12000 g, 4 °C). Die RNA wurde mit 75% Ethanol gewaschen, 4'' geschüttelt und erneut zentrifugiert (siehe oben). Das Pellet wurde bei RT an der Luft getrocknet und anschließend in DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration wurde mittels Absorption bei 260 nm bestimmt.

5.2.9.4 RNA-Spezifitätstest

Je 10 mg Total-RNA und snRNAs wurden gemeinsam mit Hilfe von pCp 3'-endmarkiert und anschließend phenolisiert. Ein Teil der präzipitierten RNA wurde mit 40 pmol Protein (WT-Pentamer-Core oder Sm Core) unter Zusammenlagerungsbedingungen inkubiert (ohne tRNA),

im Anschluss mit 20 µl (1:1-Gemenge) Y12-Antikörper (gekoppelt an Protein G-Sepharose) für 2 h bei 4 °C immunpräzipitiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die gebundene Komplexe phenolisiert und dann auf ein 8% PAA-Gel (8 M Harnstoff, denaturierend) geladen und die RNA für 1 Stunde mit 30 W aufgetrennt. Mittels Autoradiographie wurden die radioaktiv markierten RNAs sichtbar gemacht.

5.2.9.5 3'-Endmarkierung von RNA

Für die 3'-Markierung von RNA mit pCp (3',5'-Cytidin [5'- 32P]) wurde pro Ansatz Folgendes pipettiert:

DMSO 50%	4 µl
ATP (100 mM)	1 µl
BSA (10 mg/ml)	0,2 µl
T4-RNA-Ligase Puffer	2 µl
T4-RNA-Ligase	1 µl
pCp	0,5 µl
H ₂ O	<u>0,3 µl</u>
Endvolumen	20 µl

Die Reaktion wurden ÜN bei 4 °C inkubiert, am nächsten Tag erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10' und anschließende phenolisiert.

5.2.9.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Jeweils 5 pmol des immunpräzipitierten SMN Pentamers oder des gesamten SMN Komplexes (5.2.5.3 und 5.2.5.5) wurden mit 4-fach Shiftpuffer, der BSA, tRNA, RNase-Inhibitor und die entsprechende radioaktiv markierte RNA enthielt, für 1 h oder bei einer Zeitreihe entsprechend lang bei 37°C inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNPs in einem Nativgel (300 V und 4°C), wurde das Ergebnis durch Autoradiographie visualisiert (Amersham Hyperfilm™ MP (GE Healthcare), 16 h, -80 °C).

Nativer RNA-Probenpuffer, 2x	20% Glyzerin 1 mg/ml Heparin 0,1% XC 0,1% BPB 1x TBE
RNA Nativgel-Laufpuffer	1x TBE

Shiftpuffer, 4x	4x PBS 0,4 mg tRNA 0,4 mg BSA 16 U RNasin 0.025 pmol radioaktive RNA
TBE-Puffer, 10x	890 mM Tris 890 mM H ₃ BO ₄ 20 mM Na ₂ EDTA pH 8,3 mit HCl
RNA Nativgel (6%)	22,5 mL 20% PAA (80:1) 7,5 mL 5x TBE 4 mL 74% Glyzerin 41 mL ddH ₂ O 750 µL 10% APS 75 µL TEMED

Die Experimente wurden mit den exakt gleichen Einstellungen und Apparaturen durchgeführt. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden mit der Densitometrie-Software *Image Lab* für das Gel Doc™ XR+ System von Bio Rad quantifiziert. Die kinetischen Experimente wurden anschließend statistisch ausgewertet und mit der *Solver*-Software von *Excel* an eine Michaelis-Menten-Gleichung angepasst.

5.2.10 Transferassay

SMN-Komplexe ohne Sm-Proteine, als Pentamer oder als ganzer Komplex, wurden gegen 1x PBS + 0,01% N-P40 dialysiert. Zu 20 µg des Komplexes wurden (1) Puffer, (2) 800 pmol des 6S-Komplexes und (3) 800 pmol von pICln-B/D3 pipettiert und für 1 h bei 37°C und 650 rpm inkubiert. Jeder Ansatz enthielt 10 µl AMP-PNP (100 mM) und 2,4 µl Magnesiumchlorid (0,5 M).

Nach Zentrifugation (5', 4°C, 5100 rpm) wurde der Überstand auf 20 µl Protein G Sepharose mit gekoppeltem 7B10-Antikörper transferiert und für 2 h bei 37°C und 900 rpm geschüttelt.

Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS + 0,01% N-P40 wurde im dritten Waschgang das Reaktionsgefäß gewechselt und die Beads noch einmal gewaschen.

Der Überstand wurde verworfen und zu etwa 5 µl Restpuffer 45 µl 1x PBS + 0,01% N-P40 und 10 µl 6x Proteinladepuffer pipettiert, die Proben wurden für 5' bei 95°C gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 13%igem SDS-Polyacrylamidgel.

Der Abgang von pICln wurde durch Westernblotanalyse kontrolliert.

5.2.11 Herstellung von HeLa-Zellextrakt

Ein HeLa-Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in gleichen Volumen an 1x PBS + 0,01% N-P40 resuspendiert. Die Zellen wurden durch 30 „Schläge“ im `tight douncer` auf Eis geknackt. Nach einer Zentrifugation (Tischzentrifuge, 3000 g, 4 °C, 10`) wurde der Überstand abgenommen (zytoplasmatischer Zellextrakt) und das Kernpellet weggefroren. Zur besseren Abtrennung der Membranbestandteile wurde der Extrakt mit 1 ml n-Heptan überschichtet und geschüttelt, anschließend erneut zentrifugiert (60 Ti, 25 000 rpm, 4 °C, 1 h). Die Interphase wurde mit einer Spritzenadel abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

5.2.12 RNP-Verdrängungsassay

Der endogene SMN-Komplex wurde aus zytoplasmatischem Zellextrakt immunopräzipitiert (7B10, 2 mg/ml an Protein G-Sepharose). Der gebundene Komplex wurde mit SmD3-Peptid (Peptide Specialty Laboratories), mit oder ohne 4x sDMA- (symmetrische Di-Methylierung) Modifikation, inkubiert (37, °C, 1 h), sowohl der Überstand als auch die Matrix wurden (nach Waschen) auf endogene, methylierte Sm-Proteine hin untersucht (Western-Blot-Analyse).

5.2.13 Präparation von TPs aus snRNPs

Die snRNPs wurden aus dem Labor von Dr. Berthold Kastner (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) bezogen und lagen in folgendem Puffer vor (20 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTE, 0.5 mM PMSF, 0.2 mM EDTA, pH 8.0, 5% (v/v) Glycerin) (Bringmann, P. *et al.*, 1983). Um den gesamten Proteinanteil (TPs, *engl.*: Total proteins), der hauptsächlich die endogenen Sm-Proteine enthält, zu isolieren, wurden die snRNPs nach Sumpter aufgereinigt (Sumpter, V. *et al.*, 1992). 2 µg snRNPs wurden mit 5 ml Puffer C verdünnt und mit 10 ml Elutionspuffer auf eine Salzkonzentration von 150 mM KOAc und 140 mM NaCl gebracht. Diese Verdünnung wurde mit 5 ml DEAE-Zellulose gemischt (die Matrix wurde vorher in 4 M KOAc resuspendiert und anschließend je viermal mit 10 Volumen Wasser und Waschpuffer gewaschen) und für 15` auf Eis inkubiert, gefolgt von 15` bei 37 °C im Wasserbad. Der Überstand I wurde nach Zentrifugation (10`, 4°C, 10 000 rpm) abgenommen und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 5 ml Waschpuffer wurde die Matrix erneut für 15` auf Eis inkubiert, gefolgt von 15` bei 37 °C im Wasserbad. Der Überstand II wurde nach Zentrifugation (10`, 4°C, 10 000 rpm) abgenommen, mit dem Überstand I gemischt

und auf Eis gelagert. Nach einer Dialyse (ÜN) gegen den Rekonstitutionspuffer wurde die Proteinlösung konzentriert und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Waschpuffer	150 mM KOAc-HAc, pH 5.5 140 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 mM DTE 0,5 mM PMSF
Puffer C:	20 mM Hepes-KOH, pH 8.0 420 mM NaCl 0,2 mM EDTA 1,5 mM MgCl ₂ 5% (v/v) Glycerol 0,5 mM DTE 0,5 mM PMSF
Elutionspuffer:	225 mM KOAc-HAc, pH 5.5 7,5 EDTA 0,5 mM DTE 0,5 mM PMSF
Rekonstitutionspuffer:	20 mM Hepes, pH 7.9 50 mM KCl 0,2 mM EDTA 5 mM MgCl ₂ 5% (v/v) Glycerol 0,5 mM DTE 0,5 mM PMSF

5.3 Immunologische und immunobiochemische Methoden

5.3.1 Immunoblot

Mit Hilfe der Western Blot-Technik können elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert werden. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Spannung von 0,8 mA/cm². Anschließend wurde der Blot mit Amidoschwarz-Färbelösung (5') und mit Amidoschwarz-Entfärbelösung ge- bzw. entfärbt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1x NET-Gelatine oder einer 5%igen Milchpulverlösung (in PBS-T) für 1 h oder ÜN bei RT abgesättigt. Der Inkubation mit dem Primärantikörper (4°C, 4 h oder ÜN) folgten dreimaliges Waschen mit PBS-T für 5' bei RT und 2 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:5000) bei 4°C.

Nach Waschen mit PBS-T (2x, 10', RT) wurden auf den Blot eine frisch angesetzte Mischung aus 10 ml ECL-Lösung II, 100 µl ECL-Lösung I und 10 µl Wasserstoffperoxid gegeben und für 1' inkubiert. Durch Exposition gegen einen Röntgenfilm oder durch die Auswertung am *ChemiDoc XRS*+-System von BioRad konnten spezifische Banden sichtbar gemacht werden.

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% (w/v) Amidoschwarz 10B 10% (v/v) MeOH 2% (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung	90% (v/v) MeOH 3% (v/v) Essigsäure
Blotpuffer	1 x Towbin 20% Methanol
ECL- Lösung I	6,8 mM p-Cumarinsäure (gelöst in DMSO)
ECL- Lösung II	1,25 mM Luminol 100 mM Tris/HCl pH 8,5
ECL-Lösung III	30% H ₂ O ₂
Towbin 10x	250 mM Tris 1,92 M Glyzin 35 mM SDS
NET, 10x	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 7,5 0,05 M EDTA 0,5% (w/v) Triton-X-100 pH 7,4 mit HCl
PBS-Tween (PBS-T)	100 ml 10x PBS 0,5 ml Tween20 2 ml TritonX 100 ad 1 l ddH ₂ O

5.3.2 Immunopräzipitation von Proteinen

5.3.2.1 Kovalente Kopplung von Antikörpern und Proteinen an Sepharosematrix

Um gereinigte Antikörper oder GST-Fusionsproteine für Immunopräzipitationen oder Pull-Down-Experimente kovalent an Protein G-Sepharose bzw. Glutathionsepaharose zu koppeln, wurden 500 µl der Sepharose 2x mit 1x PBS + 0,01% N-P40 gewaschen und anschließend für 1 h auf dem Überkopffrotor bei RT mit 1,5–2,5 mg/ml Antikörper/Protein inkubiert. Zweimaligem Waschen (0,2 M Natriumtetraborat, pH 9,0) der Sepharose folgte die Inkubation in 0,2 M Natriumtetraborat mit 40 mM DMP für 30' auf dem Überkopffrotor. Die Reaktion wurde durch Waschen mit 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 gestoppt und die Sepharose für 2 h auf

dem Überkopffrotor mit 0,2 M Ethanolamin erneut inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (1x PBS + 0,01% N-P40) wurde die Matrix für spätere Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Antikörper 7B10 (anti-SMN) und Y12 (anti-Di-methyl-Arginin) wurden für Immunpräzipitationen jeweils an Protein G-Sepharose gekoppelt und das Fusionsprotein GST-pICln an Glutathionsepharose zur Antikörperreinigung.

5.3.2.2 Immunopräzipitation (IP)

Zur Präzipitation der Proteinkomplexes wurde die entsprechende Matrix verwendet und davon 20 µl der Sepharose (1:1 v/v in Puffer) mit den jeweiligen Ansätzen inkubiert, gewaschen und das Präzipitat mittels SDS-PAGE analysiert. Sollte die Matrix in weiterführenden Experimenten verwendet werden, so wurde das Volumen entsprechend angepasst.

5.3.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Aufgereinigte Proteine, gegen die Antikörper hergestellt werden sollten, wurden zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma immunoGlobe GmbH Antikörpertechnik in Himmelstadt geschickt.

Nach Zentrifugation (5', 3000g, 4°C) wurde der Überstand des Serums mit Glutathionsepharose, an die das entsprechende Antigen als GST-Fusionsprotein gekoppelt war (5.3.2.1), bei 4°C auf dem Überkopffrotor für 2 h inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Matrix 5x mit 1x PBS gewaschen und anschließend durch pH-Schock mit zehnmal 800 µl 0,1 M Glycin pH 2,7 in 10 Reaktionsgefäße eluiert, in denen je 100 µl 1 M Tris/HCl pH 8,0 und 10x PBS vorgelegt waren, um den drastischen pH-Abfall zu mindern. Die Eluate wurden sofort zweimal invertiert. Nach Visualisierung durch eine SDS-PAGE konnten die proteinreichsten Fraktionen vereinigt, gegen 1x PBS ÜN dialysiert und bei -80 C° aufbewahrt werden.

6 Ergebnisse

6.1 Aufbau des SMN-Komplexes und Rekonstitutionsstrategie

Der SMN-Komplex nimmt eine wichtige Funktion in der Biogenese von U snRNPs ein, indem er die am PRMT5-Komplex methylierten und in pICln-Intermediaten arretierten Sm-Proteine aus diesen löst und anschließend auf die Sm-Bindungsstelle in den snRNAs überträgt. Der SMN-Komplex ist eine große makromolekulare Maschine, die neben SMN acht zusätzliche integrale Komponenten enthält (Gemin2-8 und unrip) und durch eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen zusammengehalten wird. Mithilfe von *in vitro*-Interaktionsstudien konnte eine detaillierte Übersichtskarte erstellt werden, in der SMN, Gemin7 und Gemin8 als Rückgrat des Komplexes beschrieben werden, das eine Plattform für die restlichen Gemine bildet (Otter, S. *et al.*, 2007). Der N-Terminus von SMN bindet den C-terminalen Teil von Gemin2 (ehemals SIP-1: SMN interagierendes Protein 1) (Zhang, R. *et al.*, 2011). Kürzlich wurde Gemin2 neben SMN als Bestandteil des Komplexes identifiziert, der mit den Sm-Proteinen interagiert (Zhang, R. *et al.*, 2011; Grimm, C. *et al.*, 2013). Zusätzlich bindet Gemin2 auch Gemin7 (Baccon, J. *et al.*, 2002). Gemin6 wird über Gemin7 an den SMN-Komplex rekrutiert (Pellizzoni, L. *et al.*, 2002). Über seinen Carboxy-Terminus steht SMN mit Gemin8 in Verbindung (Carissimi, C. *et al.*, 2006; Otter, S. *et al.*, 2007). In Abbildung 6.1 ist zu sehen, wie sich die übrigen Gemine im Komplex arrangieren.

Ausgehend von dieser Interaktionskarte wurde eine Strategie zur *in vitro*-Rekonstitution des SMN-Komplexes entwickelt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass es schwierig ist, Proteine des SMN-Komplexes einzeln zu exprimieren. Das liegt zu einem Teil an der schlechten Löslichkeit mancher Proteine aufgrund von Fehlfaltung bzw. einer hydrophoben Oberfläche, teils an der Degradationsanfälligkeit anderer. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Subkomplexe des SMN-Komplexes identifiziert, die sich gemeinsam exprimieren und aufreinigen lassen. Diese „Co-Expressionsstrategie“ ist bereits für SMN und Gemin2 bzw. Gemin6 und Gemin7 erfolgreich angewandt worden (Takaku, M. *et al.*, 2011; Ma, Y. *et al.*, 2005).

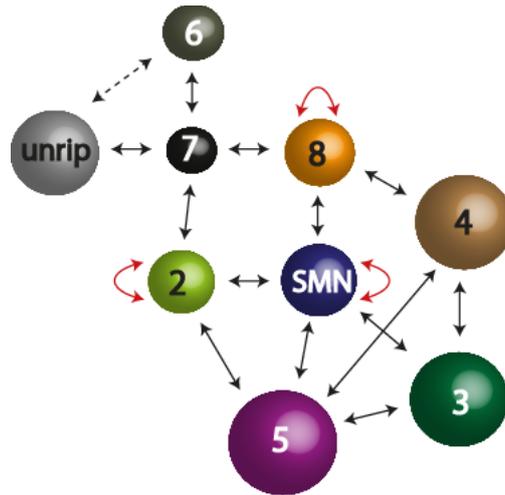


Abbildung 6.1: Interaktionskarte des SMN-Komplexes

Der SMN-Komplex besteht aus neun Proteinen, SMN, Gemin2-8 und unrip. Unrip ist nur im Zytoplasma mit dem Komplex assoziiert. Mit SMN selbst interagieren Gemin2, 3, 5, 7, und 8. Schwarze Pfeile markieren Protein-Protein-Kontakte. Rote Pfeile zeigen die Selbstinteraktion der betreffenden Proteine an. Verändert nach Otter, S. *et al.*, 2007; Neuenkirchen, N. *et al.*, 2008).

Aufgrund der Interaktionskarte, aber auch aufgrund von früheren Studien wurde die Co-Expression von folgenden SMN-Subkomplexen in Angriff genommen: (a) SMN/Gemin2/Gemin8, (b) Gemin6 und 7 sowie (c) Gemin3 und 4. Letzterer Komplex sollte genauso wie das Protein Gemin5 aufgrund der Größe im eukaryontischen Baculovirus-Expressionssystem hergestellt werden.

6.1.1 Klonierung und Expression eines SMN/Gemin2/Gemin8 Trimers

Um den SMN-Komplex schrittweise aufzubauen, sollten als Erstes drei zentrale Bestandteile, nämlich SMN, Gemin2 und Gemin8 als eine Einheit exprimiert werden. Dazu wurde ein tricistronischer Vektor pET28b` konstruiert, in dem die Gene in der Reihenfolge Gemin2/Gemin8/(GST(His)₆TEV-SMN) vorlagen (siehe 5.2.5.1). Dieser Vektor wurde in *E. coli* BL21 StarTM transformiert und die durch ihn kodierten Gene durch IPTG-Induktion (0,5 mM) zur Expression gebracht. Um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen wurde dem Medium Sorbitol (500 mM) und Betain (1 mM) zugesetzt. Nach 20 Stunden wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert, die Zellen aufgeschlossen und aus dem geklärten Zelllysat das überexprimierte SMN/Gemin2/Gemin8-Trimer aufgereinigt. Die Affinitätsreinigung erfolgte über den GST-Fusionsanteil des SMN-Proteins an einer Glutathion-Sepharose-Matrix. Der gebundene Proteinkomplex wurde exzessiv gewaschen und durch Zugabe von TEV-Protease (1:50 v/v, 2 mg/ml) von der Matrix gelöst. Das Eluat wurde aufkonzentriert und durch SDS-PAGE

analysiert (Abbildung 6.2a) Wie man sehen kann wurde die beiden Proteine Gemin2 und Gemin8 mit dem über das GST-Fusionsprotein gereinigte SMN co-gereinigt. Daraus lässt sich schließen, dass sich ein dreiteiliger Komplex gebildet hatte. Zur weiteren Aufreinigung und Analyse wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit einer Superose6 10/300 Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Diese Säule trennt Proteinkomplexe zwischen 5 kDa - 5 MDa auf.

Das Elutionsprofil deutete auf einen nativen Trimer hin, der etwa eine Größe von 300 kDa besitzt. Da das errechnete Molekulargewicht des SMN-Trimers ca. 92 kDa beträgt, kann man auf einen höheren Zusammenschluss von drei bis vier Untereinheiten ausgehen. Durch die Nickel-NTA-Affinitätsreinigung und der anschließenden Gelfiltration konnte ein SMN-Trimer in hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von ca. 5 mg/L Kultur erhalten werden (Abbildung 6.2a).

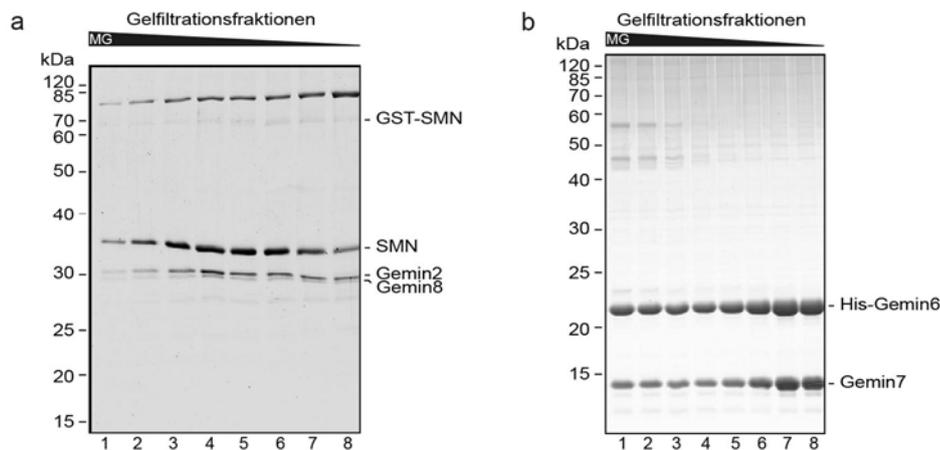


Abbildung 6.2: Der SMN-Komplex kann in Subkomplexen gereinigt werden

Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. a) Aufreinigung von SMN, Gemin2 und Gemin8 über Glutathion-Sepharose, TEV-Verdau und Gelfiltration (Superose6 10/300). b) Dimer aus Gemin6/Gemin7, über Ni-NTA und Gelfiltration gereinigt.

6.1.2 Expression und Aufreinigung für Gemin6/Gemin7

Den nächsten modularen Baustein des SMN-Komplexes bilden Gemin6 und Gemin7. Diese beiden Proteine binden über Gemin8 an den SMN-Komplex. Nach der Klonierung lag das Bicistron Gemin7/Gemin6(His)₆ im Vektor pET21a vor (siehe 5.2.5.2). Auch dieser Vektor wurde in *E. coli* BL21 StarTM transformiert und die Überexpression von Gemin6/Gemin7 mit

IPTG induziert. Nach Ernte der Zellen und Aufschluss durch Ultraschallbehandlung wurde das Protein-Dimer aus dem geklärten Bakterienlysat über Nickel-Sepharose gereinigt. Diese bindet das His-Tag von Gemin6 und erlaubt so die Co-Reinigung des ungetaggen Gemin7. Das Eluat der Nickel-Sepharose-Säule wurde zur weiteren Aufreinigung und zur Qualitätsüberprüfung über eine Superose6 10/300 Säule getrennt (Abbildung 6.2b). Wie man aus dem Elutionsprofil sehen konnte, bilden Gemin6 und 7 einen Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kDa, was auf ein Dimer schließen lässt. Mit einer Ausbeute von 25 mg je Liter Kultur lag diese über der des Trimers.

