

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Phänotyp der Spinalen Muskelatrophie.....	1
1.2	Das „Survival of Motor Neurons“ Gen ( <i>SMM</i> ) .....	2
1.3	Genetischer Mechanismus der SMA Pathogenese .....	3
1.4	Initiale Charakterisierung des SMN-Proteins.....	5
1.5	Speißosomale U snRNPs: Funktion, Struktur und Biogenese.....	6
1.5.1	Funktion und Struktur spleißosomaler U snRNPs.....	6
1.5.2	Biogenese von U snRNPs.....	11
1.5.3	Funktion und Struktur der Sm-core-Domäne .....	12
1.5.4	Biogenese der Sm-core-Domäne .....	14
1.6	SMN und SIP1 sind an der Ausbildung der Sm-core-Domäne beteiligt.....	14
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	17
2	Materialien.....	19
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	19
2.2	Plasmide.....	19
2.3	Antikörper und Antiseren .....	19
2.4	Organismen und Zelllinien.....	20
2.5	Zellkulturmedien.....	20
3	Methoden .....	22
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	22
3.1.1	Allgemeine Methoden .....	22
3.1.2	Klonierung von cDNAs.....	22
3.1.3	<i>In vitro</i> Mutagenese .....	24
3.1.4	Klonierung von GIP1 und p175 .....	25
3.1.5	<i>In vitro</i> Transkription von RNA .....	25
3.1.6	3´-Endmarkierung von U snRNA.....	26
3.2	Zellkulturmethoden.....	27
3.2.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	27
3.2.2	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen .....	27
3.3	Immunologische und immunbiochemische Methoden .....	28
3.3.1	Herstellung eines monoklonalen anti-SMN Antikörper .....	28
3.3.2	Herstellung von Antiseren .....	29
3.3.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	29
3.3.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	30
3.3.5	Immunpräzipitationsexperimente.....	31
3.3.6	Immunaffinitätschromatographie .....	31
3.4	Biochemische Methoden .....	32

3.4.1	Proteinexpression.....	32
3.4.2	Affinitätsreinigung von GST-, His-, zz-Fusionsproteinen .....	33
3.4.3	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation.....	33
3.4.4	<i>In vitro</i> Bindungsexperimente.....	34
3.4.5	Präparation von HeLa-Zellextrakten .....	34
3.4.5.1	Präparation von nukleären HeLa-Zellextrakten .....	35
3.4.5.2	Präparation von zytosolischen HeLa-Zellextrakten .....	35
3.4.6	Reinigung von zytosolischen SMN-Komplexen.....	36
3.4.6.1	Analytische Reinigung von CSC I .....	36
3.4.6.2	Präparative Reinigung von CSC I .....	36
3.4.6.3	Analytische Reinigung von CSC II .....	37
3.4.6.4	Präparative Reinigung von CSC II .....	37
3.4.6.5	Gelfiltration von zytosolischen SMN-Komplexen .....	37
3.4.7	Dichtegradientenzentrifugation.....	38
3.4.8	Das <i>Xenopus laevis</i> Oozyten-System .....	38
3.4.8.1	Präparation der Oozyten.....	38
3.4.8.2	Mikroinjektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	39
3.4.8.3	Präparation von Oozytenextrakten.....	39
3.4.8.4	Präparation von <i>Xenopus laevis</i> Eiextrakten .....	40
3.4.9	<i>In vitro</i> Rekonstitution der U snRNP Zusammenlagerung .....	40
3.4.10	Identifikation von Proteinen mittels MALDI-TOF .....	41
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Charakterisierung eines monoklonalen SMN-spezifischen Antikörpers.....	42
4.2	Biochemische Trennung von zytosolischen SMN-Komplexen .....	45
4.2.1	SMN ist <i>in vivo</i> in mehrere makromolekulare Komplexe integriert.....	45
4.2.2	Zytosolische SMN-Komplexe können biochemisch getrennt werden.....	47
4.3	Die Protein-Zusammensetzung von zytosolischen SMN-Komplexen .....	50
4.3.1	Identifizierung von Komponenten des CSC II Komplexes .....	50
4.3.2	Charakterisierung der cDNAs von p175 und p100.....	54
4.4	GIP1/Gemin4, unrip, Hsc70 und p175 sind SMN-assoziierte Proteine .....	56
4.5	CSC II enthält nur die Sm-Proteine der Sm-subcore Domäne .....	60
4.6	Zytosolische SMN-Komplexe sind nicht stabil mit U snRNAs assoziiert.....	62
4.7	Die Interaktion von SMN mit SIP1, mit Sm-Proteinen und sich selbst erfolgt durch verschiedene Domänen .....	62
4.7.1	SMN besitzt eine N-terminale Oligomerisierungsdomäne .....	65
4.7.2	SMN enthält zwei N-terminale Bindungsstellen für SIP1 .....	65
4.7.3	Sm-Proteine binden an die Tudor-Domäne von SMN .....	67
4.8	SMN mit einer SMA verursachenden Punktmutation in der Tudor Domäne bindet nicht an Sm-Proteine .....	68
4.9	Antikörper gegen die Tudor-Domäne von SMN inhibieren die U snRNP Zusammenlagerung <i>in vivo</i> .....	71

---

4.10	Die NMR-Struktur der Tudor-Domäne von SMN .....	76
4.11	Die Zusammenlagerung der Sm-core-Domäne <i>in vitro</i> .....	83
5.	Diskussion.....	89
5.1	SMN ist ein essentieller U snRNP Zusammenlagerungs-faktor .....	89
5.1.1	Die Tudor-Domäne von SMN bindet direkt an Sm-Proteine .....	89
5.1.2	Die Struktur der Tudor-Domäne von SMN.....	91
5.1.3	Die Funktion der Tudor-Domäne bei der Bildung der ..... Sm-core-Domäne von U snRNPs.....	94
5.2	Die Zusammensetzung von CSCII deutet auf eine Rolle bei der Zusammenlagerung von U snRNPs hin.....	97
5.2.1	CSCII ist ein strukturell intakter, einzelner Komplex mit mindestens 14 Proteinkomponenten.....	97
5.2.2	CSCII enthält neue SMN-assoziierte Proteine .....	98
5.2.3	Die Struktur des CSCII Komplexes ist für SMN-Komplexe repräsentativ.....	100
5.2.4	CSCII ist wahrscheinlich an der Ausbildung der Sm-core-Domäne beteiligt.....	101
5.2.5	Nukleäre SMN-Komplexe enthalten auch Sm-Proteine.....	103
5.3	Die <i>in vitro</i> Rekonstitution von U snRNPs erlaubt die Analyse der genauen Funktion von SMN-Komplexen.....	104
5.4	Hypothesen zur Funktion von SMN bei der Bildung der Sm-core-Domäne .....	106
5.5	Spinale Muskelatrophie und SMN.....	107
6	Zusammenfassung/Summary .....	110
6.1	Zusammenfassung.....	110
6.2	Summary .....	112
7	Literaturverzeichnis.....	114
8	Anhang.....	124
8.1	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge .....	124
8.2	Danksagung.....	126
9	Abkürzungsverzeichnis .....	127