6.1.3 Rekombinante Herstellung eines pentameren SMN-Komplexes

Die Verfügbarkeit der polycistronischen Vektoren pET28b` bzw. pET21a, die gleichzeitig in Bakterien transformiert und über unterschiedliche Antibiotika selektioniert werden können (Kanamycin bzw. Ampicillin), erlaubte nun im folgenden Schritt die präparative Aufreinigung des SMN/Gemin2/Gemin6/Gemin7/Gemin8-Komplexes, das sog. SMN-Pentamer. Hierfür wurde die optimierte Expressionsstrategie zur Aufreinigung des SMN-Trimers übernommen (siehe 5.2.5.3). Aus co-transformierten *E. coli* BL21 Star wurden der Proteinkomplex zunächst über das GST-SMN-Fusionsprotein affinitätsgereinigt und mit der TEV-Protease geschnitten. Die fünf Komponenten des SMN-Pentamers waren nach dem Schnitt als ein stöchiometrischer Komplex zu erkennen (Abbildung 6.3a, Spur 12). Um den Proteinkomplex weiter von Verunreinigungen wie dem geschnittenen GST-Tag oder der TEV-Protease zu befreien, wurde dieser aufkonzentriert und über eine Gelfiltration gereinigt (Superose6 10/300). Der SMN-Pentamer eluierte als nativer Komplex bei 12 ml, was einem Molekulargewicht von ca. 700 kDa entspricht (Abbildung 6.3b). Da das errechnete Molekulargewicht der Einzelkomponenten lediglich 130 kDa beträgt, zeigen diese Daten, dass es sich beim Pentamer um einen höheren Zusammenschluss, also eine Oligomerisierung handelt, in dem vermutlich fünf bis sechs Pentamer-Einheiten komplexiert sind.

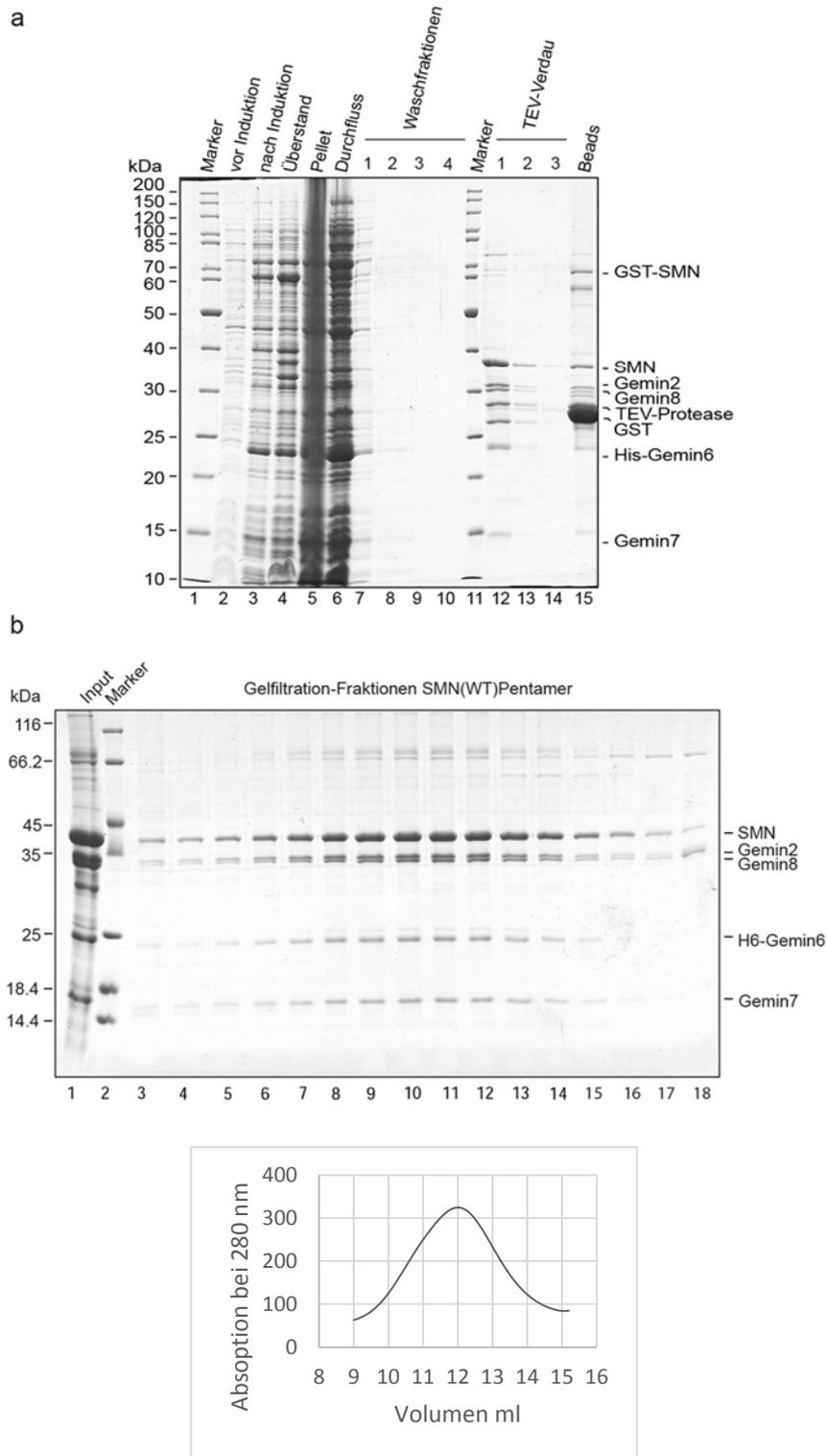


Abbildung 6.3: Kombination von SMN-Trimer und Gemin6/Gemin7 bilden das SMN-Pentamer

Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. a) Die co-exprimierten Proteine wurden über den an SMN gebundene GST-Tag aus dem Bakterienlysat gereinigt und mit TEV-Protease von der Matrix geschnitten. In Spur 12 ist der fünfteilige Komplex aufgetragen. b) Der SMN-Pentamer wurde aufkonzentriert und auf eine Gelfiltration (Superose6 10/300) geladen. Die Peak-Fractionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

6.1.4 Gemin3-5 ergänzen das SMN-Pentamer zum vollständigen SMN-Komplex

Mit der Expression und Aufreinigung der Gemin 3-5 sollte das SMN-Pentamer zum Gesamtkomplex vervollständigt werden. Die Produktion dieser Gemin in Bakterienzellen gestaltete sich aufgrund ihrer Größe schwierig, weshalb als Alternative das MultiBac-Expressionssystem in Insektenzellen (*Sf21*) gewählt wurde. Die cDNA für His₆-Gemin3/EGFP, His₆-Gemin4/EGFP und GST-Gemin5/EGFP wurden jeweils in den Vektor pFBDM4 kloniert (EGFP: *engl.*: Enhanced Green Fluorescent Protein, diente als Transduktionsmarker, der unabhängig von den Geminen exprimiert wurde) (siehe 5.2.5.4). Nach Integration der Vektoren in den Virus und Co-Transduktion der *Sf21*-Zellen mit diesem, wurden die Zellen für 72 Stunden kultiviert und anschließend per Ultraschall aufgeschlossen. Gemin3-5 wurde aus dem geklärten Zelllysate über den GST-Fusionsanteil in Gemin5 an Glutathion-Sepharose isoliert von der Säule mit Glutathion eluiert (Abbildung 6.4a, Spur 7).

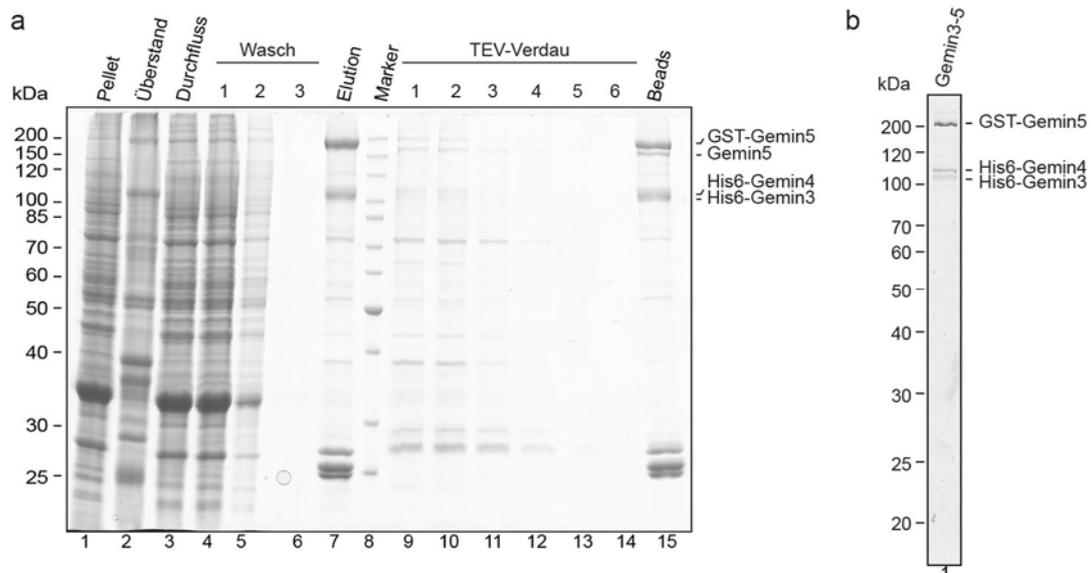


Abbildung 6.4: Gemin3-5 werden aus transduzierten Insektenzellen gewonnen

SDS-Gel. a) Insektenzellen wurden mit dem Baculovirus transduziert, das die Vektoren für die Expression von His₆-Gemin3, His₆-Gemin4 bzw. GST-Gemin5 enthält. 72 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und überexprimiertes Gemin3-5 über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. b) Reinigung von Gemin3-5 in einer Gelfiltration. Eine Fraktion wurde repräsentativ in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Wie man sehen kann, werden alle drei Proteine an der Glutathion-Sepharose gebunden, was auf die Ausbildung eines trimeren Komplexes schließen lässt. Auch diese Proteine wurden über eine Gelfiltration (Superose6 10/300) bis zur Homogenität aufgereinigt (Abbildung 6.4b). Die Größenausschlusschromatographie zeigte, dass der trimere Komplex erhalten blieb und bei einer Größe von ca. 1,2 MDa eluierte. Dieses Profil ließ auf einen dreifachen Zusammenschluss des Gemin3-5-Trimers schließen.

Da das Entfernen des GST-Tags auch nach mehrtägiger Inkubation mit TEV-Protease nur in geringem Umfang möglich war (Abbildung 6.4a, Spur 9 - 15), wurde für alle zukünftigen Rekonstitutionen das ungeschnittene Gemin5 verwendet.

Mit unrip (unr-interagierendes Protein [upstream of N-ras]) wurde ein Protein des SMN-Komplexes bei der Rekonstitution nicht berücksichtigt, da es sich dabei um einen nur im Zytoplasma assoziierten Bestandteil des Komplexes handelt, über dessen Aufgabe bislang wenig bekannt ist.

6.1.5 Totalrekonstitution des SMN-Komplexes

Mit den Proteinen Gemin3-5 standen nun auch die drei verbleibenden Bestandteile des SMN-Komplexes in nativer Form zur Verfügung. Durch Kombination der verschiedenen Subkomplexe (SMN-Trimer, Gemin6/Gemin7 und Gemin3-5) sollte der gesamte SMN-Komplex rekonstituiert werden. Zuerst wurde das aufgereinigte SMN-Pentamer an eine Matrix immobilisiert und anschließend mit den gereinigten Geminen 3-5 inkubiert. Hierzu wurde eine Protein G-Sepharose Matrix verwendet, an die der Antikörper 7B10 kovalent gekoppelt worden war. Dieser monoklonale Antikörper erkennt spezifisch eine Peptid-Sequenz innerhalb der ersten 30 Aminosäuren am N-Terminus von SMN (Meister, G. *et al.*, 2000). Nach Waschen der Säule konnte die Totalrekonstitution des SMN-Komplexes auf einem SDS-Gradienten-Gel (12 - 16%) verfolgt werden. In der Coomassie-Färbung sah man, dass das SMN-Pentamer in der Lage war die drei großen Gemine stöchiometrisch zu binden und in den bestehenden Komplex zu integrieren (Abbildung 6.5, Spur 2).

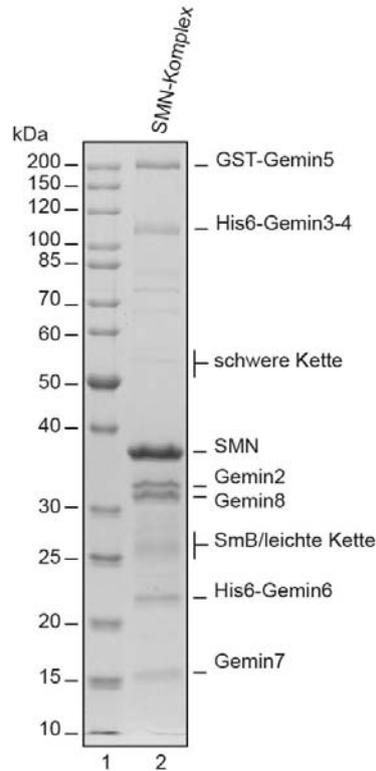


Abbildung 6.5: Der gesamte SMN-Komplex kann aus den Untereinheiten rekonstituiert werden

SDS-PAGE. Der gereinigte SMN-Pentamer wurde mit 7B10-Antikörper immobilisiert und mit den Geminen 3-5 inkubiert (ÜN, 4 °C, 1x PBS). Nach Waschen der Matrix wurden die gebundenen Proteine in einem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

6.2 Biochemische und funktionelle Charakterisierung des SMN-Komplexes

Nach erfolgreicher Etablierung des Rekonstitutionssystems für den gesamten SMN-Komplex wurde dieser im Folgenden näher charakterisiert. Dafür sollten die einzelnen Schritte der U snRNP-Biogenese *in vitro* nachvollzogen werden. Die erste Aufgabe, die der SMN-Komplex dabei bewerkstelligen muss, ist die Übernahme der Sm-Proteine vom PRMT5-Komplex. Da die Sm-Proteine in diesem Stadium mit dem inhibitorischen Chaperon pICln komplexiert vorliegen, muss im folgenden Schritt pICln aus den Intermediaten verdrängt werden. Schließlich wird die snRNA rekrutiert, die der Sm-Proteine auf die Sm-Bindungsstelle übertragen und das gereifte Partikel entlassen.

6.2.1 Sm-Proteintransfer

Während der U snRNP-Biogenese ist es die Aufgabe des SMN-Komplexes die Sm-Proteine zu binden und anschließend auf die snRNAs zu übertragen. Mit der Verfügbarkeit des rekombinanten SMN-Komplexes war es nun möglich *in vitro* zu testen, ob dieser in der Lage ist die Sm-Heterooligomere zu binden.

Frühere Studien zeigten, dass die Sm-Heterooligomere nicht allein in der Zelle vorliegen, sondern durch das Chaperon pICln vor einer vorzeitigen und falschen Anlagerung an RNAs geschützt werden (Fisher, D.E. *et al.*, 1985; Raker, V.A. *et al.*, 1996; Chari, A. *et al.*, 2008). Dabei bilden sich die Intermediate des 6S- (pICln/D1-D2/E-F-G) und 20S-Komplexes (PRMT5/WD45/pICln/D1-D2/D3-B/E-F-G) aus (Meister, G. *et al.*, 2000). Diese Zusammenschlüsse stellen sehr stabile Zwischenprodukte dar, die vom SMN-Komplex aufgelöst werden müssen. Dabei übernimmt der SMN-Komplex die vorgeformten Sm-Proteine-Oligomere und vertreibt gleichzeitig pICln aus den Intermediaten. Sowohl der 6S-Komplex als auch das am 20S-Komplex gebildete pICln/D3-B-Trimer kann aus rekombinanten Proteinen rekonstituiert und durch Gelfiltration gereinigt werden (Abbildung 6.6a, Spur 5 und 6) (Kambach, C. *et al.*, 1999; Chari, A. *et al.*, 2008). Um zu testen, ob der rekonstituierte SMN-Komplex die Sm-Bindung *in vitro* ausführen kann, wurde dieser entweder alleine, mit dem 6S-Komplex oder mit 6S- und pICln/D3-B-Komplex für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der SMN-Komplex wurde anschließend mit 7B10-Antikörpern immunpräzipitiert und die gebundenen Proteine anschließend durch eine SDS-PAGE analysiert. Wie in Abbildung 6.6b zu sehen ist, präzipitierte der 7B10 Antikörper den gesamten SMN-Komplex. In beiden Fällen wurden darüber hinaus auch die zuvor als pICln-Komplexe hinzugegebenen Sm-Proteine co-präzipitiert. Bemerkenswerterweise ging diese Übertragung mit der Loslösung von pICln einher, was zeigte, dass bezüglich der Sm-Proteinbindung der rekombinante und endogene SMN-Komplex nicht unterscheidbar waren (Abbildung 6.6b, Spur 3 bzw. 4).

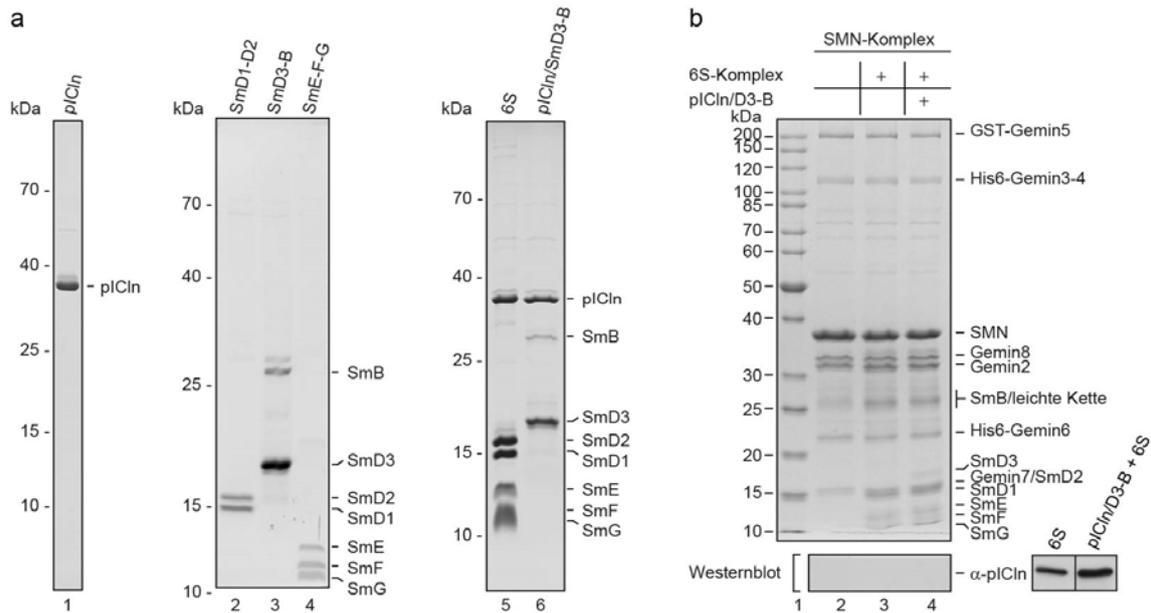


Abbildung 6.6: Der SMN-Gesamtkomplex bindet Sm-Proteine

SDS-PAGE. a) Die Einzelkomponenten pICln und die Sm-Heterooligomere wurden separat aufgereinigt und der 6S-Komplex und pICln/D3-B mittels Dialyse aus eine Hochsalzrekonstitution und Gelfiltration rekonstituiert. b) Der SMN-Komplex wurde allein, mit dem 6S-Komplex oder mit em 6S- und pICln/D3-B-Komplex inkubiert und immunpräzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden über ein denaturierendes SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Im Western-Blot wurde gegen pICln detektiert.

Der rekombinante SMN-Komplex ist somit im Stande, den ersten Schritt in der U snRNP-Biogenese auszuführen und die Sm-Proteine aus den stabilen, arretierten pICln-Intermediaten zu lösen. Dabei wird das Chaperon pICln aus den beiden Intermediaten 6S- und pICln/D3-B-Komplex verdrängt und ist kein weiterer Bestandteil des SMN-Komplexes.

6.2.2 snRNP-Zusammenlagerung

Die nächste Stufe im Aufbau der U snRNPs ist die Übertragung der Sm-Proteine auf die snRNA. Nachdem der rekombinante SMN-Komplex mit den Sm-Proteinen beladen werden konnte, wurden daher als Nächstes überprüft, ob der Transfer der gebundenen Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf eine snRNA erfolgen kann. Als RNA-Substrate wurden hierbei zwei snRNA-Derivate verwendet, zum einen die wildtypische U1 snRNA, zum anderen eine U1 snRNA Mutante (U1ΔSm), bei der die Sm-Bindungsstelle durch Substitution inaktiviert war. Zur Sichtbarmachung der Zusammenlagerungsreaktion in nativen Gelen wurden die snRNAs durch *in vitro*-Transkription mit α - ^{32}P -UTP radioaktiv markiert.

Die beobachteten Zusammenlagerungsreaktionen in Spur 3 und 4 waren zudem hochspezifisch, da in analogen Ansätzen keinerlei Bindung der Sm-Proteine an die mutierte U1 Δ Sm snRNA zu beobachten war (Abbildung 6.7, Spur 6 - 8).

6.2.3 Die Bedeutung von Gemin3-5 für das snRNP-Zusammenlagerung

Obwohl es Hinweise gibt, dass ein Knockdown von Gemin5 keinen negativen Einfluss auf die Zusammenlagerungsaktivität ausübt (Shpargel, K.B. and Matera, A.G., 2005), zeigten neuere Daten, dass dieser Bestandteil des SMN-Komplexes für die Erkennung von snRNAs verantwortlich ist (Battle, D.J. *et al.*, 2006; Yong, J. *et al.*, 2010; Lau, C.K. *et al.*, 2009). Gemin5 wird dabei v.a. die Erkennung von Vorläufer snRNAs (prä-snRNAs) zugeschrieben (Yong, J. *et al.*, 2010). Um die Interaktion von Gemin5 mit dieser "unreifen" RNA zu untersuchen, wurde das Protein alleine oder zusammen mit Gemin3/Gemin4 entweder mit der reifen humanen hU1 snRNA oder deren unprozessierte Vorläufer unter Zusammenlagerungsbedingungen inkubiert (Abbildung 6.8, Spur 2 - 4 bzw. 7 - 9).

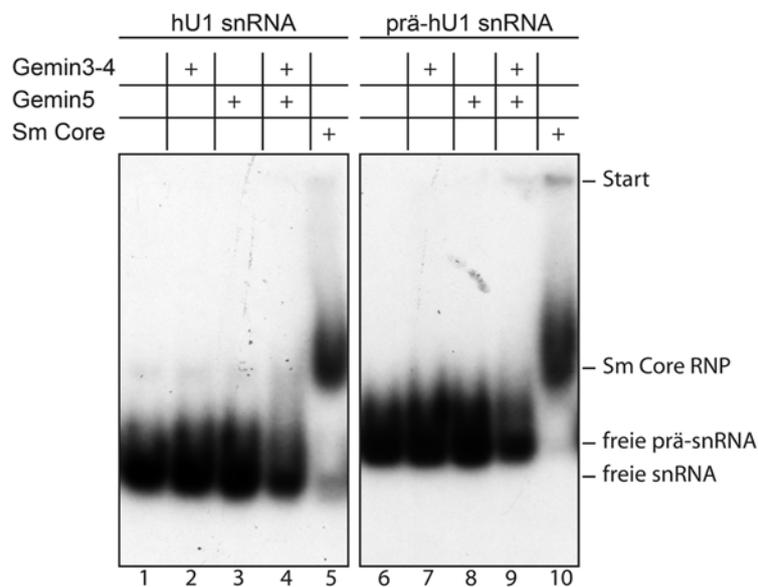


Abbildung 6.8: Gemin3-5 binden keine snRNA

Autoradiographie. a) Der SMN-Komplex mit gebundenen Sm Core-Proteinen wurden mit der radioaktiv-markierten humanen prä-U1 und reifen U1 snRNA inkubiert und unterschiedlich lange unter Zusammenlagerungsbedingungen inkubiert. Die geformten RNPs wurden mittels nativer PAGE aufgetrennt. b) Graphische Darstellung der Zusammenlagerungsaktivität des SMN-Gesamtkomplexes. Densitometrische Messung der Banden mit dem Gel Doc™ XR+-System (Bio-Rad). Anpassen der Werte über *Solver* Add-In von Microsoft Office Excel.

Überraschenderweise konnte Gemin 5 weder alleine noch zusammen mit Gemin3-4 die snRNAs binden und zwar unabhängig davon, ob es sich um den Vorläufer oder die reife Version handelte. Die Sm Proteine dagegen bildeten ein RNP was die Funktionalität der verwendeten RNAs belegte (Abbildung 6.8, Spur 5 und 10).

Eine Erklärung für die fehlende Interaktion zwischen Gemin5 und der U1 snRNA in diesem Ansatz ist möglicherweise darin zu suchen, dass die Erkennung der prä-snRNA durch Gemin5 nur im Kontext des gesamten SMN-Komplexes erfolgen kann. Um diese Option zu überprüfen, wurde der Gesamtkomplex mit (a) der reifen snRNA und (b) der prä-snRNA inkubiert und die RNP-Formierung über die Zeit beobachtet. Dafür wurde ein Master-Mix pipettiert, aus dem zu den angegebenen Zeitpunkten eine Probe abgenommen und auf Eis gelagert wurde, um die Reaktion zu stoppen. Die Auftrennung der RNPs erfolgte in einem nativen Gel-System.

In Gegenwart beider snRNA-Varianten war der rekombinante SMN-Komplex in der Lage Core-RNPs zu formieren. Dabei fiel aber auf, dass trotz Einsatz der gleichen Konzentrationen aller Reaktanten die RNP-Bildung in Gegenwart der prä-snRNA effizienter, d.h. schneller ablief als dies mit der reifen RNA möglich war (Abbildung 6.9). Die Vorläufer-RNA scheint somit ein besserer Reaktionspartner für den SMN-Komplex zu sein bzw. die Umsatzrate der Reaktion liegt höher. Um diesen Effekt deutlicher herauszuarbeiten, wurden die auf dem Röntgenfilm erhaltenen Banden der RNPs einer densitometrischen Quantifizierung unterzogen (Doc™ XR+-System von Bio-Rad) und das Ergebnis in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 6.9). Als Referenz wurde die freie RNA verwendet (Schwärzung des Filmes bei der freien snRNA = 100%). Die zugehörigen ermittelten Werte sind in Tabellen im Anhang zu finden (Abschnitt 11.2).

Die Graphen sind das Resultat von mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen je Kombination. Sie wurden durch Anpassung an eine exponentielle Annäherungs-Kurve mit dem Programm Excel von Microsoft erzeugt. Die Standard-Abweichungen sind durch vertikale Fehlerbalken markiert (Abbildung 6.9).

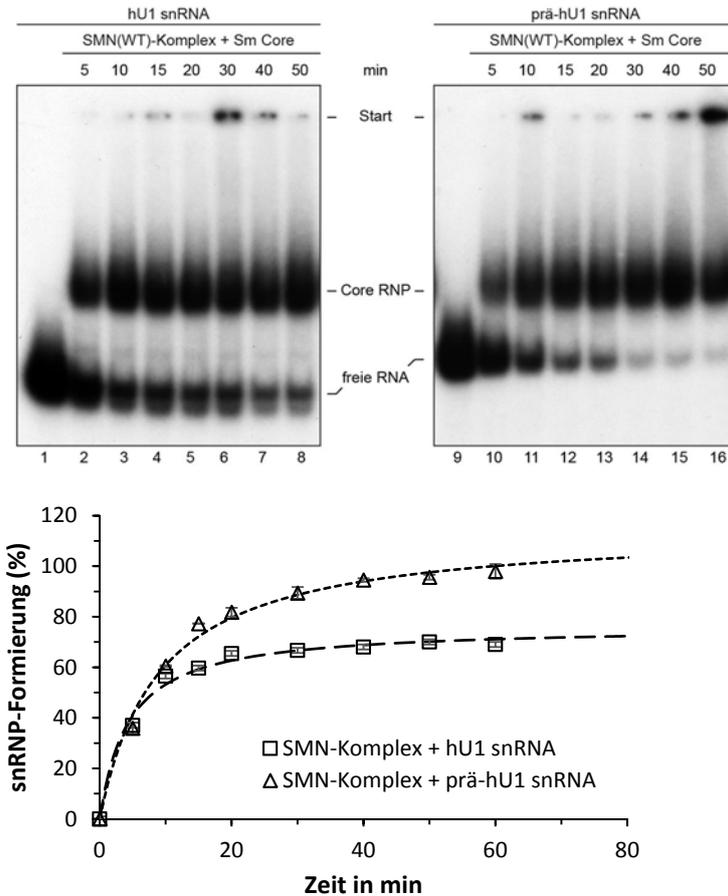


Abbildung 6.9: Der SMN-Komplex unterscheidet Vorläufer- von prozessierter RNA

Autoradiographie. Kinetische Betrachtung der snRNP-Formierung mit dem SMN-Gesamtkomplex in Gegenwart der humanen prä-U1 und reifen U1 snRNA. Graphische Darstellung der Zusammenlagerungsaktivität des SMN-Gesamtkomplexes. Densitometrische Messung der Banden mit dem Gel Doc™ XR+-System (Bio-Rad).

Das hier etablierte rekombinante System zur Rekonstitution des SMN-Komplexes ist neben der Bindung der Sm-Proteine und dem Ablösen des Chaperon pICln zudem im Stande die Sm-Proteine spezifisch, d.h. in Abhängigkeit der Sm-Bindungsstelle, auf die snRNA zu übertragen. Dabei ist die Bindung bzw. Rekrutierung der snRNA allein von den Sm-Proteinen abhängig und läuft in der Gegenwart der Vorläufer-snRNA (prä-snRNA) effizienter ab als mit der prozessierten, reifen RNA. Anhand dieser Ergebnisse scheint Gemin3-5 auch im rekombinanten System eine Bedeutung in der Erkennung von prä-snRNAs zuzukommen. Somit ist der hier rekonstituierte rekombinante Komplex mit dem endogenen SMN-Komplex vergleichbar.

6.3 Charakterisierung des SMN-Pentamers

Mit der Dissektion des SMN-Komplexes und der Wegnahme einzelner Komponenten sollte deren Bedeutung in der U snRNP-Biogenese weiter beleuchtet werden. Der rekombinante SMN-Komplex wurde als Erstes um Gemin3-5 reduziert (SMN-Pentamer) und durch die Zugabe (a) des 6S-Komplexes oder (b) des 6S-Komplexes zusammen mit pICln/D3-B auf die Verdrängung von pICln und die Sm-Bindeeigenschaft überprüft. Im Anschluss sollte dieser reduzierte Komplex auf seine Aktivität in der snRNP-Zusammenlagerung hin untersucht werden.

6.3.1 Sm-Protein-Transfer auf das SMN-Pentamer

Der SMN-Pentamer wurde wie unter Abschnitt 6.1.3 beschrieben aufgereinigt und für die Transfer-Reaktion eingesetzt. Dazu wurden 20 µg des Komplexes mit je 800 pmol 6S-Komplex bzw. 6S- zusammen mit pICln/D3-B-Komplex für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels 7B10-Antikörper immobilisiert an Protein G-Sepharose präzipitiert. Die Matrix wurde gewaschen und die gebundenen Proteine in einem denaturierenden SDS-PAA-Gel aufgetrennt und angefärbt.

Abbildung 6.10 zeigt das Gel mit dem präzipitierten SMN-Pentamer ohne Sm-Proteinbeladung in Spur 1. Nach Zugabe der pICln-Intermediate konnten die entsprechenden Sm-Proteine am SMN-Pentamer co-präzipitiert werden. Sowohl SmD1-D2/E-F-G als auch das gesamte Set der Sm-Proteine (SmD1-D2/E-F-G/D3-B) wurden vom Komplex gebunden (Abbildung 6.10, Spur 2 und 3). Bemerkenswerterweise ist der SMN-Pentamer, ähnlich dem Gesamtkomplex, zudem in der Lage das Chaperon pICln bei der Übernahme der Sm-Proteine aus den Intermediaten zu vertreiben. Dies wird deutlich in der Western-Blot-Analyse, in der kein verbliebenes pICln am SMN-Pentamer mehr detektiert werden konnte (Abbildung 6.10, Spur 2 und 3).

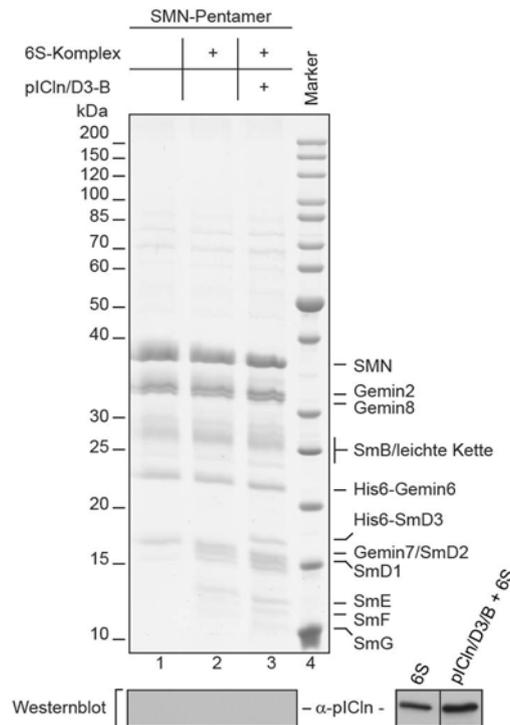


Abbildung 6.10: Das SMN-Pentamer bindet Sm-Proteine

Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. 20 µg SMN-Pentamer wurden mit je 800 pmol 6S-Komplex oder 6S- und pICln/D3-B-Komplex inkubiert und anschließend immunopräzipitiert (7B10-Antikörper an Protein G-Sepharose mit 2 mg/ml). Die gebundenen Proteine wurden in einem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und zum einen gefärbt, zum anderen auf eine PVDF-Membran geblottet und gegen pICln detektiert.

Diesen Ergebnissen zufolge haben Gemin3-5 keine essentielle Rolle in der Sm-Proteinbindung *in vitro*. Auch wirkt sich das Fehlen der Gemine 3-5 nicht inhibitorisch auf das Entlassen von pICln aus. Um die Rolle dieser Komponenten weiter zu untersuchen, sollte das SMN-Pentamer analog zum Gesamtkomplex in der snRNP-Zusammenlagerung getestet werden.

6.3.2 Analyse des SMN-Pentamers in der snRNP-Zusammenlagerung

Da der um die Gemine 3-5 reduzierte SMN-Pentamer bislang weder in der Stöchiometrie, im Sm-Protein-Transfer, noch im Verdrängen von pICln einen erkennbaren Unterschied zum Gesamtkomplex zeigte, sollte auch der finale Schritt der U snRNP-Biogenese, die Vereinigung von Sm Proteinen mit der snRNA zum snRNP Core, untersucht werden.

Analog zu den Zusammenlagerungsreaktionen mit dem Gesamtkomplex wurden auch hier die mit Sm Subcore- und Core-Proteinen rekonstituierten SMN-Pentamere mit radioaktiv-

die Vorläufer-RNA nur in Anwesenheit von Gemin3-5 einen besserer Reaktionspartner (Abbildung 6.9), so sollte das SMN-Pentamer keinen Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen unreifer und reifer RNA zeigen.

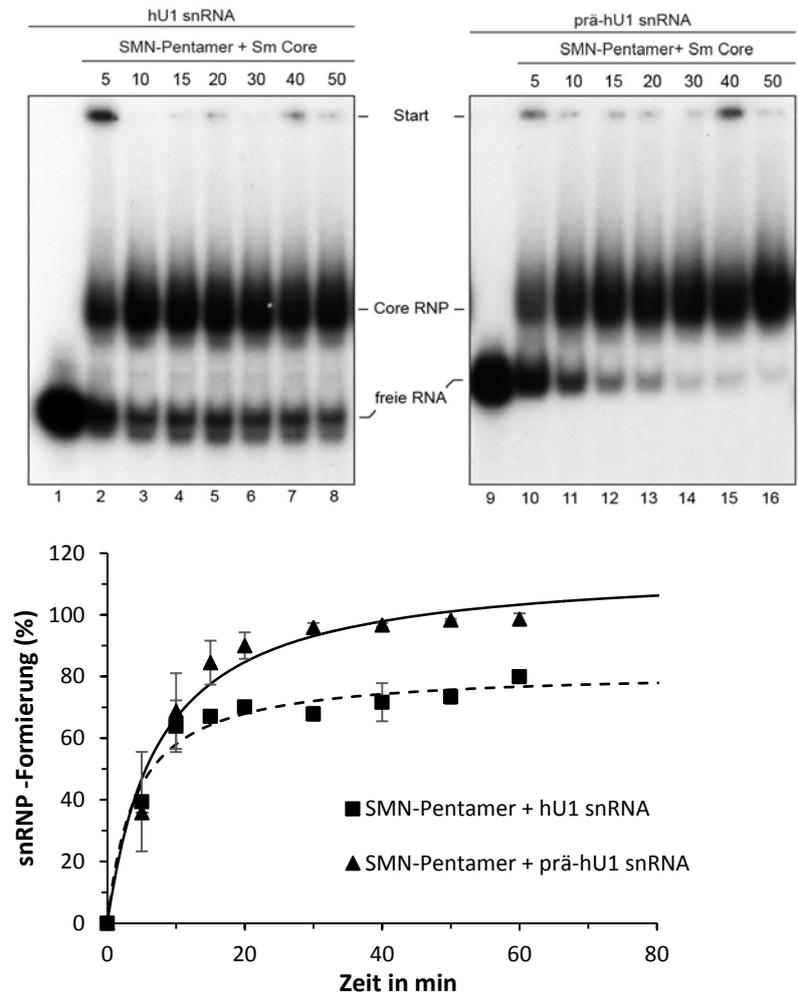


Abbildung 6.12: Das SMN-Pentamer unterscheidet wie der Gesamtkomplex zwischen prä-snRNA und reifer snRNA

Autoradiographie. a) Der SMN-Pentamer mit gebundenen Sm Core-Proteinen wurden mit der radioaktiv-markierten humanen prä-hU1 und reifen hU1 snRNA inkubiert. b) Graphische Darstellung der Zusammenlagerungsaktivität des SMN-Pentamers. Densitometrische Messung der Banden mit dem Gel Doc™ XR+-System (Bio-Rad).

Um diese Frage zu klären wurde der SMN-Pentamer mit gebundenen Sm Core-Proteinen mit der reifen und der prä-snRNA unter Zusammenlagerungsbedingungen inkubiert und die Ausbildung des Sm Cores zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Im Autoradiogramm

ist zu sehen, dass der SMN-Pentamer die Sm-Proteine auf beide snRNA-Varianten laden konnte (Abbildung 6.12).

Erstaunlicherweise traten jedoch auch beim SMN-Pentamer Unterschiede in der Kinetik der Zusammenlagerung zwischen dem Vorläufer und der reifen Version der U1 snRNA auf. So konnte nicht nur der Gesamtkomplex, sondern auch das Pentamer die Sm-Proteine effizienter auf die prä-snRNA laden als auf die reife Variante.

Die Umsatzgeschwindigkeit des Pentamers ist mit der des Gesamtkomplexes vergleichbar (siehe Abbildung 6.9). Deutlicher darzustellen war dies durch die Übertragung der zeitlich aufgelösten RNP-Bildung in ein Diagramm. Dafür wurden erneut die Quantifizierung mittels Densitometrie mit dem Gel DocTM XR+-System von Bio-Rad verwendet (Abbildung 6.12).

Durch die Reduktion des SMN-Gesamtkomplexes auf das SMN-Pentamer konnte also ein Minimalkomplex identifiziert werden, der ausreichend war, um die Sm-Bindung, das Verdrängen von pICln aus den Intermediaten 6S- und pICln/D3-B-Komplex und die snRNP-Zusammenlagerung zu bewerkstelligen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden im Folgenden funktionelle Studien ausschließlich mit dem Pentamer durchgeführt.

6.3.3 Die Subcore-Zusammenlagerung läuft weniger effizient ab

Wie bereits unter Abschnitt 6.3.2 beschrieben, erfolgt die Zusammenlagerungsreaktion in Gegenwart des SMN-Pentamers mit gebundenen Sm Subcore-Proteinen ineffizienter als mit dem Gesamtsatz an Sm-Proteinen. Die Thermodynamik und Kinetik der Subcore- und Core-Bildung wurde deswegen genauer untersucht und miteinander verglichen.

Hierzu wurden das SMN-Pentamer mit Sm Subcore- bzw. Core-Proteinen beladen. Steigende Mengen beider Komplexe wurden dann mit einer konstanten Menge an [³²P]-markierten U1 gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Core-RNP-Bildung wurde anschließend in einem nativen Gelsystem sichtbar gemacht. Bereits auf dem Röntgenfilm konnte man sehen, dass zur Formierung des Subcore eine höhere Konzentration des SMN-Komplexes vonnöten war (Abbildung 6.13, Spur 2 - 7). Um den Unterschied besser darstellen zu können, wurde mittels Densitometrie die RNP-Formierung quantifiziert und die Werte in ein Diagramm übertragen (DocTM XR+-System von Bio-Rad). Die Datenpunkte und Graphen wurden mit dem Programm *Solver* in Microsoft Office Excel aufbereitet. Bei dieser Art der Versuchsanordnung

musste eine Anpassung der bestimmten Werte an eine sigmoiden Kurve erfolgen, was mit folgender Formel (1) erreicht wurde. Anhand der densitometrisch bestimmten Bandenstärke konnte für beide Reaktionen die Konzentration bestimmt werden, bei der 50% an formierten snRNPs vorlagen.

$$f(x) = \frac{(\max - \min) * x^n}{(EC50^n + x^n)} \quad (1)$$

max	=	maximale RNP-Bildung = 100%
min	=	minimale RNP-Bildung = 0%
EC50	=	Konzentration des Proteins, bei der 50% snRNPs vorliegen (abhängig von V_{\max})
x	=	die jeweilige Konzentration des Proteins
n	=	Hill-Koeffizient

Mit der Gleichung (2) kann man die Dissoziationskonstante K_d aus den bekannten Konzentrationen der beteiligten Komponenten bei 50% RNP-Formierung berechnen.

$$K_d = [R] * [P] / [RP] \quad (2)$$

K_d	=	Dissoziationskonstante
[R]	=	Konzentration der RNA
[P]	=	Konzentration des Proteinkomplexes
[RP]	=	Konzentration des RNPs

$K_d = [P]$, wenn $[RP] = [R]$, also 50% der RNA als RNP vorliegt und $[P] \sim [P] + [RP]$, d.h. die Proteinkonzentration weit über der der RNA liegt (Setzer, D.R., 1999). Beide Voraussetzungen waren in dem vorliegenden Experiment gegeben und so konnte die K_d -Werte aus dem Graphen abgelesen werden. Für den Pentamer mit gebundenen Sm Core-Proteinen errechnete sich ein K_d von 0,126 μM , für den mit Sm Subcore-Proteinen ergab sich 0,166 μM (Abbildung 6.13). Dieser Befund spricht dafür, dass im Fall der gebundenen Sm Subcore-Proteine das Gleichgewicht mehr auf der Seite der freien Edukte (snRNA und Proteinkomplex) liegt als auf der Seite des RNP-Partikels.

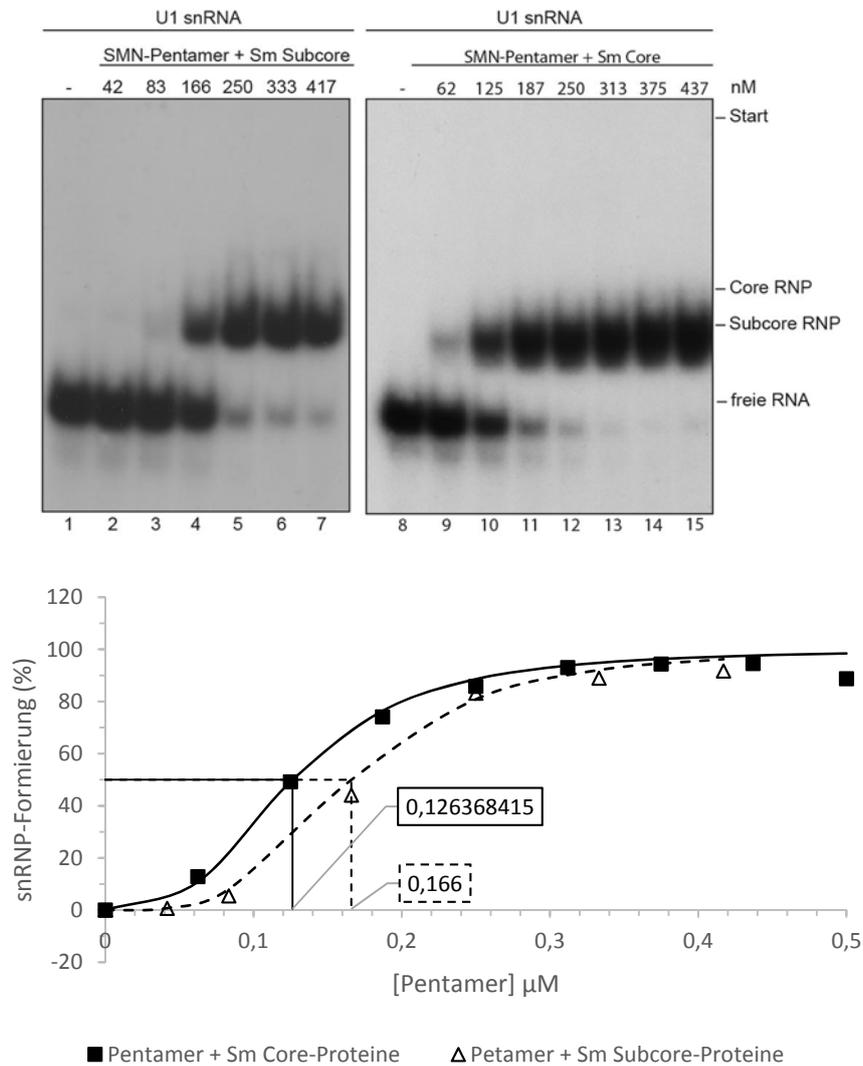


Abbildung 6.13: Das Sm Core-Partikel wird effizienter geformt

Autoradiogramm der formierten snRNPs. 0,05 bis 0,4 µM des mit Sm Subcore- oder Core-Proteinen beladene SMN-Pentamers wurden mit der U1 snRNA inkubiert (60°, 37 °C). Die formierten RNPs wurden mittels nativer PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht.

Zusätzlich zur thermodynamischen Betrachtung wurde die snRNP-Formierung dieser beiden rekonstituierten Komplexe über die Zeit gemessen.

Bei der Betrachtung der Zusammenlagerungskinetik ist zu erkennen, dass das SMN-Pentamer mit Sm Core-Proteinen nach etwa 10 Minuten 50% RNPs geformt hatte (Abbildung 6.14b, Spur 3 und 4). Der Komplex mit den Sm Subcore-Proteinen brauchte dagegen 20 Minuten um 50% RNPs zu bilden (Abbildung 6.14a, Spur 5). Zur Übertragung der Bandenintensitäten in ein Diagramm wurden die erhaltenen Werte wieder an eine exponentielle Annäherungs-Kurve angepasst.

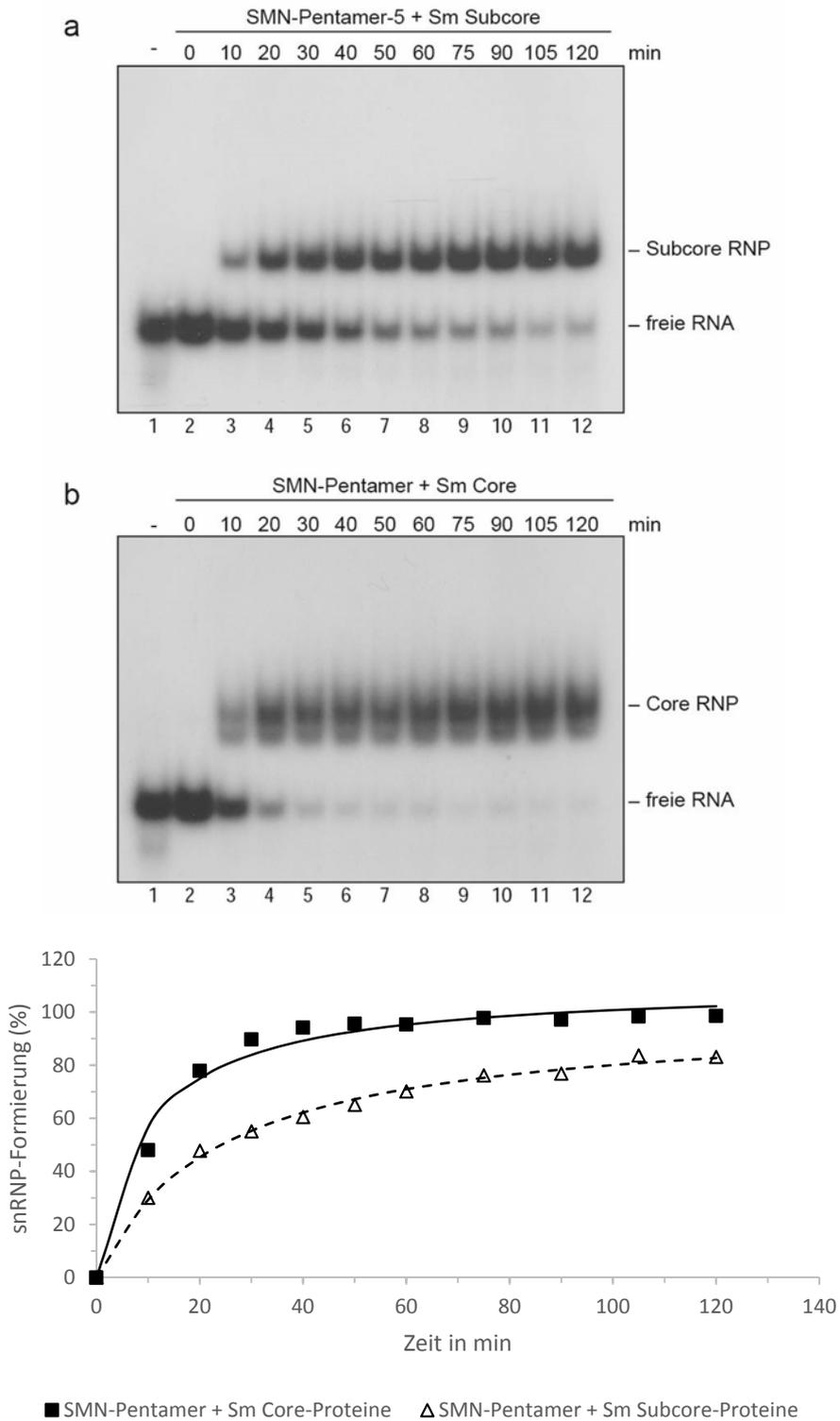


Abbildung 6.14: Die Sm Core-Zusammenlagerung läuft effizienter ab

Autoradiogramm der formierten snRNPs. Der Status der RNP-Zusammenlagerung wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten verfolgt (37 °C) und anschließend die geformten snRNPs nativ aufgetrennt.

6.3.4 Der SMN-Komplex wirkt als Spezifitätsfaktor bei der snRNP-Biogenese und verhindert eine Fehlzusammenlagerung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der endogene SMN-Komplex für die Spezifität der Zusammenlagerungsreaktion wichtig ist (Pellizzoni, L. *et al.*, 2002). Diese Genauigkeit erscheint aus theoretischer Betrachtung als eine Notwendigkeit, da der SMN-Komplex *in vivo* von einer Vielzahl an RNAs umgeben ist, von denen die meisten non-Target RNAs darstellen. Da die Erkennungssequenz der Sm-Proteine lediglich einen kurzen Bereich von U-Resten in der snRNA umfasst (Sm-Bindungsstelle), ist das erneute Auftreten dieser Sequenzen statistisch gesehen nicht unwahrscheinlich ($6,1 \times 10^{-5} \%$, $[1/4^n, n = 7]$). Der Erkennung der spezifischen „Target“-RNA kommt daher eine große Bedeutung in der U snRNP-Biogenese zu.

Im folgenden Satz an Experimenten sollte daher getestet werden, ob der rekombinante SMN-Komplex ebenfalls als Spezifitätsfaktor für die snRNP-Zusammenlagerung wirken kann. Dazu sollte überprüft werden, welche RNAs von den Sm Core-Proteinen alleine oder in Anwesenheit des SMN-Pentamers aus Gesamtzell-RNA präzipitiert werden. Die RNA wurde durch Trizol-Behandlung aus zytoplasmatischen HeLa-Zellextrakt präpariert. Die gewonnene RNA wurde zusätzlich mit aufgereinigten snRNAs supplementiert und mit [32 P]-pCp 3'-endmarkiert. Beide Proteinkomplexe (Sm Core-Proteine alleine oder zusammen mit dem SMN-Pentamer) wurden mit dem RNA-Mix für 1 Stunde bei 37 und 4 °C inkubiert und die gebildeten RNPs anschließend mit Y12-Antikörper präzipitiert (Y12 erkennt die di-methylierten Arginine in SmD1, D3 und B/B', jedoch auch die unmethylierten rekombinanten Varianten dieser drei Proteine). Nach Waschen der Matrix wurden die RNAs und die Proteine der RNPs mit Phenol separiert und die erhaltenen RNAs in einem denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt.

Wurden nur die Proteine des Sm Core alleine eingesetzt, konnte neben den snRNAs auch unspezifisch eine große Menge an tRNA co-präzipitiert werden, dies galt selbst für die Inkubation bei 4 °C (Abbildung 6.15, Spur 2 bzw. 4). In Gegenwart des SMN-Pentamers dagegen wurden bei 37 °C nur die snRNAs gebunden, während der Hintergrund stark reduziert war; wurde die Temperatur abgesenkt, so verlor der Komplex seine RNA-bindende Fähigkeit nahezu völlig (Abbildung 6.15, Spur 3 bzw. 5). Spur 6 zeigt die Negativkontrolle mit Y12-Antikörpern, der keine unspezifische Bindung an RNA aufwies.

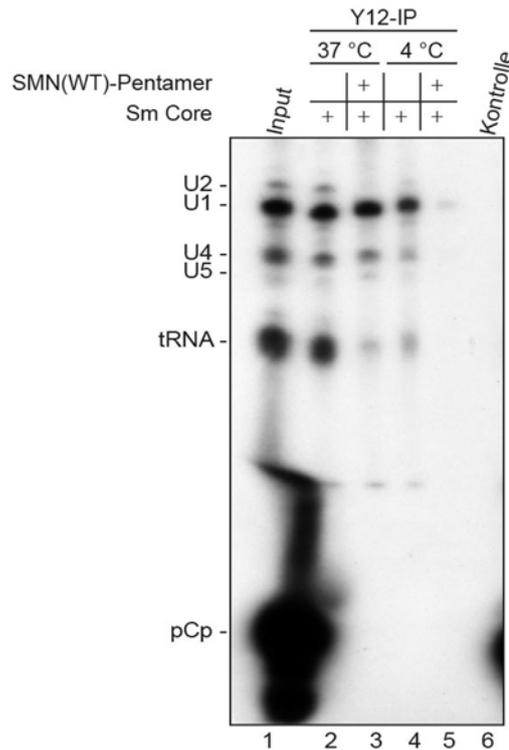


Abbildung 6.15: Das SMN-Pentamer erhöht die Spezifität bei der Rekrutierung von RNAs

Autoradiogramm der präzipitierten snRNPs. Sm Core-Proteine alleine oder gebunden an das SMN-Pentamer wurden mit Gesamtzell-RNA inkubiert und mit Y12-Antikörper präzipitiert. Die Auftrennung erfolgte in einem Harnstoff-Gel.

Aufgrund dieser Daten kann man daher schlussfolgern, dass das rekombinante SMN-Pentamer auch unter physiologischer Bedingungen spezifisch nur die RNAs für die Zusammenlagerung auswählt, die ein spezifisches Ziel für die Sm-Proteine darstellen (also eine Sm-Bindungsstelle aufweisen). Die Sm Core-Proteine alleine wiederum würden in einer un-assistierten Zusammenlagerung ohne SMN-Komplex eine Vielzahl an unspezifischen RNAs binden und damit eine Fehlzusammenlagerung und Aggregation bewirken.

6.3.5 Methylierung des Sm-Proteine hat keinen Einfluss auf die snRNP-Zusammenlagerung

Die vorangegangenen Experimente wurden mit rekombinanten Sm-Proteinen durchgeführt, die zuvor nicht durch den PRMT5-Komplex an Argininen symmetrisch di-methyliert wurden. Die Bedeutung dieser Modifikation für die RNP-Zusammenlagerung ist bislang völlig unklar, es gibt aber mehrere Studien, die zeigen, dass es durch Methylierung *in vitro* zu einer Erhöhung der Affinität der Sm-Proteine zum SMN-Komplex kommt (Meister, G. *et al.*, 2001). Es wurde

daher getestet, ob sich die Methylierung auf die Zusammenlagerungsreaktion auswirkt. Hierzu mussten methylierte Sm-Proteine aus isolierten endogenen snRNPs gewonnen werden. snRNPs (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Berthold Kastner vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) wurden auf die gewünschte Salzkonzentration eingestellt und mit DEAE-Zellulose erst auf Eis (15') und dann bei 37 °C (15') inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der erste Überstand abgenommen und auf Eis gelagert. Der Überstand aus einer zweiten Inkubation wurde mit dem ersten vereinigt, dialysiert (ÜN) und aufkonzentriert schockgefroren. Durch diese Behandlung sollten die Proteinbestandteile TP (*engl.*: total protein) der snRNPs von den snRNAs getrennt werden und im nativen Zustand vorliegen (Sumpter, V. *et al.*, 1992). Um dies zu überprüfen, wurden sowohl der Protein- als auch der RNA-Gehalt der gewonnenen Lösung mit dem von unbehandelten snRNPs verglichen (Abbildung 6.16a, Spur 1 und 3 bzw. 4 und 6). Bei den erhaltenen Proteinen (TPs) handelte es sich hauptsächlich um Sm-Proteine und individuelle Proteinkomponenten des U1 snRNP (z.B. U1A, U1C). Nach der Behandlung waren keine snRNAs mehr in der Proteinfraction zu erkennen. Der SMN-Pentamer wurden mit diesen methylierten Sm-Proteinen inkubiert und deren Assoziation mit der von unmethylierten, rekombinanten Sm-Proteinen verglichen.

Beide Varianten der Sm-Proteine wurden in gleicher Weise vom SMN-Pentamer als Bindungspartner akzeptiert. Dies zeigte, dass durch die Methylierung keine signifikante Affinitätserhöhung von Sm-Proteinen an den SMN-Komplex erzielt wurde (Abbildung 6.16a, Spur 10 und 11). Möglicherweise spielt die Methylierung aber in einem späteren Schritt der U snRNP-Biogenese eine wichtige Rolle. Deshalb wurde mit diesen rekonstituierten Komplexen (SMN-Pentamer mit methylierten oder rekombinanten Sm Core-Proteinen) zusätzlich die Zusammenlagerungsreaktion durchgeführt. Dazu wurden beide Varianten mit der α -[³²P]-markierten U1 snRNA inkubiert und die RNP-Formierung über die Zeit analysiert.

Bei der kinetischen Betrachtung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den endogenen und den rekombinanten Sm-Proteinen festgestellt werden (Abbildung 6.16b). So ist es für das hier vorliegende rekombinante System des SMN-Komplexes nicht erforderlich, dass die Sm-Proteine in methylierter Form vorliegen, um diese adäquat auf die snRNA übertragen zu können.

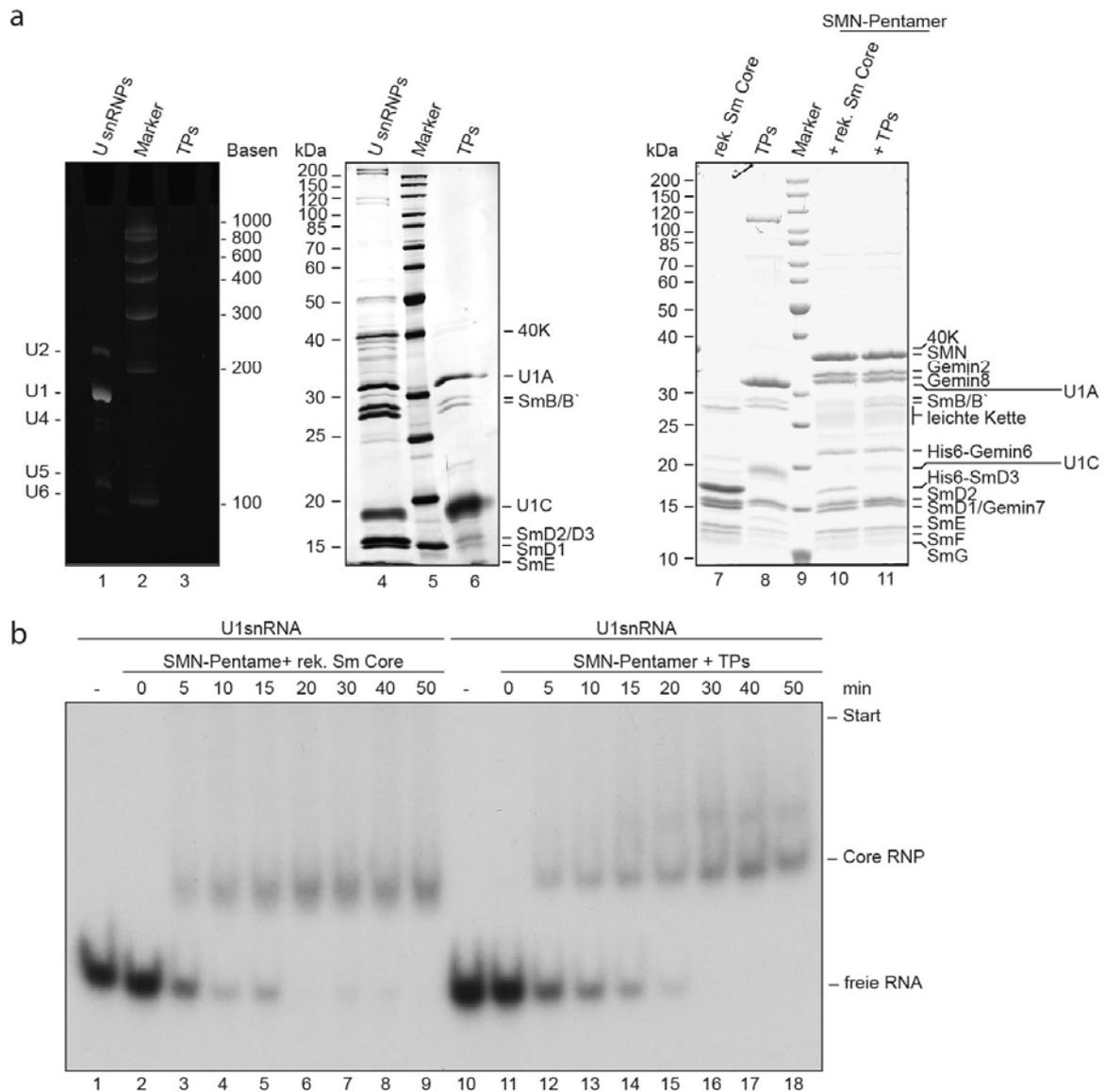


Abbildung 6.16: Das SMN-Pentamer unterscheidet nicht zwischen methylierten, endogenen und nicht-methylierten, rekombinanten Sm-Proteinen

a) Agarose- und SDS-Gel zur Präparation der TPs. Die RNA- und Proteinbestandteile von snRNPs können durch Behandlung mit DEAE-Sepharose voneinander getrennt werden. Beide Sm-Proteine, endogene und rekombinante, wurden an das SMN-Pentamer gebunden. b) Autoradiogramm der formierten snRNPs. Die rekonstituierten Komplexe wurden mit U1 snRNA inkubiert und in einem Nativ-RNA-Gel separiert.

Da die rekombinanten Sm-Proteine in gleicher Weise vom SMN-Pentamer gebunden und auf die snRNA übertragen werden konnten wie die endogenen methylierten, lag die Vermutung nahe, dass die Assoziation der Sm-Proteine nicht allein von deren Methylierungszustand abhängt. Um diese These weitergehend zu untersuchen, wurde mithilfe eines immobilisierten 7B10-Antikörper der endogene SMN-Komplex präzipitiert, der folglich mit methylierten Sm-Proteinen vorlag (Abbildung 6.17a, Spur 3). Anschließend wurde dieser mit einem Überschuss

eines 18 Aminosäure langen Peptids mit der Sequenz des C-terminalen Bereichs von SmD3 inkubiert, das unmethyliert oder 4x symmetrisch di-methyliert war. Sollte die Methylierung alleine für die Bindung der Sm-Proteine an den SMN-Komplex verantwortlich sein, so sollten durch den Überschuss methylierten SmD3-Peptids die endogenen Proteine verdrängt werden.

Weder bei Zugabe des unmethylierten noch des symmetrisch di-methylierten Peptids ließ sich bei steigender Konzentration ein Verdrängen der endogenen Sm-Proteine beobachten (Abbildung 6.17b, Spur 1 - 6 bzw. 7 - 12). Daraus ist zu schließen, dass die Assoziation der Sm-Proteine nicht allein auf deren Methylierungszustand beruht.

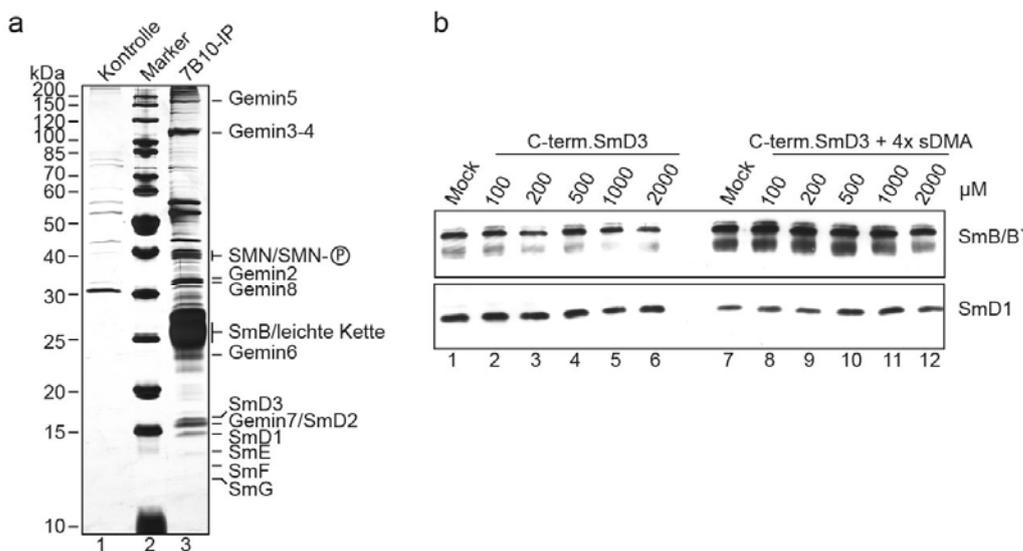


Abbildung 6.17: Die Sm-Proteinbindung ist nicht allein an deren Methylierung gekoppelt

a) Der endogene SMN-Komplex wurde mit dem 7B10-Antikörper aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt immunopräzipitiert. Die Matrix wurden gewaschen und die gebundenen Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt. b) Western Blot-Analyse der endogenen Sm-Proteine SmB/B' und D1 nach Inkubation mit methylierten oder un-methylierten SmD3 C-Terminus. sDMA = symmetrisches Di-Methylarginin.

6.4 Untersuchung der pathogenen SMN-Mutation E134K in der RNP-Zusammenlagerung

Die Etablierung eines rekombinanten Systems für die Zusammenlagerung der U snRNPs ermöglichte es erstmals, humanpathogene Mutanten von SMN in ihrer Aktivität zu testen. Von besonderem Interesse waren in diesem Zusammenhang Missense-Mutationen im SMN Protein, die neben den Deletionen zu den häufigsten Ursachen der SMA zählen.

Missense-Mutationen treten über die gesamte Länge des SMN-Proteins auf, vermehrt jedoch in Exon 3 und 6 (Abbildung 6.18). Exon 6 codiert für eine YG-Box, eine hochkonservierte Domäne mit Wiederholungen von Thyrosinen und Glycinen, die u.a. für die Selbstassoziation von SMN verantwortlich ist (Talbot, K. *et al.*, 1997; Hahnen, E. *et al.*, 1997). Exon 3 codiert für die Tudor-Domäne, die als Plattform für die Bindung der Sm-Proteine dient.

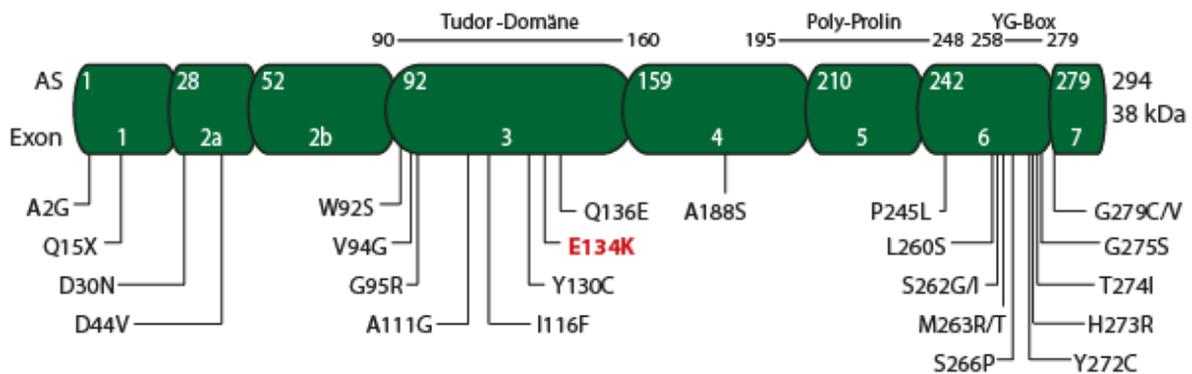


Abbildung 6.18: Übersicht über SMA-relevante Punktmutationen

SMA-Mutationen sind über das gesamte SMN-Protein verteilt zu finden. Vermehrt treten sie aber in der YG-Box auf. Die untersuchte Mutation SMN(E134K) liegt in der Tudor-Domäne und verursacht SMA Typ I (nach Burghes, A.H. and Beattie, C.E., 2009; Sun, Y. *et al.*, 2005).

Analog zu den Untersuchungen am rekombinanten Wildtyp-Komplex wurden daher im Folgenden zuerst SMN-(Teil)Komplexe hergestellt, die die SMN(E134K)-Variante enthielten. Diese Komplexe sollten dann analog zum Wildtyp-Komplex funktionell in den einzelnen Schritten der U snRNP-Biogenese untersucht werden, um ggf. Hinweise auf den Pathomechanismus der Krankheit zu erhalten.

6.4.1 Aufbau des mutierten SMN-Komplexes

Um die Missensemutation SMN(E134K) in die wildtypische SMN-Sequenz einzuführen, wurden zwei Primer konstruiert, die das entsprechende Triplet im Zuge einer ortsspezifischen Mutagenese von Glutaminsäure zu Lysin austauschten. Die veränderte Sequenz wurde analog zum Wildtyp als ein tricistronisches Konstrukt mit Gemin2 und 8 in pET28b' kloniert. Die Expression des SMN(E134K)-Pentamers wurde entsprechend zum wildtypischen Komplex durchgeführt (siehe Abschnitt 5.2.5.3 und 6.1.3). Durch die Zugabe von Gemin3-5 sollte der Pentamer anschließend zum Gesamtkomplex aufgebaut werden.

pET28b' mit der cDNA für SMN(E134K)/Gemin2/Gemin8 und pET21a (kodiert für Gemin6/Gemin7) wurden in *E. coli* BL21 Star co-transformiert und exprimiert. Aus dem Bakterienlysat wurde das SMN(E134K)-Pentamer zunächst über das GST-SMN-Fusionsprotein affinitätsgereinigt und mit der TEV-Protease geschnitten. Da alle Gemine des SMN(E134K)-Pentamers mit SMN mittels 7B10-Antikörper co-präzipitiert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um einen intakten Proteinkomplex handelt, in dem eine stöchiometrische Verteilung aller Proteine vorherrscht (Abbildung 6.19a, Spur 3). Das abweichende Migrationsverhalten des SMN(E134K)-Proteins wurde bereits früher in der Literatur beschrieben (Sanchez, G. *et al.*, 2013).

Um zu überprüfen, ob der SMN(E134K)-Pentamer ähnlich wie der wildtypische Komplex Multimere ausbildet, wurde auch dieser nach Rekonstitution durch eine Gelfiltrations-Chromatographie untersucht (Superose 6 10/300 GL). Ein Vergleich der Elutionsprofile der Gelfiltrationen vom SMN(E134K)- und wildtypischen Pentamer zeigte nahezu identische Elutionswerte (ca. 12 ml, entspricht etwa 700 kDa) (Abbildung 6.19b). Aus diesen Studien ließ sich daher ableiten, dass das SMN(E134K)-Pentamer ähnlich wie der Wildtyp einen Zusammenschluss von fünf bis sechs Einheiten bildet.

Durch Kombination des SMN(E134K)-Pentamer mit den Geminen 3-5 sollte der gesamte SMN-Komplex rekonstituiert werden. Zuerst wurde das aufgereinigte SMN(E134K)-Pentamer an eine Matrix immobilisiert (Protein G-Sepharose, gekoppelt mit 2 mg/ml 7B10-Antikörper) und anschließend mit dem gereinigten Gemin3-5 inkubiert. Nach Waschen der Säule konnte die Totalrekonstitution des SMN-Komplexes auf einem Gradienten-Gel (12 - 16%) verfolgt werden. In der Coomassie-Färbung sieht man, dass das SMN(E134K)-Pentamer, vergleichbar mit dem Wildtyp-Pentamer, fähig war, die drei großen Gemine 3-5 stöchiometrisch zu binden und in den bestehenden Komplex zu integrieren (Abbildung 6.19c, vergleiche Spur 1 und 3).

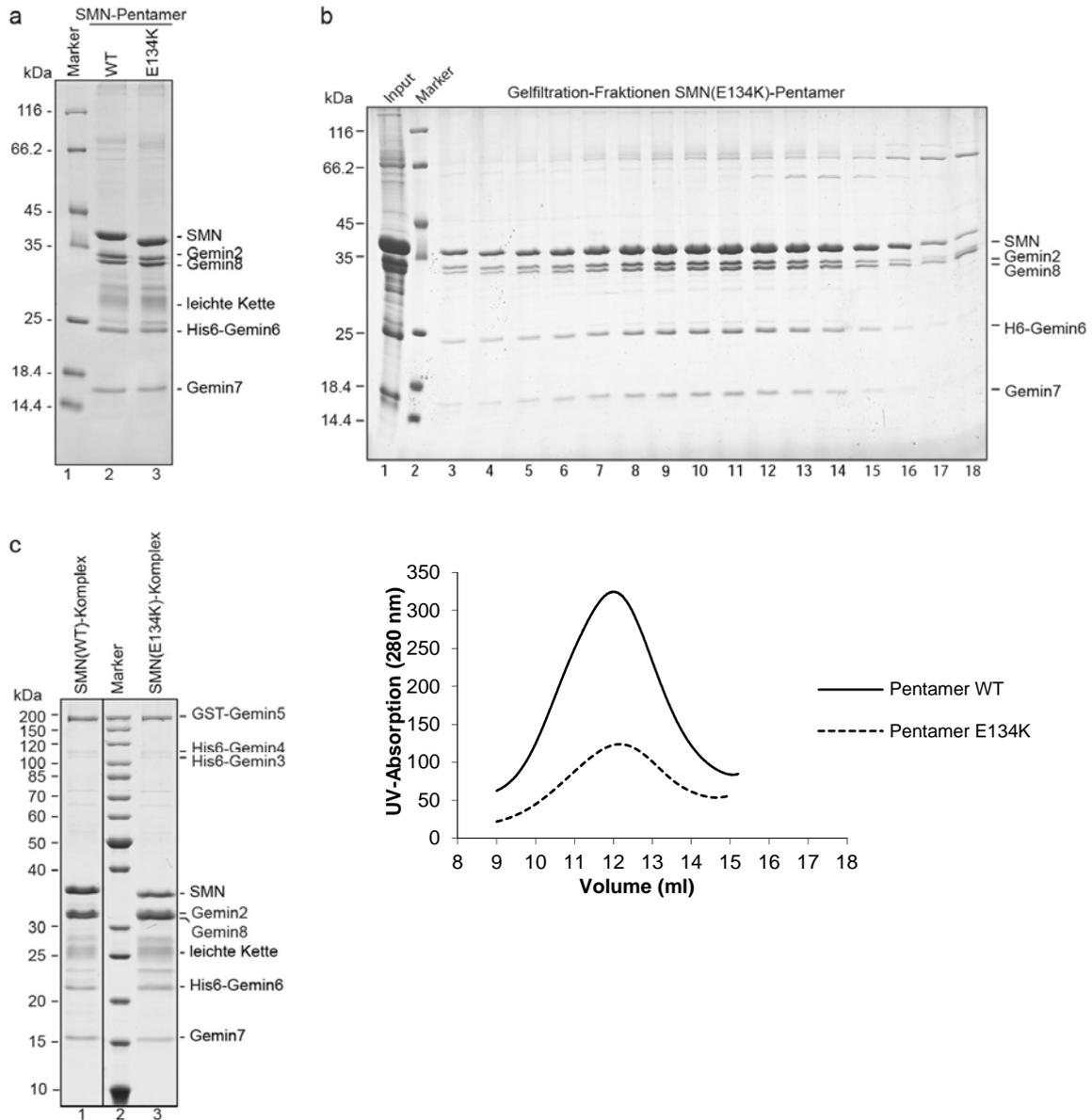


Abbildung 6.19: Der Aufbau des SMN(E134K)-Pentamers unterscheidet sich nicht vom wildtypischen Komplex

Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. a) Immunopräzipitation des über Glutathion-Sepharose gereinigten SMN(WT)- und SMN(E134K)-Komplexes. b) Elutionsprofil des SMN(E134K)-Pentamers auf einer Gelfiltrationssäule (Superose 6 10/300 GL). c) Totalrekonstitution des SMN(E134K)-Komplexes analog zum Wildtyp. Der immunopräzipitierte Pentamer wurde mit dem gereinigten Gemin3-5 ÜN bei 4 °C inkubiert und die rekonstituierten Komplexe nach Waschen der Matrix in einer SDS-PAGE aufgetrennt und angefärbt.

Somit kann festgehalten werden, dass weder Defekte in der Stöchiometrie noch die Fähigkeit zur Oligomerisierung die biochemische Grundlage für die Pathogenität der E134K-Mutation in SMN sein kann.

6.4.2 Analyse des Sm-Protein-Transfers des SMN(E134K)Komplexes

Als Nächstes sollte getestet werden, ob der SMN(E134K)-Komplex einen Defekt in der Sm-Proteinbindung bzw. beim Transfer der Sm-Proteine von den pICln-Intermediaten aufweist. Dies schien wahrscheinlich, da bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass die E134K-Substitution eine adäquate Bindung der Sm-Proteine an SMN verhindert (Buhler, D. *et al.*, 1999). Um den Komplex auf diesen möglichen Fehler hin zu überprüfen, wurden dem SMN(E134K)-Komplex und -Pentamer die beiden pICln-Intermediate 6S und pICln/D3-B angeboten. SMN(E134K) ist wie der wildtypische Komplex in der Lage die Sm-Proteine zu binden (Abbildung 6.20, Spuren 2 und 3). Auch konnte der SMN(E134K)-Komplex pICln verdrängen, wie durch eine Westernblot-Analyse nachgewiesen wurde (Abbildung 6.20, Spuren 2 und 3). Ein qualitativ und quantitativ sehr ähnliches Ergebnis wurde auch für das rekonstituierte SMN(E134K)-Pentamer erhalten (Abbildung 6.20, Spuren 6 und 7).

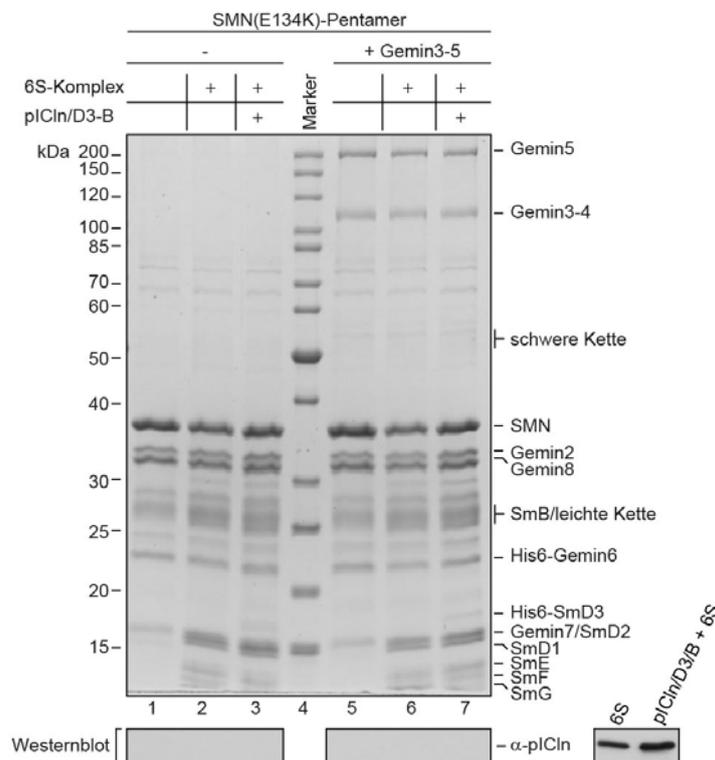


Abbildung 6.20: Das SMN(E134K)-Pentamer kann rekombinante Sm-Proteine binden

Das SMN(E134K)Pentamer wurden mit dem 6S- bzw. pICln/D3-B- Komplex bei 37 °C inkubiert, anschließend immunopräzipitiert (7B10) und die Matrix gewaschen. Die immobilisierten Proteine wurden in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt. In der Westernblot-Analyse wurde gegen pICln detektiert. Analog wurde mit dem Gesamtkomplex vorgegangen.

Abweichend von älteren Befunden, die SMN(E134K) als eine Sm-Bindungsmutante beschrieben haben (Buhler, D. *et al.*, 1999; Selenko, P. *et al.*, 2001), konnte dieser Effekt in dem vorliegenden rekombinanten System nicht bestätigt werden. Ein Defekt, der im Patienten zur SMA führt, muss demnach in einem anderen, späteren Schritt in der U snRNP-Biogenese zu finden sein.

6.4.3 Die Mutante SMN(E134K) zeigt Defizite in der snRNP-Zusammenlagerung

Der nächste Schritt in der Biogenese von U snRNPs ist der Transfer der Sm-Proteine auf die snRNA. Nachdem der rekombinante SMN(E134K)-Komplex vergleichbar zum Wildtyp mit den Sm-Proteinen beladen werden konnte, wurden daher anschließend überprüft, ob die Übertragung der gebundenen Sm-Proteine vom SMN-Komplex auf eine snRNA erfolgen kann.

Beide SMN(E134K)-Komplexvarianten (Gesamtkomplex und Pentamer) wurden hierfür wie oben beschrieben rekonstituiert und im *in vitro* Zusammenlagerungssystem untersucht. Hierzu wurden die Komplexe mit radioaktiver U1 bzw. U1 Δ Sm snRNA inkubiert (Abbildung 6.21a). Die Komplexbildung wurde in der nativen Gelelektrophorese untersucht und ergab folgendes Bild: War der SMN(E134K)-Komplex (Gesamtkomplex oder Pentamer) an der Zusammenlagerung beteiligt, so kam es zu einer im Vergleich zum Wildtyp verringerten RNP-Formierung. Vergleicht man z.B. die beiden Pentamere mit gebundenen Sm Core-Proteinen, so war der SMN(E134K)-Pentamer nicht in der Lage die komplette RNA mit Sm-Proteinen zu beladen und RNPs zu formen (Abbildung 6.21b, vergleiche Spur 3 und 7). Ein ähnliches Bild ergab sich in Gegenwart des SMN(E134K)-Gesamtkomplexes; hier war die Aktivität mit der des Wildtyps vergleichbar, der mit gebundenen Sm Subcore-Proteinen beladen worden war (Abbildung 6.21b, vergleiche Spuren 10 mit 13 und 9 mit 13). Ein noch deutlicherer Effekt war bei den SMN(E134K)-Ansätzen zu sehen, die nur die Sm Subcore-Proteine gebunden hatten. Konnte der SMN(E134K)-Pentamer dieser Konstellation über 60 Minuten ca. 50% an RNPs bilden, ging die Zusammenlagerungsaktivität beim analog behandelten Gesamtkomplex fast vollständig verloren (Abbildung 6.21b, Spuren 6 bzw. 13).

Unabhängig von der verminderten Zusammenlagerungsaktivität bleibt dagegen die Spezifität auch bei den SMN(E134K)-Komplexen erhalten, da bei Inkubation der Komplexe mit der U1 Δ Sm snRNA keine unspezifische RNP-Formierung zu erkennen war (Abbildung 6.21c).

Der Defekt beim SMN(E134K)-Komplex mit gebundenen Sm Subcore-Proteinen war deutlich zu erkennen, während dies in Gegenwart der Sm Core-Proteinen weniger klar war. Um zu überprüfen, ob auch in dieser Konstellation tatsächlich eine verminderte Zusammenlagerungsaktivität vorlag, wurden der SMN(E134K)- und der WT-Komplex hinsichtlich der Zusammenlagerung genauer untersucht, indem sie einer thermodynamischen Betrachtung unterzogen wurden. Erneut wurden diese beiden Komplexe zu einer radioaktiv-markierten U1 snRNA titriert. Nach nativer Auftrennung der formierten RNPs in einem PAA-Gel wurde dieses gegen einen Röntgenfilm exponiert.

In Abbildung 6.22 ist in der Autoradiographie links die Zusammenlagerungsreaktion des Wildtyps, rechts die der Mutante zu sehen. Beide Komplexe konnten RNPs formieren, in Gegenwart des SMN(E134K)-Komplexes allerdings war die RNP-Zusammenlagerung beeinträchtigt. Um dieser Effekt besser darstellen zu können, wurde erneut mittels Densitometrie die RNP-Formierung gemessen und die erhaltenen Werte in ein Diagramm übertragen (DocTM XR+-System von Bio-Rad). Die Datenpunkte und Graphen wurden erneut mit dem Programm *Solver* in Microsoft Office Excel aufbereitet (Formel (1) in Abschnitt 6.3.3). Anhand der angepassten Kurven wurde der Defekt des SMN(E134K)-Komplexes gegenüber dem Wildtyp deutlich (Abbildung 6.22). Aus dem resultierten Graphen konnte ein K_d -Wert von $0,224 \mu\text{M}$ für das SMN(E134K)-Pentamer ermittelt werden. Verglichen mit dem Wildtyp im analogen Ansatz ($K_d = 0,126$) zeigt die Mutante einen erhöhten Wert, d.h. das Gleichgewicht liegt in Gegenwart des SMN(E134K)-Pentamers mehr auf der Seite der freien Edukte snRNA und Proteinkomplex als auf der Seite des geformten RNPs.

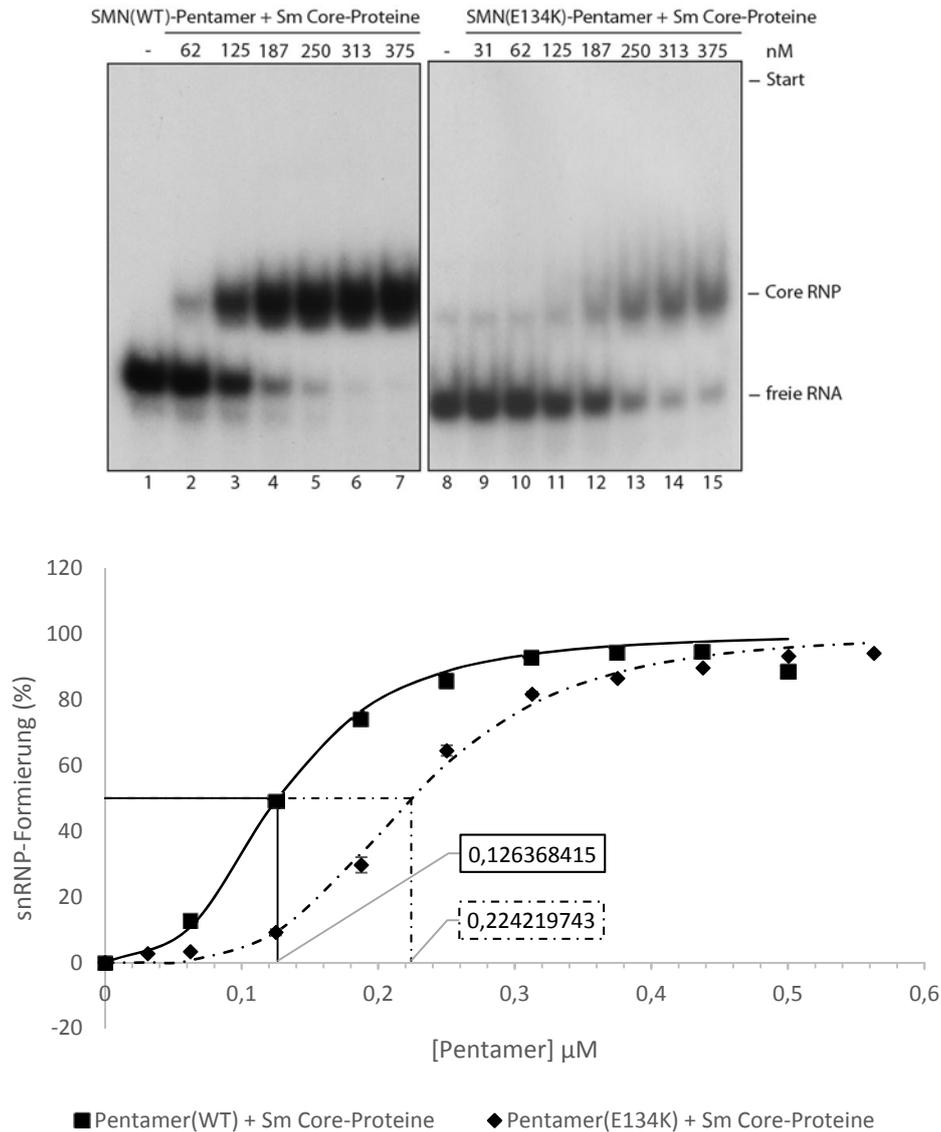


Abbildung 6.22: SMN(E134K) zeigt in der RNP-Zusammenlagerung ein verschobenes Gleichgewicht

Autoradiogramm des Vergleichs zwischen SMN(WT)- und SMN(E134K)-Gesamtkomplex in der RNP-Zusammenlagerung. Die Komplexe wurden in steigender Konzentration zur U1 snRNA titriert, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die geformten RNPs nativ in einem Gel aufgetrennt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Defekt der SMN(E134K)-Mutation erst im letzten Schritt der U snRNP-Biogenese zu finden ist. Die Mutante zeigte eine verlangsamte Zusammenlagerungsaktivität, die in einem verschobenen Reaktionsgleichgewicht begründet ist.

7 Diskussion

U snRNPs leisten als Bestandteile des Spleißosoms einen wichtigen Beitrag zur Übersetzung des genetischen Codes in Proteine. Das Spleißosom ist dafür verantwortlich die nicht-kodierenden Introns aus der prä-mRNA auszuschneiden und die kodierenden Abschnitte zusammenzufügen. Erst wenn dieser Schritt erfolgte entsteht auf der mRNA ein offenes Leseraster, welches vom Ribosom in ein funktionales Protein translatiert werden kann. Bevor sich die snRNPs zum Spleißosom zusammenlagern und die Spleißreaktion katalysieren können, müssen sie aus den Einzelbausteinen, d.h. den snRNAs, spezifischen Proteinen und Sm-Proteinen zusammengebaut werden. Für diesen snRNP-Zusammenlagerungsschritt sind zwei makromolekulare Maschinen zuständig - der PRMT5-Komplex und der SMN-Komplex. Während der erste die Sm-Proteine methyliert und in Intermediate zwingt, die das Chaperon pICln enthalten, löst der SMN-Komplex diese Zwischenstufen wieder auf und überträgt die Sm-Proteine auf die snRNAs. Ein zentraler Bestandteil ist das namensgebende Protein SMN, das in Kooperation mit als „Gemine“ bezeichneten Faktoren diese Aufgabe bewältigt. Mutationen bzw. Deletionen im *SMN*-Gen führen zur neuromuskulären Krankheit Spinale Muskelatrophie (SMA), weshalb die Analyse des SMN-Proteins auch aus medizinischer Sicht von großer Bedeutung ist.

7.1 Rekonstitution des SMN-Komplexes

In der vorliegenden Arbeit wurde ein biochemisches Protokoll etabliert, welches es erlaubte den SMN-Komplex aus rekombinanten Quellen *in vitro* zu rekonstituieren und damit einer detaillierten Struktur- und Funktionsanalyse zugänglich zu machen. Zwar konnten in der Vergangenheit einzelne Proteine oder Subkomplexe des SMN-Komplexes, wie z.B. die Gemin6/Gemin7 und SMN/Gemin2 Dimere (Ma, Y. *et al.*, 2005; Takaku, M. *et al.*, 2011) oder ein fünfteiliger Komplex bestehend aus SMN, Gemin2 und Gemin6-8 (Chari, A. *et al.*, 2008), rekombinant hergestellt werden, die vollständige Rekonstitution des SMN-Komplexes und seiner Subkomplexe in präparativen Mengen blieb allerdings erfolglos. Die Rekonstitution wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird, gelang durch die separate Expression von Teilmodulen des SMN-Komplexes. Diese Teilmodule ließen sich aufgrund einer kürzlich erstellten detaillierten Interaktionskarte definieren (Otter, S. *et al.*, 2007). Ausgehend von dieser Karte und Erfahrungswerten aus zuvor durchgeführten Expressionen wurde der SMN-Komplex in drei Teilkomplexe unterteilt. Das war zum einen der Komplex aus SMN, Gemin2 und Gemin8

(als SMN-Trimer bezeichnet), der aufgrund der Interaktionskarte das zentrale Rückgrat des Gesamtkomplexes bildet. Zum anderen ließ sich ein Dimer aus Gemin6 und Gemin7 definieren, welches auch bereits von Ma *et al.* exprimiert und strukturell untersucht wurde (Ma, Y. *et al.*, 2005). Beide Komplexe ließen sich in großen Mengen in bakteriellen Expressionsstämmen produzieren und über Affinitätschromatographische Strategien zur Homogenität reinigen (Abbildung 6.2). Das dritte und gleichzeitig technologisch anspruchsvollste Modul setzte sich aus Gemin3, Gemin4 und Gemin5 zusammen. Diese Proteine weisen allesamt eine Größe von über 100 kDa auf, was eine native Expression und Reinigung aus Bakterien problematisch machte. Als Alternative wurde daher das Baculovirus-System für Insektenzellen gewählt. Durch den Einsatz eines eukaryontischen Expressionssystems können auch große Proteine in der korrekten Tertiärstruktur exprimiert werden. Darüber hinaus finden in einem eukaryontischen Expressionssystem viele post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Glykosylierung statt (Fernandez, J.M. and Hoeffler, J.P., 1999). Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung, da bekannt ist, dass die Zusammenlagerungsmaschinerie der U snRNPs hochgradig modifiziert wird. So werden sieben der neun Komponenten des SMN-Komplexes (einschließlich SMN) zum Teil mehrfach phosphoryliert (Grimmler, M. *et al.*, 2005; Husedzinovic, A. *et al.*, 2014).

Mit der Verfügbarkeit der drei Untereinheiten des SMN-Komplexes war die technische Voraussetzung für die Rekonstitution geschaffen. Durch die Inkubation stöchiometrischer Mengen aller drei Untereinheiten unter definierten Bedingungen konnte erstmals ein kompletter SMN-Komplex generiert werden, in dem alle Proteine enthalten waren (Abbildung 6.5). Nach der Etablierung dieses rekombinanten Systems stand nun die Möglichkeit offen, den rekonstituierten SMN-Komplex in den einzelnen Schritten der U snRNP-Biogenese biochemisch zu untersuchen.

7.2 Charakterisierung des rekombinanten SMN-Komplexes

Der rekonstituierte SMN-Komplex enthielt alle neun Proteinkomponenten in stöchiometrischen Mengen und war daher dem endogenen Komplex bezüglich der Zusammensetzung sehr ähnlich. Besonders wichtig war es aber auch festzustellen, ob der rekombinante Komplex funktionell aktiv war und ähnlich dem endogenen Komplex reagierte. Um dies abzuklären, wurden drei wichtige Aspekte der U snRNP-Biogenese mit dem rekombinanten Komplex *in vitro* rekapituliert. Bei diesen biochemischen Studien konnte Folgendes festgestellt werden:

- 1) Der rekombinante SMN-Komplex war in der Lage, Sm-Proteine in Form von spezifischen Heterooligomeren zu binden. Diese Heterooligomere werden durch den PRMT5-Komplex gebildet und als pICln-Intermediate in Form von 6S- und pICln/D3-B-Komplexen übergeben (Abbildung 6.6).
- 2) Darüber hinaus verdrängt der SMN-Komplex bei der Übernahme der Sm-Proteine das Chaperon pICln (Abbildung 6.6). Diese Beobachtung ist konsistent mit Daten zum endogenen Komplex, die zeigten, dass weder pICln noch der PRMT5-Komplex an der späten Phase der U snRNP teilnimmt.
- 3) Schließlich wurde der Nachweis geführt, dass der Transfer der an den SMN-Komplex gebundenen Sm-Proteine nur auf die Sm-Bindungsstelle der U1 snRNA möglich ist. Diese Reaktion wird in Abhängigkeit der Sm-Bindungsstelle spezifisch vom rekombinanten SMN-Komplex katalysiert (Abbildung 6.7).

Bezüglich dieser Aktivitäten ist demnach der rekombinante Komplex nicht vom endogenen SMN-Komplex zu unterscheiden. Zwar fehlt dem hier rekonstituierten Komplex das Protein unrip; dieser Umstand scheint aber keinen negativen Effekt auf den Aufbau und die Funktion auszuüben. Des Weiteren ist auffällig, dass der rekombinante SMN-Komplex, ähnlich wie der isolierte endogene Komplex, seine Aufgaben ohne die Zugabe von Energie in Form von ATP bewerkstelligen konnte. Im zellulären Extrakt ist hingegen metabolische Energie notwendig (Meister, G. *et al.*, 2001). Der Grund für diese Unterschiede ist gegenwärtig unklar, sollte sich aber durch Komplementationsstudien in weiterführenden Experimenten untersuchen lassen.

Ein weiterer Unterschied zum endogenen Komplex ist die fehlende post-translationale Modifikation des Kernbereichs des Komplexes (SMN-Pentamer). Da dieser in Bakterien hergestellt wurde, fehlen ihm vermutlich sämtliche post-translationale Modifikationen, einschließlich der Phosphorylierungen (Grimmler, M. *et al.*, 2005; Husedzinovic, A. *et al.*, 2014). Offensichtlich haben diese Modifikationen aber keinen messbaren Effekt auf die *in vitro* getesteten Aktivitäten und wurden daher im Rahmen dieser Studie nicht weiter verfolgt.

7.3 Die Rolle individueller Komponenten des SMN-Komplexes bei der U snRNP-Biogenese

Mit der Etablierung eines verlässlichen Systems zur Rekonstitution eines funktionalen SMN-Komplexes, stand nun die Möglichkeit offen, einzelne Subkomplexe und Proteine auf deren Aufgabe innerhalb des Komplexes zu untersuchen.

Über die letzten Jahre hinweg wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass die Reduzierung von SMN, Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin6 oder pICln mittels RNA-Interferenz die Aktivität einer Zelle in der Zusammenlagerung von U snRNPs um bis zu 70% reduziert (Shpargel, K.B. and Matera, A.G., 2005; Winkler, C. *et al.*, 2005; Feng, W. *et al.*, 2005).

Ein Faktor, dessen Knockdown keinen negativen Einfluss auf die Zusammenlagerungsaktivität ausübt, ist Gemin5 (Shpargel, K.B. and Matera, A.G., 2005). Trotz dieses Befundes zeigen neuere Daten, dass dieser Bestandteil des SMN-Komplexes maßgeblich an der Bindung der snRNA beteiligt ist (Lau, C.K. *et al.*, 2009). Zudem konnte Gemin5 erst kürzlich für die Erkennung von prä-snRNAs verantwortlich gemacht werden (Yong, J. *et al.*, 2010). Gemin5 ist mit 169 kDa Molekulargewicht das größte Protein im SMN-Komplex, weist 13 WD-Wiederholungen am Amino-Terminus und ein *coiled-coil*-Motiv in der Nähe des C-Terminus auf (Gubitzi, A.K. *et al.*, 2002). Strukturvorhersagen beschreiben die WD-Wiederholungen als zwei propellerartige β -Faltblätter, die notwendig und hinreichend für die Erkennung der snRNA sind (Lau, C.K. *et al.*, 2009). Neuere Daten sprechen dem C-Terminus von Gemin5 zwei weitere nicht-canonische RNA-bindende Domänen zu, die IRES-Elemente erkennen (Fernandez-Chamorro, J. *et al.*, 2014). Ob diese Motive bei der Erkennung von snRNAs ebenfalls eine Rolle spielen, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die Bedeutung der einzelnen Komponenten des SMN-Komplexes bei der snRNP Biogenese wurde zunächst durch die Analyse von Teilkomplexen, denen individuelle Einheiten fehlen, untersucht (diese Arbeit; Chari, A. *et al.*, 2008). Hier war die Untersuchung des pentameren Komplexes, welchem die Gemine 3-5 fehlen, besonders aufschlussreich (siehe Abschnitt 6.3). Dieser Komplex war bezüglich aller Aspekte der *in vitro*-Zusammenlagerung nicht vom Gesamtkomplex zu unterscheiden. So vermittelte er nicht nur mit vergleichbarer Effizienz die Subcore bzw. Core-Formierung (Abbildung 6.11), sondern war auch als Spezifitätsfaktor ausreichend (Abbildung 6.15). Letzterer Befund steht im Gegensatz zu den von Dreyfuss und Kollegen erhaltenen Daten, die Gemin5 als wichtige Komponente der snRNA-Erkennung

beschrieben haben (Yong, J. *et al.*, 2010; Battle, D.J. *et al.*, 2006). Die Erkennung der RNA war in dem hier beschriebenen System allein von den Sm-Proteinen abhängig (Subcore- oder Core-Proteinen) und nicht durch Ab- oder Anwesenheit von Gemin5 beeinflusst. Ob und in welcher Form Gemin5 in der Bindung bzw. Bevorzugung der Vorläufer-RNA eine Rolle spielt, bleibt allerdings unklar, denn eine direkte RNA-Bindung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 6.8).

Zusammenlagerungsexperimente in Extrakten zeigten eine ATP-Abhängigkeit der U snRNP-Formierung (Meister, G. *et al.*, 2001). Gemin3 bindet mit seinem C-Terminus an SMN und ist aufgrund seiner Domänenstruktur (ATPase/RNA-Helikase-Funktion) für eine solche Funktion ein wahrscheinlicher Faktor (Charroux, B. *et al.*, 1999; Linder, P. *et al.*, 1989). Obwohl viele derartige vermeintliche RNA-Helikasen beschrieben worden sind, konnte nur für die wenigsten eine ATP-abhängige RNA-Helikaseaktivität *in vitro* gezeigt werden; so wurde auch für das humane Gemin3 nur die ATPase-Funktion nachgewiesen (Grundhoff, A.T. *et al.*, 1999). Gemin4 scheint die Stabilität von Gemin3 zu fördern und könnte dadurch dessen Funktion indirekt unterstützen (Charroux, B. *et al.*, 2000). Demgegenüber stehen aber die Beobachtungen, dass der isolierte endogene Komplex und auch die rekombinanten Komplexe (Gesamtkomplex und Pentamer) die Zusammenlagerungsreaktion ohne ATP-Verbrauch bewerkstelligen können (Abbildung 6.7). Auch konnte bislang keine ATPase/Helikase am SMN-Komplex nachgewiesen werden.

Die Begründung für die ATP-unabhängige Verrichtung der Arbeit liegt in der Funktion des Komplexes als „Brownscher Motor“ (Hänggi, P. and Marchesoni, F., 2009). Solche Motoren sind Nanomaschinen, die aus brownscher Molekularbewegung (also aus Wärme) eine gerichtete Bewegung erzeugen können. Ein analoger thermodynamischer Vorgang wird auch für das Ribosom angenommen (Frank, J. and Gonzalez, R.L., Jr., 2010).

Was den ATP-verbrauchenden Schritt angeht, so ist vorstellbar, dass die ATPase-Funktion von Gemin3 zu einem späteren Zeitpunkt von Bedeutung ist, der dem Transfer der Sm-Proteine auf die snRNA folgt, und sich somit ein Fehlen von ATP in diesem Schritt der U snRNP-Biogenese nicht negativ auf die Reaktion auswirkt. Der ATP-Umsatz könnte beispielsweise beim Transport des Core-Partikels in den Zellkern oder bei der anschließenden Modifikation der snRNA durch snoRNPs in den Cajal Bodies erfolgen.

Obwohl Gemin3 und Gemin4 als wichtige Komponenten für die Biogenesemaschinerie in Vertebraten angesehen werden müssen, gilt das offensichtlich nicht für alle Eukaryonten. So konnte in der Taufliege *Drosophila melanogaster* ein verminderter SMN-Komplex identifiziert werden, der nur aus SMN, Gemin2 und Gemin3 besteht. Es wurde zudem gezeigt, dass ein auf SMN/Gemin2 reduzierter Komplex hinreichend für die RNP-Formierung ist (Kroiss, M. *et al.*, 2008). Dies deutet erneut auf eine Aufgabe der restlichen humanen Gemine in einem anderen Schritt der U snRNP-Biogenese hin. Während diese Funktionen in der Taufliege eventuell von allein-agierenden Proteinen übernommen werden, wurden diese Proteine mit ihren Aufgaben im Laufe der Evolution im humanen SMN-Komplex vereint.

Lange wurde angenommen, dass SMN als der zentrale Bestandteil des SMN-Komplexes alleine für die Bindung der Sm-Proteine verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass vorzugsweise methylierte Sm-Proteine, also SmD1, D3 und B/B' über ihre C-terminalen RG-reichen Sequenzen dazu in der Lage sind, den SMN-Komplex zu binden (Friesen, W.J. *et al.*, 2001). Dabei stand vor allem die Tudor-Domäne im Mittelpunkt, deren C-terminale Hälfte (AS 120–160) ausreicht, um Sm-Proteine adäquat zu binden (Buhler, D. *et al.*, 1999). Die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur der Tudor-Domäne zeigt, dass fünf anti-parallele β -Faltblätter eine Fassstruktur bilden, deren negative Oberfläche für die Bindung der Sm-Proteine verantwortlich ist (Selenko, P. *et al.*, 2001).

Eine Bindung der Sm-Proteine *in vivo* konnte ebenfalls für Gemin4 beschrieben werden (Charroux, B. *et al.*, 2000); *in vitro* assoziieren Gemin6/Gemin7 mit diesen (Ma, Y. *et al.*, 2005). Inwieweit diese Interaktionen aber für die Funktionsweise des SMN Komplexes in der RNP-Formierung relevant sind, muss sich noch zeigen. Neuere strukturelle Daten weisen Gemin2 als den wichtigsten Sm-Protein-bindenden Faktor innerhalb des SMN-Komplexes aus (Grimm, C. *et al.*, 2013; Zhang, R. *et al.*, 2011). Die Rolle von Gemin2 in der Sm-Bindung wird deshalb als so wichtig eingestuft, weil es nahezu alle Sm-Proteine (SmD1, D2, E und F) von beiden Seiten des pICln-Sm-Rings umklammert und so fest an den SMN-Komplex bindet (Grimm, C. *et al.*, 2013).

Durch die Aufklärung der Struktur des 8S-Komplexes (6S-Komplex plus SMN/Gemin2) konnte außerdem gezeigt werden, dass die Tudor-Domäne nicht die Bedeutung in der Bindung der Sm-Proteine hat, wie bisher angenommen, da die beteiligten Proteinregionen (Tudor-Domäne und RG-reiche Sequenzen von SmD1) auf den jeweils gegenüberliegenden Seiten des Proteinrings positioniert sind (Grimm, C. *et al.*, 2013). Somit scheint die Interaktion der Sm-

Proteine mit dem SMN-Komplex nicht von deren Methylierung (allein) abhängig zu sein (Abbildung 6.17) (diese Arbeit; Tripsianes, K. *et al.*, 2011).

Die Röntgenkristall- und Kryo-EM-Strukturen von Grimm *et al.* liefern weiterhin eine mögliche Erklärung, wie dieser reduzierte SMN-Komplex das Chaperon pICln aus dem 6S-Komplex verdrängt (Grimm, C. *et al.*, 2013). Die Bindung von SMN/Gemin2 an den 6S-Komplex (8S-Komplex) induziert eine Konformationsänderung, die eine erhöhte Bewegungsfreiheit des Sm/pICln-Rings an der Schnittstelle von pICln und SmG gewährt, wodurch wiederum die Ringöffnung erleichtert wird. In früheren Studien wurde vermutet, dass für die Verdrängung von pICln der C-Terminus von SMN verantwortlich sein könnte. Fehlt dieser nämlich im SMN/Gemin2-Komplex (SMN Δ C/Gemin2), war der trunkierte Komplex nicht mehr fähig, die Verdrängung von pICln zu bewerkstelligen (Chari, A. *et al.*, 2008). Die Daten von Grimm *et al.* beziehen die Tudor-Domäne als weitere mögliche Effektor-domäne bei der 6S-Ringöffnung und der pICln-Verdrängung mit ein (Grimm, C. *et al.*, 2013).

7.4 Was sind die Funktionen der „peripheren“ SMN-Komplexkomponenten?

Der oben gewonnene Befund, dass ein Komplex aus SMN/Gemin2 für die snRNP-Ausbildung ausreichend ist, zieht die Frage nach der Aufgabe der restlichen Gemin 3-8 nach sich. Wenn sie auch nicht direkt an der Zusammenlagerung des Sm Cores beteiligt sind, können sie dennoch Aufgaben in vor- oder nachgeschalteten Stufen der U snRNP-Biogenese übernehmen. Für Gemin5 wurde eine m⁷G-Cap-bindende Funktion beschrieben, für die die WD-Wiederholungen verantwortlich gemacht werden. Zusätzlich scheint Gemin5 ein hauptsächlich zytoplasmatisches Protein zu sein und ist in den Cajal Bodies im Vergleich zu SMN oder anderen Geminen signifikant weniger repräsentiert (Hao le, T. *et al.*, 2007). Diese Daten könnten auf eine vorwiegend zytoplasmatische Rolle von Gemin5 in der RNA-Erkennung hindeuten. Diese Erkennung soll Gemin5 unabhängig vom SMN-Komplex bewerkstelligen können und die RNA anschließend zum SMN-Komplex führen (Lau, C.K. *et al.*, 2009; Bradrick, S.S. and Gromeier, M., 2009).

Nach der Formierung des RNP-Core muss das Partikel noch im Zytoplasma sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende prozessiert werden. Das m⁷G-Cap wird zum m₃G-Cap hypermethyliert und die snRNA vom 3'-Ende her verkürzt (Mattaj, I.W., 1986; Mouaikel, J. *et al.*, 2002; Houseley, J. *et al.*, 2006). Neben dem neuen m₃G-Cap bildet auch das Sm Core ein Kernimportsignal

(Fischer, U. and Luhrmann, R., 1990; Hamm, J. *et al.*, 1990; Fischer, U. *et al.*, 1991; Fischer, U. *et al.*, 1993). Der Import wird durch adapterabhängige Bindung von Importin β vermittelt. Importin β erkennt zum einen den Sm Core, wobei eine Assoziation mit Geminen nicht ausgeschlossen werden kann (Palacios, I. *et al.*, 1997; Massenet, S. *et al.*, 2002). Zum anderen bindet Importin β Snurpotin1, welches das hypermetylierte Cap und zusätzlich SMN, Gemin3 und das Sm Core erkennt (Narayanan, U. *et al.*, 2002).

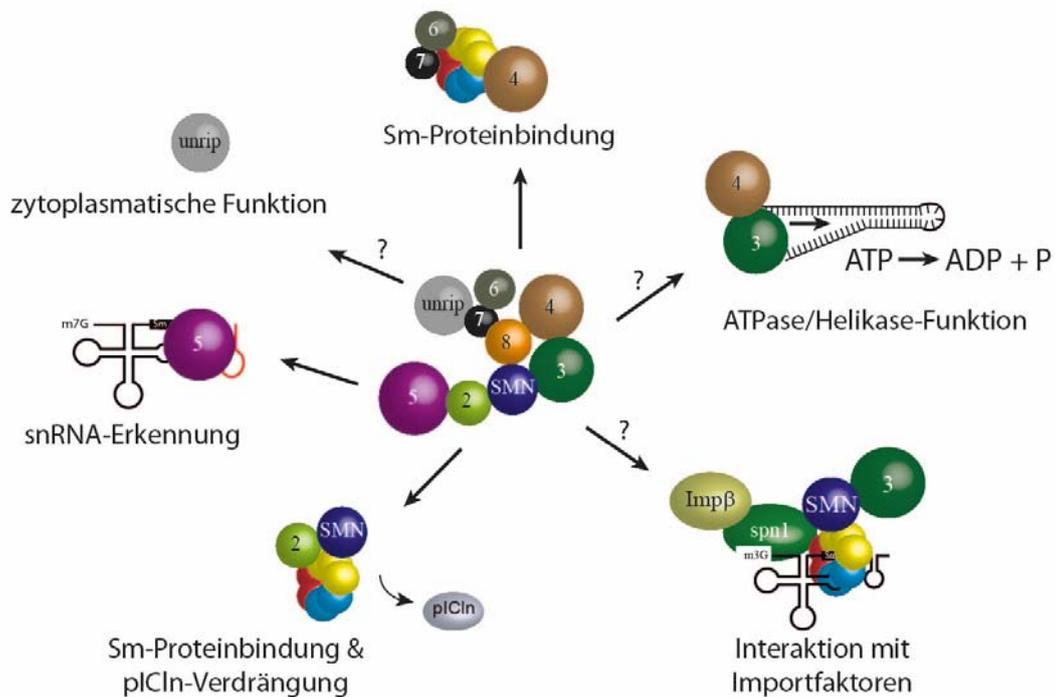


Abbildung 7.1: Bestätigte und mögliche Aufgaben der Gemin im SMN-Komplex

SMN/Gemin2 wurde als Sm-Protein-bindende Komponenten identifiziert. Ebenso wurde eine Interaktion von Gemin6/Gemin7 mit Sm-Proteinen *in vitro* und für Gemin4 *in vivo* gezeigt. Neben SMN gelten die Sm Core-Proteine und Gemin3 als möglicher Anker für den Import des Core-Partikels mittels Snurpotin1 (spn1) und Importin β (Imp β). Das Dimer aus Gemin3/Gemin4 besitzt potentiell die strukturellen Voraussetzungen für eine postulierte ATPase/Helikase-Funktion. Jüngere Daten weisen Gemin5 vermehrt als die entscheidende Komponente des SMN-Komplexes in der snRNA-Erkennung aus. Über die Funktion von unrip, das nur im Zytoplasma mit dem SMN-Komplex assoziiert vorliegt,

Nach Import des RNPs in den Kern bzw. die Cajal Bodies erfolgt der finale Schritt der U snRNP-Reifung (Strzelecka, M. *et al.*, 2010). Die spezifischen Proteine jedes RNPs binden an das Core-Partikel und die snRNA wird an bestimmten Nukleotiden modifiziert (z.B. Pseudo-Uridylierung und Methylierung) (Jady, B.E. and Kiss, T., 2001). Es wird diskutiert, ob einige spezifische Proteine zusammen mit dem SMN-Komplex in den Zellkern transportiert werden,

und dabei ist eine entscheidende Beteiligung der Gemine 3-8 ebenso denkbar (Navascues, J. *et al.*, 2004; Matera, A.G. and Shpargel, K.B., 2006). Somit bleiben für die restlichen Gemine, von SMN/Gemin2 abgesehen, welches für die RNP-Bildung ausreichend ist, viele weitere mögliche Aufgaben innerhalb des SMN-Komplexes an der U snRNP-Biogenese teilzunehmen.

7.5 Charakterisierung der SMA-Mutation SMN(E134K) im rekombinanten SMN-Komplex

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine Erkrankung des Nervensystems, die sich in einer fortschreitenden Degeneration von α -Motorneuronen in den Vorderhornzellen der grauen Substanz des Rückenmarks äußert (Markowitz, J.A. *et al.*, 2012). Der daraus resultierende Phänotyp zeichnet sich durch zunehmende Muskelschwäche und Muskelschwund aufgrund verminderter Innervierung der Muskulatur aus. Im Endstadium der Krankheit führen durch Ateminsuffizienz begünstigte opportunistische Atemwegsinfektionen wie Lungenentzündung zum Tode (Crawford, T.O. and Pardo, C.A., 1996).

Die Heterogenität im Krankheitsverlauf der SMA ist durch seine ungewöhnliche Genetik beim Menschen bedingt. Das *SMN*-Gen liegt in duplizierter Form auf Chromosom 5 (5q12.2 - q13.3) vor. Diese als *SMN1* und *SMN2* bezeichneten Gene sind auf Nukleotidsequenzebene zu über 99 Prozent identisch (Lefebvre, S. *et al.*, 1995). Während *SMN1* für ein stabiles Protein voller Länge codiert, kommt es bei 90 Prozent der *SMN2*-Transkripte aufgrund einer Transition in einem Spleißverstärker zu verkürzten Varianten, die nicht funktionell sind (Cartegni, L. *et al.*, 2006; Kashima, T. and Manley, J.L., 2003; Coady, T.H. and Lorson, C.L., 2011).

Neben homozygoter Deletion von *SMN*, die zum Krankheitsbild der SMA führt, können auch Punktmutationen die Funktion des Proteins und damit des Komplexes beeinträchtigen (Lefebvre, S. *et al.*, 1997; Monani, U.R. *et al.*, 2000). Aufgrund der Natur der Krankheit sind dies keine dominant-negativen Mutationen, sondern sehr wahrscheinlich Null-Mutationen.

Mit SMN(E134K) wurde eine prominente SMA-Punktmutation für die biochemische Analyse gewählt (Abbildung 6.18). Diese Missense-Mutation verursacht eine Ladungsänderung in der Tudor-domäne, die den aromatischen Käfig und damit die Bindungstasche für sDMA-enthaltene Proteine wie die Sm-Protein zerstört (Buhler, D. *et al.*, 1999; Selenko, P. *et al.*, 2001). Ein Defekt in den nachfolgenden Schritten der U snRNP-Biogenese - RNP-Formierung oder RNA-Bindung - war somit wahrscheinlich. Auch ist die Beteiligung der Tudor-Domäne bei der

Verdrängung von pICln wahrscheinlich, ein weiterer Aspekt, der die Mutation SMN(E134K) interessant machte (Grimm, C. *et al.*, 2013).

Die Oligomerisierung des endogenen SMN-Komplexes hatte bisher ausgeschlossen, diesen in rein mutierter Form aus Zellextrakten zu reinigen. In lebensfähigen Zellen wird immer auch das wildtypische SMN-Protein in die Maschinerie integriert, was zu einem Mischkomplex führt, den man nur schwer charakterisieren kann. Mit der Etablierung eines rekombinanten Systems zur Rekonstitution des SMN-Komplexes war es nun erstmals möglich einen Komplex zu generieren, der ausschließlich eine bestimmte SMA-relevante Mutation enthielt. Analog zum Wildtyp konnte auch die Expression und Aufreinigung des SMN(E134K)-Komplexes erfolgreich durchgeführt werden. Bezüglich der Komposition und auch der Fähigkeit Multimere auszubilden, unterschied sich der SMN(E134K)-Komplex nicht vom Wildtyp. Beide Rekonstitutionen besaßen ein vergleichbares Elutionsvolumen in der Gelfiltration, das auf einen Zusammenschluss von fünf bis sechs Komplexen schließen ließ (Abbildung 6.19). Somit handelte es sich beim SMN(E134K)-Komplex bzw. -Pentamer um einen korrekt gefalteten und zusammengelagerten Komplex, der für weitere Untersuchungen in größerer Menge zur Verfügung stand.

In funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass das Protein SMN(E134K), wenn es in den SMN-Komplex integriert vorliegt, die Sm-Proteine in vergleichbarer Weise binden kann wie der Wildtyp-Komplex (Abbildung 6.20). Neuere Untersuchungen deuten zudem daraufhin, dass die Interaktion der Sm-Proteine mit dem SMN-Komplex, seien sie methyliert oder unmethyliert, nicht allein von der Tudor-Domäne in SMN abhängig zu sein scheint (Tripsianes, K. *et al.*, 2011). Ergänzend zu diesen Befunden konnte mit Gemin2 ein weiterer Bestandteil des SMN-Komplexes identifiziert werden, der mit den Sm-Proteinen über eine N-terminale Helix in intensivem Kontakt steht (Zhang, R. *et al.*, 2011; Grimm, C. *et al.*, 2013). Mit diesen beiden Befunden lässt sich die wildtypische Sm-Bindungsfähigkeit des SMN(E134K)-Komplexes erklären.

In snRNP-Zusammenlagerungsreaktionen konnte für SMN(E134K) ebenfalls kein prinzipieller Defekt festgestellt werden, da auch der mutierte Komplex fähig war die Sm-Proteine spezifisch auf die snRNA zu übertragen (Abbildung 6.21). Stattdessen kam es zu einer Verlangsamung der Reaktion aufgrund der Verschiebung des Gleichgewichts um den Faktor 1,8. Das Gleichgewicht lag dabei weiter auf der Seite der freien RNA und der an den SMN-Komplex gebundenen Sm-Proteine als auf der Seite der formierten RNPs (Abbildung 6.22). Das bedeutet der wildtypische Komplex arbeitet schneller als der mutierte Komplex.

So scheint die Mutation SMN(E134K) kein generelles Problem bei der Sm-Proteinbindung oder der RNP-Zusammenlagerung zu besitzen, sondern eine verlangsamte Zusammenlagerungsaktivität. Der SMN(E134K)-Komplex zeigt zwar nur einen schwachen Defekt in der U snRNP-Zusammenlagerung, dies kann aber durchaus eine Erklärung für den Krankheitsverlauf der SMA liefern. So kann sich ein kleiner Defekt über die Zeit summieren und zu einem sich steigernden Phänotyp führen. Da in der Zelle der SMN-Komplex vermutlich als Multimer vorliegt, bestehen diese Zusammenschlüsse aus wildtypischen und mutierten Komplexen. Ein zusätzlicher negativer Effekt in der snRNP-Biogenese kann dadurch entstehen, dass das Zusammenspiel zwischen den beiden Varianten innerhalb eines Multimers gestört ist und die eigentliche Funktion nicht mehr korrekt ausgeführt werden kann. Dadurch kann es zu einer Verstärkung des Krankheitsbildes kommen.

Abschließend kann herausgestellt werden, dass die Spinale Muskelatrophie aufgrund ihrer genetischen Besonderheit eine komplexe Krankheit darstellt, für die mit SMN ein vielseitiges Protein identifiziert wurde, dessen bestuntersuchte Aufgabe die Biogenese von Uridin-reichen snRNPs ist.

8 Ausblick

Die Art und Weise, wie der SMN-Komplex den Sm-Ring auf die Sm-Bindungsstelle der snRNAs überträgt, erinnert an den Mechanismus der sog. clamp loading-Reaktion, bei der ringartige „Proteinklammern“ auf DNA geladen werden und so die Prozessivität der DNA-Replikation fördern (Ellison, V. and Stillman, B., 2001; Indiani, C. and O'Donnell, M., 2006). Diesen ATP-abhängigen Schritt vermitteln sog. clamp-loader, die aus mehreren Proteinen bestehen und durch ATP-Hydrolyse Konformationsänderungen unterliegen, die zur Schließung des Proteinrings um die DNA führen (Davey, M.J. *et al.*, 2002; Johnson, A. and O'Donnell, M., 2005). Ähnlich wie die Strukturaufklärung der pro- und eukaryontischen clamp loader zum Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus geführt hat, können Techniken wie Kryoelektronenmikroskopie oder Röntgenstrukturanalyse auch beim SMN-Komplex mehr Einblick in das mechanistische Agieren geben. Mit der Möglichkeit, einen homogenen SMN-Komplex bzw. -Pentamer in ausreichender Menge zu rekonstituieren, ist mit der vorliegenden Arbeit die Voraussetzung dafür geschaffen worden, den SMN-Komplex strukturellbiologisch zu untersuchen.

Zusätzlich zu seiner Beteiligung an der Biogenese von U snRNP und deren Recycling (Pellizzoni, L. *et al.*, 1999; Meister, G. *et al.*, 2000; Mourelatos, Z. *et al.*, 2001) wurde SMN bei weiteren zellulären Prozessen beobachtet. Durch Assoziation mit RNA-Helikase A (RHA) und RNA-Polymerase II (RNAPII) wurde für SMN eine Beteiligung an der Genexpression diskutiert (Strasswimmer, J. *et al.*, 1999; Pellizzoni, L. *et al.*, 2001). Auch konnte eine Bindung des SMN-Proteins an hnRNP-R und hnRNP-Q nachgewiesen werden, beides Proteine, die in den axonalen Transport von mRNAs involviert sind (Mourelatos, Z. *et al.*, 2001; Rossoll, W. *et al.*, 2002). Kürzlich konnte zudem eine Co-Fraktionierung von SMN mit Polyribosomen gezeigt werden, was eine Repression der Translation zur Folge hat (Sanchez, G. *et al.*, 2013). Die biochemische Basis für diese (und potentiell auch andere noch nicht entdeckte) Funktionen ist mit dem hier etablierten System ebenso möglich geworden wie die mechanistische Analyse des snRNP-Zusammenlagerung.

Neben dem SMN-Komplex, der alle Proteine enthält, existieren in der Zelle auch noch Subkomplexe, bestehend aus diversen Kombinationen der Gemine und/oder SMN. So konnten Einheiten von SMN/Gemin2, Gemin3/Gemin4/Gemin5, Gemin5 alleine oder Gemin6/Gemin7/unrip identifiziert werden (Battle, D.J. *et al.*, 2007). Welche Aufgabe die einzelnen Zusammenschlüsse erfüllen ist bislang unerforscht. Durch den modularen Aufbau

des hier etablierten Rekonstitutionssystems können diese Subkomplexe problemlos hergestellt und einer Struktur- und Funktionsanalyse zugänglich gemacht werden.

9 Literaturverzeichnis

Achsel, T., Stark, H. and Luhrmann, R. (2001): "The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3685-3689.

Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D.L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W. and Fornerod, M. (1999): "RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase." *Mol Cell Biol* **19**(9): 6276-6285.

Bacon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002): "Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex." *J Biol Chem* **277**(35): 31957-31962.

Battle, D.J., Kasim, M., Wang, J. and Dreyfuss, G. (2007): "SMN-independent subunits of the SMN complex. Identification of a small nuclear ribonucleoprotein assembly intermediate." *J Biol Chem* **282**(38): 27953-27959.

Battle, D.J., Lau, C.K., Wan, L., Deng, H., Lotti, F. and Dreyfuss, G. (2006): "The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs." *Mol Cell* **23**(2): 273-279.

Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977): "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(8): 3171-3175.

Blackwell, J.R. and Horgan, R. (1991): "A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form." *FEBS Lett* **295**(1-3): 10-12.

Bradrick, S.S. and Gromeier, M. (2009): "Identification of gemin5 as a novel 7-methylguanosine cap-binding protein." *PLoS One* **4**(9): e7030.

Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Haendler, B. and Jacob, M. (1982): "U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs." *EMBO J* **1**(10): 1259-1265.

Bringmann, P., Rinke, J., Appel, B., Reuter, R. and Luhrmann, R. (1983): "Purification of snRNPs U1, U2, U4, U5 and U6 with 2,2,7-trimethylguanosine-specific antibody and definition of their constituent proteins reacting with anti-Sm and anti-(U1)RNP antisera." *EMBO J* **2**(7): 1129-1135.

Brow, D.A. (2002): "Allosteric cascade of spliceosome activation." *Annu Rev Genet* **36**: 333-360.

Buhler, D., Raker, V., Luhrmann, R. and Fischer, U. (1999): "Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* **8**(13): 2351-2357.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Stuart, J.M. (1987): "XL 1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection." *BioTechniques* **5**: 376-379.

Burghes, A.H. and Beattie, C.E. (2009): "Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?" *Nat Rev Neurosci* **10**(8): 597-609.

Carissimi, C., Saieva, L., Baccon, J., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J. and 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**(12): 8126-8134.

Cartegni, L., Hastings, M.L., Calarco, J.A., de Stanchina, E. and Krainer, A.R. (2006): "Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2." *Am J Hum Genet* **78**(1): 63-77.

Cech, T.R. (2002): "Ribozymes, the first 20 years." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 1162-1166.

Chari, A. and Fischer, U. (2010): "Cellular strategies for the assembly of molecular machines." *Trends Biochem Sci* **35**(12): 676-683.

Chari, A., Golas, M.M., Klingenhager, M., Neuenkirchen, N., Sander, B., Englbrecht, C., Sickmann, A., Stark, H. and Fischer, U. (2008): "An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs." *Cell* **135**(3): 497-509.

Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M. and Dreyfuss, G. (1999): "Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems." *J Cell Biol* **147**(6): 1181-1194.

Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2000): "Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli." *J Cell Biol* **148**(6): 1177-1186.

Chow, L.T. (1977): "Sequence arrangements of the Escherichia coli chromosome and of putative insertion sequences, as revealed by electron microscopic heteroduplex studies." *J Mol Biol* **113**(4): 611-621.

Coady, T.H. and Lorson, C.L. (2011): "SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**(4): 546-564.

Crawford, T.O. and Pardo, C.A. (1996): "The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy." *Neurobiol Dis* **3**(2): 97-110.

Dahlberg, J.E., Yang, H., Neuman de Vegvar, H. and Lund, E. (1990): "Formation of the 3' end of U1 snRNA." *Mol Biol Rep* **14**(2-3): 161-162.

Davey, M.J., Jeruzalmi, D., Kuriyan, J. and O'Donnell, M. (2002): "Motors and switches: AAA+ machines within the replisome." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(11): 826-835.

Ellison, V. and Stillman, B. (2001): "Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine." *Cell* **106**(6): 655-660.

Feng, W., Gubitz, A.K., Wan, L., Battle, D.J., Dostie, J., Golembe, T.J. and Dreyfuss, G. (2005): "Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex." *Hum Mol Genet* **14**(12): 1605-1611.

Fernandez-Chamorro, J., Pineiro, D., Gordon, J.M., Ramajo, J., Francisco-Velilla, R., Macias, M.J. and Martinez-Salas, E. (2014): "Identification of novel non-canonical RNA-binding sites in Gemin5 involved in internal initiation of translation." *Nucleic Acids Res.*

Fernandez, J.M. and Hoeffler, J.P. (1999): "Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression." *Academic Press, San Diego*, .

Fica, S.M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J.P. and Piccirilli, J.A. (2013): "RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing." *Nature* **503**(7475): 229-234.

Fischer, U., Darzynkiewicz, E., Tahara, S.M., Dathan, N.A., Luhrmann, R. and Mattaj, I.W. (1991): "Diversity in the signals required for nuclear accumulation of U snRNPs and variety in the pathways of nuclear transport." *J Cell Biol* **113**(4): 705-714.

Fischer, U., Englbrecht, C. and Chari, A. (2011): "Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**(5): 718-731.

Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997): "The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis." *Cell* **90**(6): 1023-1029.

Fischer, U. and Luhrmann, R. (1990): "An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus." *Science* **249**(4970): 786-790.

Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. and Luhrmann, R. (1993): "Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap." *EMBO J* **12**(2): 573-583.

Fisher, D.E., Conner, G.E., Reeves, W.H., Wisniewolski, R. and Blobel, G. (1985): "Small nuclear ribonucleoprotein particle assembly in vivo: demonstration of a 6S RNA-free core precursor and posttranslational modification." *Cell* **42**(3): 751-758.

Frank, J. and Gonzalez, R.L., Jr. (2010): "Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome." *Annu Rev Biochem* **79**: 381-412.

Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G. (2001): "SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets." *Mol Cell* **7**(5): 1111-1117.

Friesen, W.J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002): "A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins." *J Biol Chem* **277**(10): 8243-8247.

Galej, W.P., Oubridge, C., Newman, A.J. and Nagai, K. (2013): "Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the spliceosome." *Nature* **493**(7434): 638-643.

Gesteland, R.F., Cech, T. and Atkins, J.F. (1999). *The RNA world : the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA*: Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gilbert, W. (1978): "Why genes in pieces?" *Nature* **271**(5645): 501.

Grainger, R.J. and Beggs, J.D. (2005): "Prp8 protein: at the heart of the spliceosome." *RNA* **11**(5): 533-557.

Grimm, C., Chari, A., Pelz, J.P., Kuper, J., Kisker, C., Diederichs, K., Stark, H., Schindelin, H. and Fischer, U. (2013): "Structural basis of assembly chaperone- mediated snRNP formation." *Mol Cell* **49**(4): 692-703.

Grimmler, M., Bauer, L., Nousiainen, M., Korner, R., Meister, G. and Fischer, U. (2005): "Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs." *EMBO Rep* **6**(1): 70-76.

Grundhoff, A.T., Kremmer, E., Tureci, O., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller-Lantzsch, N., Schubach, W.H. and Grasser, F.A. (1999): "Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C." *J Biol Chem* **274**(27): 19136-19144.

Gubitz, A.K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002): "Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins." *J Biol Chem* **277**(7): 5631-5636.

Gussow, D. and Clackson, T. (1989): "Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction." *Nucleic Acids Res* **17**(10): 4000.

Hahnen, E., Schonling, J., Rudnik-Schoneborn, S., Raschke, H., Zerres, K. and Wirth, B. (1997): "Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA)." *Hum Mol Genet* **6**(5): 821-825.

Hamm, J., Darzynkiewicz, E., Tahara, S.M. and Mattaj, I.W. (1990): "The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal." *Cell* **62**(3): 569-577.

Hamm, J., Kazmaier, M. and Mattaj, I.W. (1987): "In vitro assembly of U1 snRNPs." *EMBO J* **6**(11): 3479-3485.

- Hamm, J. and Mattaj, I.W. (1990): "Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus." *Cell* **63**(1): 109-118.
- Hanahan, D. (1983): "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hänggi, P. and Marchesoni, F. (2009): "Artificial Brownian motors: Controlling transport on the nanoscale." *Rev. Mod. Phys.* **81**(1): 387-442.
- Hao le, T., Fuller, H.R., Lam le, T., Le, T.T., Burghes, A.H. and Morris, G.E. (2007): "Absence of gemin5 from SMN complexes in nuclear Cajal bodies." *BMC Cell Biol* **8**: 28.
- Hentschel, C.C. and Birnstiel, M.L. (1981): "The organization and expression of histone gene families." *Cell* **25**(2): 301-313.
- Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V.A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H. and Luhrmann, R. (1995): "snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions." *EMBO J* **14**(9): 2076-2088.
- Houseley, J., LaCava, J. and Tollervey, D. (2006): "RNA-quality control by the exosome." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 529-539.
- Husedzinovic, A., Oppermann, F., Draeger-Meurer, S., Chari, A., Fischer, U., Daub, H. and Gruss, O.J. (2014): "Phosphoregulation of the human SMN complex." *Eur J Cell Biol.*
- Indiani, C. and O'Donnell, M. (2006): "The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(10): 751-761.
- Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C. and Mattaj, I.W. (1995): "A cap-binding protein complex mediating U snRNA export." *Nature* **376**(6542): 709-712.
- Jackson, I.J. (1991): "A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites." *Nucleic Acids Res* **19**(14): 3795-3798.
- Jady, B.E. and Kiss, T. (2001): "A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA." *EMBO J* **20**(3): 541-551.
- Jantsch, M.F. and Gall, J.G. (1992): "Assembly and localization of the U1-specific snRNP C protein in the amphibian oocyte." *J Cell Biol* **119**(5): 1037-1046.
- Johnson, A. and O'Donnell, M. (2005): "Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork." *Annu Rev Biochem* **74**: 283-315.

Kambach, C., Walke, S. and Nagai, K. (1999): "Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles." *Curr Opin Struct Biol* **9**(2): 222-230.

Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J.M., de la Fortelle, E., Raker, V.A., Luhrmann, R., Li, J. and Nagai, K. (1999): "Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs." *Cell* **96**(3): 375-387.

Kashima, T. and Manley, J.L. (2003): "A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy." *Nat Genet* **34**(4): 460-463.

Kastner, B., Bach, M. and Luhrmann, R. (1990): "Electron microscopy of small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) particles U2 and U5: evidence for a common structure-determining principle in the major U snRNP family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(5): 1710-1714.

Kroiss, M., Schultz, J., Wiesner, J., Chari, A., Sickmann, A. and Fischer, U. (2008): "Evolution of an RNP assembly system: a minimal SMN complex facilitates formation of UsnRNPs in *Drosophila melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10045-10050.

Laemmli, U.K. (1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Lamond, A.I., Konarska, M.M., Grabowski, P.J. and Sharp, P.A. (1988): "Spliceosome assembly involves the binding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(2): 411-415.

Lau, C.K., Bachorik, J.L. and Dreyfuss, G. (2009): "Gemin5-snRNA interaction reveals an RNA binding function for WD repeat domains." *Nat Struct Mol Biol* **16**(5): 486-491.

Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. and et al. (1995): "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." *Cell* **80**(1): 155-165.

Lefebvre, S., Bulet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G. and Melki, J. (1997): "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy." *Nat Genet* **16**(3): 265-269.

Lehmeier, T., Foulaki, K. and Luhrmann, R. (1990): "Evidence for three distinct D proteins, which react differentially with anti-Sm autoantibodies, in the cores of the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6475-6484.

Lin, R.-J. (2008). RNA-protein interaction protocols: Totowa, N.J.

London, Humana ;

Springer distributor.

Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J. and Slonimski, P.P. (1989): "Birth of the D-E-A-D box." *Nature* **337**(6203): 121-122.

Luhrmann, R., Kastner, B. and Bach, M. (1990): "Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing." *Biochim Biophys Acta* **1087**(3): 265-292.

Ma, Y., Dostie, J., Dreyfuss, G. and Van Duyne, G.D. (2005): "The Gemin6-Gemin7 heterodimer from the survival of motor neurons complex has an Sm protein-like structure." *Structure* **13**(6): 883-892.

Madhani, H.D. and Guthrie, C. (1994): "Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome." *Annu Rev Genet* **28**: 1-26.

Markowitz, J.A., Singh, P. and Darras, B.T. (2012): "Spinal muscular atrophy: a clinical and research update." *Pediatr Neurol* **46**(1): 1-12.

Massenet, S., Pellizzoni, L., Paushkin, S., Mattaj, I.W. and Dreyfuss, G. (2002): "The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway." *Mol Cell Biol* **22**(18): 6533-6541.

Matera, A.G. and Shpargel, K.B. (2006): "Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline." *Curr Opin Cell Biol* **18**(3): 317-324.

Mattaj, I.W. (1986): "Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding." *Cell* **46**(6): 905-911.

Meister, G., Buhler, D., Lagerbauer, B., Zobawa, M., Lottspeich, F. and Fischer, U. (2000): "Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins." *Hum Mol Genet* **9**(13): 1977-1986.

Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. and Fischer, U. (2001): "A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs." *Nat Cell Biol* **3**(11): 945-949.

Meister, G., Eggert, C., Buhler, D., Brahm, H., Kambach, C. and Fischer, U. (2001): "Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln." *Curr Biol* **11**(24): 1990-1994.

Meister, G. and Fischer, U. (2002): "Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs." *EMBO J* **21**(21): 5853-5863.

Merril, C.R., Dunau, M.L. and Goldman, D. (1981): "A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels." *Anal Biochem* **110**(1): 201-207.

Michaelis, L. and Menten, M.L. (1913): "Die Kinetik der Invertinwirkung." *Biochem. Z.* **49**, 333-369.

Mintz, P.J., Patterson, S.D., Neuwald, A.F., Spahr, C.S. and Spector, D.L. (1999): "Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters." *EMBO J* **18**(15): 4308-4320.

Monani, U.R., Coovert, D.D. and Burghes, A.H. (2000): "Animal models of spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* **9**(16): 2451-2457.

Montzka, K.A. and Steitz, J.A. (1988): "Additional low-abundance human small nuclear ribonucleoproteins: U11, U12, etc." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 8885-8889.

Moore, M.J. and Sharp, P.A. (1993): "Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing." *Nature* **365**(6444): 364-368.

Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J. and 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**(4): 891-901.

Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N. and Dreyfuss, G. (2001): "SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins." *EMBO J* **20**(19): 5443-5452.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986): "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.

Narayanan, U., Ospina, J.K., Frey, M.R., Hebert, M.D. and Matera, A.G. (2002): "SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta." *Hum Mol Genet* **11**(15): 1785-1795.

Navascues, J., Berciano, M.T., Tucker, K.E., Lafarga, M. and Matera, A.G. (2004): "Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis." *Chromosoma* **112**(8): 398-409.

Neuenkirchen, N., Chari, A. and Fischer, U. (2008): "Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs." *FEBS Lett* **582**(14): 1997-2003.

Ogawa, C., Usui, K., Ito, F., Itoh, M., Hayashizaki, Y. and Suzuki, H. (2009): "Role of survival motor neuron complex components in small nuclear ribonucleoprotein assembly." *J Biol Chem* **284**(21): 14609-14617.

Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. and Mattaj, I.W. (2000): "PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation." *Cell* **101**(2): 187-198.

Otter, S., Grimmmler, M., Neuenkirchen, N., Chari, A., Sickmann, A. and Fischer, U. (2007): "A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex." *J Biol Chem* **282**(8): 5825-5833.

Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S.A. and Mattaj, I.W. (1997): "Nuclear import of U snRNPs requires importin beta." *EMBO J* **16**(22): 6783-6792.

Pellizzoni, L., Baccon, J., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002): "Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component." *J Biol Chem* **277**(9): 7540-7545.

Pellizzoni, L., Charroux, B. and Dreyfuss, G. (1999): "SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11167-11172.

Pellizzoni, L., Charroux, B., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2001): "A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II." *J Cell Biol* **152**(1): 75-85.

Pellizzoni, L., Yong, J. and Dreyfuss, G. (2002): "Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly." *Science* **298**(5599): 1775-1779.

Plessel, G., Fischer, U. and Luhrmann, R. (1994): "m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain." *Mol Cell Biol* **14**(6): 4160-4172.

Pomeranz Krummel, D.A., Oubridge, C., Leung, A.K., Li, J. and Nagai, K. (2009): "Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution." *Nature* **458**(7237): 475-480.

Pu, W.T., Krapivinsky, G.B., Krapivinsky, L. and Clapham, D.E. (1999): "pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4113-4120.

Raker, V.A., Plessel, G. and 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**(9): 2256-2269.

Reddy, R., Henning, D., Das, G., Harless, M. and Wright, D. (1987): "The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III." *J Biol Chem* **262**(1): 75-81.

Rossoll, W., Kroning, A.K., Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Jablonka, S. and Sendtner, M. (2002): "Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?" *Hum Mol Genet* **11**(1): 93-105.

Ruby, S.W. and Abelson, J. (1988): "An early hierarchic role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly." *Science* **242**(4881): 1028-1035.

Sambrook, J. and Russel, J. (2006): "The condensed protocols - From molecular cloning: A Laboratory Manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sanchez, G., Dury, A.Y., Murray, L.M., Biondi, O., Tadesse, H., El Fatimy, R., Kothary, R., Charbonnier, F., Khandjian, E.W. and Cote, J. (2013): "A novel function for the survival motoneuron protein as a translational regulator." *Hum Mol Genet* **22**(4): 668-684.

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. and Smith, M. (1977): "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA." *Nature* **265**(5596): 687-695.

Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U. and Sattler, M. (2001): "SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins." *Nat Struct Biol* **8**(1): 27-31.

Setzer, D.R. (1999): "Methods in Molecular Biology. Edited by S. Haynes." *Humana Press Inc., Totowa, NJ Vol. 118: RNA-Protein Interaction Protocols - Laboratory manuals*: 115-128.

Shpargel, K.B. and Matera, A.G. (2005): "Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48): 17372-17377.

Sleeman, J.E. and Lamond, A.I. (1999): "Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway." *Curr Biol* **9**(19): 1065-1074.

Staley, J.P. and Guthrie, C. (1998): "Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things." *Cell* **92**(3): 315-326.

Staley, J.P. and Woolford, J.L., Jr. (2009): "Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines." *Curr Opin Cell Biol* **21**(1): 109-118.

Stanek, D., Pridalova-Hnilicova, J., Novotny, I., Huranova, M., Blazikova, M., Wen, X., Sapra, A.K. and Neugebauer, K.M. (2008): "Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies." *Mol Biol Cell* **19**(6): 2534-2543.

Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R. and Kastner, B. (2001): "Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle." *Nature* **409**(6819): 539-542.

Steitz, J.A., Dreyfuss, G., Krainer, A.R., Lamond, A.I., Matera, A.G. and Padgett, R.A. (2008): "Where in the cell is the minor spliceosome?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(25): 8485-8486.

Strasswimmer, J., Lorson, C.L., Breiding, D.E., Chen, J.J., Le, T., Burghes, A.H. and Androphy, E.J. (1999): "Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein." *Hum Mol Genet* **8**(7): 1219-1226.

Strzelecka, M., Trowitzsch, S., Weber, G., Luhrmann, R., Oates, A.C. and Neugebauer, K.M. (2010): "Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis." *Nat Struct Mol Biol* **17**(4): 403-409.

- Sumpter, V., Kahrs, A., Fischer, U., Kornstadt, U. and Luhrmann, R. (1992): "In vitro reconstitution of U1 and U2 snRNPs from isolated proteins and snRNA." *Mol Biol Rep* **16**(4): 229-240.
- Sun, Y., Grimmmer, M., Schwarzer, V., Schoenen, F., Fischer, U. and Wirth, B. (2005): "Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy." *Hum Mutat* **25**(1): 64-71.
- Takaku, M., Tsujita, T., Horikoshi, N., Takizawa, Y., Qing, Y., Hirota, K., Ikura, M., Ikura, T., Takeda, S. and Kurumizaka, H. (2011): "Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions." *Biochemistry* **50**(32): 6797-6805.
- Talbot, K., Ponting, C.P., Theodosiou, A.M., Rodrigues, N.R., Surtees, R., Mountford, R. and 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**(3): 497-500.
- Tripsianes, K., Madl, T., Machyna, M., Fessas, D., Englbrecht, C., Fischer, U., Neugebauer, K.M. and Sattler, M. (2011): "Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins." *Nat Struct Mol Biol* **18**(12): 1414-1420.
- van Dam, A., Winkel, I., Zijlstra-Baalbergen, J., Smeenk, R. and Cuypers, H.T. (1989): "Cloned human snRNP proteins B and B' differ only in their carboxy-terminal part." *EMBO J* **8**(12): 3853-3860.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982): "The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers." *Gene* **19**(3): 259-268.
- Wahl, M.C., Will, C.L. and Luhrmann, R. (2009): "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." *Cell* **136**(4): 701-718.
- Will, C.L. and Luhrmann, R. (2001): "Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function." *Curr Opin Cell Biol* **13**(3): 290-301.
- Will, C.L. and Luhrmann, R. (2011): "Spliceosome structure and function." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(7).
- Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Laggerbauer, B. and Fischer, U. (2005): "Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy." *Genes Dev* **19**(19): 2320-2330.
- Yong, J., Golembe, T.J., Battle, D.J., Pellizzoni, L. and Dreyfuss, G. (2004): "snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2747-2756.
- Yong, J., Kasim, M., Bachorik, J.L., Wan, L. and Dreyfuss, G. (2010): "Gemin5 delivers snRNA precursors to the SMN complex for snRNP biogenesis." *Mol Cell* **38**(4): 551-562.

Zeller, R., Carri, M.T., Mattaj, I.W. and De Robertis, E.M. (1984): "Xenopus laevis U1 snRNA genes: characterisation of transcriptionally active genes reveals major and minor repeated gene families." *EMBO J* **3**(5): 1075-1081.

Zhang, R., So, B.R., Li, P., Yong, J., Glisovic, T., Wan, L. and Dreyfuss, G. (2011): "Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly." *Cell* **146**(3): 384-395.

Zhou, L., Hang, J., Zhou, Y., Wan, R., Lu, G., Yin, P., Yan, C. and Shi, Y. (2013): "Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA." *Nature*.

10 Abkürzungen

Verwendete Abkürzungen sind nachfolgend alphabetisch aufgeführt:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
∞	unendlich
A	Amper
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>engl.</i> : bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	Cajal body
CBC	Kappe bindender Komplex (<i>engl.</i> : cap binding complex)
CBP	Kappe bindendes Protein (<i>engl.</i> : cap binding protein)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIAP	Intestinale alkalische Phosphatase aus dem Kalb (<i>engl.</i> : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
cm	Zentimeter
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>engl.</i> : counts per minute)
C-terminal	Carboxyl-Terminus
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
d	desoxy
D	Dalton
d. h.	das heißt
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethanol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP	Dimethyl pimelimidate
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> : deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds	doppelstängig (<i>engl.</i> : double-stranded)
DTT	Dithiotreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (<i>engl.</i> : enhanced chemiluminescence)

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
engl.:	englisch
et al.	und andere (<i>lat.</i> : et alterae)
EtOH	Ethanol
Exon	Protein-kodierender Abschnitt innerhalb einer prä-mRNA
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl.</i> : fetal calf serum)
fwr	forward
g	Gramm
GB	Großbritannien
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
His6	Hexahistidine tag
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Intron	nicht kodierender Abschnitt innerhalb einer prä-mRNA
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
k	kilo
konj.	konjugiert
l	Liter
LB	Luria Bertani
lwr	unten (<i>engl.</i> : lower)
M	molar
m	2'-O-Ribose Methylierung
m-	Milli-
m3G	N2,N2,N7-Trimethylguanosin
m7G	N7-Monomethylguanosin
MCS	Multiple Klonierungsstelle eines Vektors (<i>engl.</i> : multiple cloning site)
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> : messenger-RNA)
MW	Molekulargewicht (<i>engl.</i> : molecular weight)
MWCO	Molecular weight cut off
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

Abkürzungen

NET	NaCl/EDTA/Tris
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (<i>engl.</i> : Nickel-nitrilotriacetic acid)
NPC	Kernporenkomplex (<i>engl.</i> : nuclear pore complex)
N-terminal	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
p	Piko-
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> : phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> : polymerase chain reaction)
<i>Pfu</i> -Pol	DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pICln	protein of chloride conductance regulatory
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol II	RNA Polymerase II
prä-mRNA	Primärtranskript einer mRNA
PRMT5	Protein-Arginin-Methyltransferase 5
PSP	PreScission Protease
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> : ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> : revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SAP	Alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen (<i>Pandalus borealis</i>) (<i>engl.</i> : shrimp alkaline phosphatase)
SB	Vollmedium (<i>engl.</i> : Super Broth)
scaRNP	Cajal body-spezifische RNPs
sDMA	Symmetrische Dimethylierung an Arginin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>engl.</i> : sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
SIP1	SMN interagierendes Protein 1
SMA	Spinale Muskelatrophie
<i>SMN</i>	Survival Motor Neurons Gen
SMN	Survival Motor Neurons Protein
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (<i>engl.</i> : small nucleolar RNA)
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (<i>engl.</i> : small nucleolar RNP)
snRNA	kleine nukleäre RNA (<i>engl.</i> : small nuclear RNA)
snRNP	kleines nukleäres RNP (<i>engl.</i> : small nuclear RNP)
<i>Taq</i> -Pol	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>

Abkürzungen

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV-Protease	Tabakätzvirus-Protease (<i>engl.</i> : tobacco etch virus protease)
TP	Totalprotein
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> : transfer RNA)
U	Einheit (<i>engl.</i> : unit)
upr	oben (<i>engl.</i> : upper)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>engl.</i> : United States of America)
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UTR	Untranslatierte Region einer mRNA
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
Vol	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
WB	Western blot
WT	Wildtyp
x	-mal
XC	Xylencyanol
X-link	kovalente Quervernetzung (<i>engl.</i> : cross-link)
ψ	Pseudouridylierung
z.B.	zum Beispiel
α -	anti
α	alpha
β	beta
β -ME	Beta-Mercaptoethanol
γ	gamma
Δ	delta
μ	mikro

11 Anhang

11.1 Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superose 6 10/300 GL

Zur Bestimmung des säulenspezifischen Elutionsverhalten, wurde mit den globulären Standardproteinen Thyroglobulin, Ferritin, BSA und RNaseA (GE Healthcare) die Säule Superose 6 10/300 GL kalibriert. Mit den bekannten Molekulargewichten konnte eine Kalibrierungsgerade in ein Diagramm übertragen werden, das zur Bestimmung des Molekulargewichtes unbekannter Proteine/Proteinkomplexe herangezogen werden konnte (Abbildung 11.1).

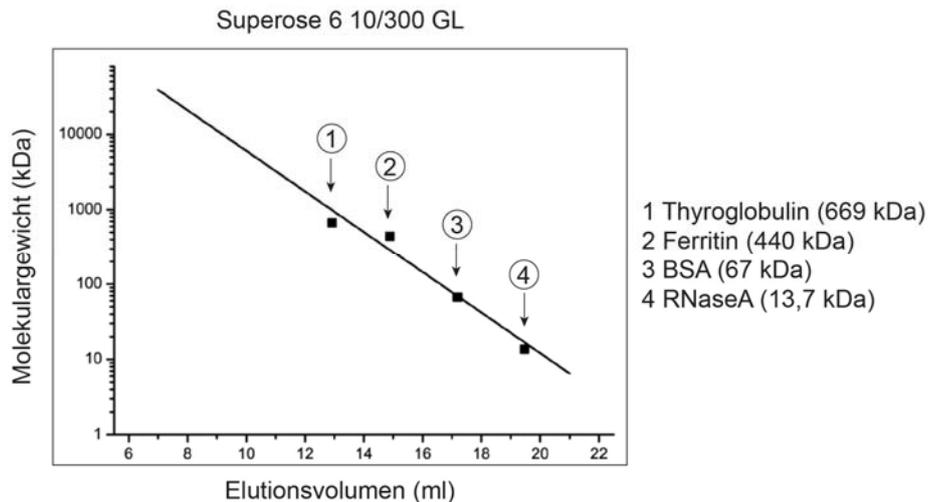


Abbildung 11.1: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superose 6 10/300 GL

Vier globuläre Standardproteine (GE Healthcare) wurden zur Kalibrierung der Säule Superose 6 10/300 GL entsprechend der Anleitung aufgetrennt. Die bekannten Molekulargewichte wurden gegen die Elutionsvolumina in einem halblogarithmischen Diagramm aufgetragen. 1) 2,5 mg Thyroglobulin, 2) 0,2 mg Ferritin, 3) 4 mg BSA, 4) 2,5 mg RNaseA.

11.2 Tabellen der densitomertrisch bestimmten Bandenintensität

Die densitometrisch bestimmten Werte aus den Zusammenlagerungsreaktionen sind in folgenden Tabellen aufgeführt. Die Q-values errechnen sich aus dem Quadrat der Differenz zwischen tatsächlich gemessenem Wert und dem angepassten Wert. Je niedriger ein Q-value für den jeweiligen x-Wert, desto näher liegt der y-Wert an der angepassten Kurve.

Tabelle 11.1: Gemessene und angepasste Werte für Abbildung 6.9

SMN-Komplex + Sm Core-Proteine + hU1 snRNA		
Zeit (min)	snRNPs (%)	Standardabweichung
0	0	0
5	37,0466075	9,81809068
10	56,5351635	6,1990206
15	59,6938245	0,25932081
20	65,468276	4,02796024
30	66,6737595	7,2257453
40	68,029052	0,24881815
50	70,023417	6,85846626
60	69,0137055	4,08605118
SMN-Komplex + Sm Core-Proteine + prä-hU1 snRNA		
Zeit (min)	snRNPs (%)	Standardabweichung
0	0	0
5	35,8627755	2,23938384
10	60,516284	0,27611954
15	77,272875	0,12256848
20	81,8006235	1,73602281
30	89,40445	2,31290951
40	94,5252105	0,71230897
50	95,615262	0,98415122
60	97,962717	2,88115325

Tabelle 11.2: Gemessene und angepasste Werte für Abbildung 6.12

Pentamer + Sm Core-Proteine + hU1 snRNA		
Zeit (min)	snRNPs (%)	Standardabweichung
0	0	0
5	39,4009465	12,2670426
10	63,880571	7,1135918
15	67,1253725	4,30168552
20	70,1560215	1,48156548
30	67,904133	0,58814596
40	71,6481745	0,4242273
50	73,4572915	1,84385376
60	79,94786	1,96177513

Pentamer + Sm Core-Proteine + prä-hU1 snRNA		
Zeit (min)	snRNPs (%)	Standardabweichung
0	0	0
5	35,851949	12,2670426
10	68,768974	7,1135918
15	84,507702	4,30168552
20	90,006713	1,48156548
30	95,894534	0,58814596
40	96,722614	0,4242273
50	98,3089215	1,84385376
60	98,6128155	1,96177513

Tabelle 11.3: Gemessene und angepasste Werte für Abbildung 6.13

SMN(WT)-Pentamer + Sm Core-Proteine + U1 snRNA			
μM	snRNPs (%)	angepasst	Q values
0	0	0	0
0,0625	12,796951	11,5233434	1,62207645
0,125	49,202905	49,9091071	0,49872141
0,187	74,102826	74,9583314	0,73188953
0,25	85,761529	85,6067803	0,02394715
0,312	92,994994	90,0810513	8,49106226
0,375	94,365611	92,2484264	4,48247053
0,437	94,559891	93,371916	1,41128451
0,5	88,737364	94,0254952	27,9643318
max 100 %			
min 0 %			
EC50 0,12636841 μM			
n 2,99790702			

SMN(WT)-Pentamer + Sm Subcore-Proteine + U1 snRNA			
μM	snRNPs %	angepasst	Q values
0	0	0	0
0,0417	0,690191	0,09723271	0,35159954
0,0833	5,478889	2,84344791	6,94554972
0,166	44,100016	45,0496227	0,90175283
0,25	83,228424	81,4683695	3,09779188
0,333	88,984424	89,9196779	0,87469992
0,417	91,718931	91,9803429	0,06833616
max 100 %			
min 0 %			
EC50 0,166 μM			
n 3,52567468			

Tabelle 11.4: Gemessene und angepasste Werte für Abbildung 6.14

SMN(WT)-Pentamer + Sm Core-Proteine + U1 snRNA	
Zeit (min)	snRNPs (%)
0	0
10	47,974979
20	77,863401
30	89,736503
40	94,129251
50	95,632308
60	95,340599
75	97,75276
90	97,162314
105	98,341507
120	98,559776
SMN(WT)-Pentamer + Sm Subcore-Proteine + U1 snRNA	
Zeit (min)	snRNPs (%)
0	0
10	30,0162
20	47,746255
30	55,059131
40	60,432072
50	65,075788
60	70,093764
75	76,124058
90	76,793918
105	83,690874
120	83,120199

Tabelle 11.5: Gemessene und angepasste Werte für Abbildung 6.22

SMN(E134K)-Pentamer + Sm Core-Proteine + U1 snRNA				
μM	snRNPs (%)	angepasst	Q values	Abweichung
0	0	0	0	0
0,03128125	2,739258	0,04562765	7,25564448	0
0,0625625	3,338681	0,67933722	7,07210933	0,269208
0,125125	9,197901	9,29591556	0,00960685	0,931106
0,1876875	29,6756825	33,3020592	13,1506079	2,3471925
0,25025	64,481651	60,5619738	15,3638695	1,621919
0,3128125	81,666042	78,5899683	9,46222948	0,73175
0,375375	86,461238	88,2093814	3,05600539	0,059554
0,4379375	89,664741	93,1783716	12,3456	0
0,5005	93,230912	95,8349562	6,78104606	0
0,5630625	94,087039	97,3296174	10,5143145	0

max	100 %
min	0%
EC50	0,22421974 µM
n	3,90532352

11.3 Nukleotidbasen

A Adenin
 C Cytosin
 G Guanin
 T Thymin
 U Uracil

11.4 Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	Hi	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

11.5 Publikationen

Teile dieser Arbeit gingen in folgende Veröffentlichungen ein:

Englbrecht C*, Neuenkirchen N*, Chari A, Ohmer J, Fischer U (2014): „Reconstitution of the U snRNP assembly machinery provides mechanistic insight into chaperone-mediated Sm protein organization and their delivery onto snRNA.“ (in Vorbereitung).

*Gleichberechtigte Co-Autorenschaft

Tripsianes K, Madl T, Machyna M, Fessas D, **Englbrecht C**, Fischer U, Neugebauer KM, Sattler M (2011): „Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins.“ *Nature structural & molecular biology*. **18**(12):1414-20.

Chari A, Golas MM, Klingenhäger M, Neuenkirchen N, Sander B, **Englbrecht C**, Sickmann A, Stark H and Fischer U (2008): „An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs.“ *Cell*. **135**: 497-509.

Buchkapitel:

Fischer U, **Englbrecht C** and Chari A (2011): „Biogenesis of ribonucleoprotein particles involved in mRNA maturation.“ *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. **2**(5), 718-731.

11.6 Lebenslauf

Hochschulstudium

- 15.04.2008 – 31.03.2014 Dissertation an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg. Doktorarbeit bei Prof. Dr. Utz Fischer am Lehrstuhl für Biochemie des Theodor Boveri Instituts für Biowissenschaften mit dem Titel „Biochemische Rekonstitution und funktionelle Charakterisierung der Zusammenlagerungsmaschinerie spleißosomaler U snRNPs.“
- 14.02.2008: Erwerb des Diploms in Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit der Note „Sehr gut“.
- 01.05.2007 - 01.02.2008 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg: „Rekonstitution und biochemische Charakterisierung von rekombinanten wildtypischen und mutanten SMN-Komplexen.“
- 01.10.2004 – 28.02.2008 Hauptstudium der Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 31.08.2004: Erwerb des Vordiploms in Biologie, Universität Bayreuth
- 01.10.2002 – 30.09.2004 Grundstudium der Biologie, Universität Bayreuth

Zivildienst

- 01.07.2001 – 31.05.2002 Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt (AWO) Straubing

Schulische Ausbildung

- 06/2001 Abitur mit Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
- 09/1992 – 06/2001 Besuch des Anton-Bruckner-Gymnasiums in Straubing
- 09/1988 – 08/1992 Besuch der Grundschule Geiselhöring

Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen

11. - 16.06.2013 The 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Schweiz
Posterpräsentation
14. – 16.09.2011 Annual Conference of the German Genetics Society, Würzburg
18. – 20.03.2010 EMBL Conference The Complex Life of mRNA – From Synthesis to Decay, Heidelberg

11.7 Danksagung

- Ich danke Prof. Dr. Utz Fischer für die fachliche Betreuung und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit,
Prof. Dr. Alexander Buchberger für seine Tätigkeit als Zweitgutachter,
PD Dr. Sibylle Jablonka als dritte Prüferin des Promotionskolloquiums.
- Dr. Ashwin Chari gilt der Dank für zahlreiche fachliche Hilfestellungen während der experimentellen Phase dieser Arbeit.
- Ich danke meinem Labor B130, Dr. Nils Neuenkirchen für die gemeinsame Zusammenarbeit, besonders für die Hilfe in Fragen der Enzymkinetik. Jürgen Ohmer möchte ich danken für seine fachliche und freundschaftliche Unterstützung, v.a. bei den letzten Versuchen im Labor. Erhalte dir deine fränkische Freundlichkeit und Heiterkeit, auch wenn ich dir nicht mehr zur Seite stehen kann. Zudem danke ich Dr. Archana Prusty und Rajyalakshmi Meduri für stets freundliche Hilfe im Labor und gutes indisches Essen.
- Farah, Anneli, Tanja, Lissy, Erika, Emilia und Jürgen danke ich für die vielen großen und kleinen Dinge die den Laboralltag wesentlich erleichtert haben.
- Meinen Dank aussprechen möchte ich allen Kollegen des Lehrstuhls für Biochemie für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank geht an all meine Mitstreiter im Erringen des Dokortitels. Über die Jahre des gemeinsamen Leidens sind wir mehr als nur Kollegen geworden und echte Freundschaften sind entstanden, die hoffentlich auch nach meinem Weggang weiterhin bestehen. Dir Schorsch, danke ich für deine Freundschaft, die internationalen Bergtouren, deine Meinung zu Sport, Arbeit und zum Sinn des Lebens.
- Ich möchte meinen Freunden für die Abwechslung neben, die Ablenkung von der Arbeit und generell für die schöne Zeit in Würzburg danken. Danke Daniel, Christina, Lorenz, Christian, Steve, Fritschi, Alex und Simone.
- Ein sportlicher Dank geht an meine Fußballjungs und -mädels für die schönen Stunden auf dem Sportplatz.
- Ich danke meiner Eltern sehr für die Unterstützung während der langen Jahre des Studiums und der Promotion. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.
- Besonderer Dank geht an meiner Frau Katharina für die die Kraft und Liebe über all die Jahre und besonders für die Entlastung in der Endphase der Arbeit.