

# 1 Einleitung

## 1.1 Phänotyp der Spinalen Muskelatrophie

Proximale Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine neurodegenerative, häufig tödliche Erkrankung des Menschen (Crawford und Pardo, 1996; Pearn, 1978; Roberts *et al.*, 1970). Sie ist mit einer Inzidenz von 1 bei 10000 Lebendgeburten nach Zystischer Fibrose die zweithäufigste, autosomal rezessiv vererbte Krankheit mit Todesfolge (Lefebvre *et al.*, 1998). Gekennzeichnet ist sie durch eine progressive Degeneration der Motoneuronen des Rückenmarks. Diese Degeneration bewirkt eine symmetrische Muskelatrophie und Lähmungserscheinungen der Gliedmaßen sowie des Rumpfes, was in den meisten Fällen zum Tod der Patienten durch Atmungsausfall führt. Man unterscheidet drei verschiedene Typen der SMA, deren Klassifizierung auf der verschieden starken Ausprägung der Symptome und dem Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs beruht. Patienten mit Typ I SMA (auch Werdnig-Hofmann-Krankheit) zeigen erste Symptome innerhalb der ersten sechs Lebensmonate, lernen nie zu sitzen und sterben vor dem 4. Lebensjahr. Typ II SMA Patienten (Juvenile Form der SMA) zeigen Muskelatrophie-Anzeichen innerhalb der ersten 18 Monate. Sie erlernen zwar dann noch das Sitzen, können aber ohne fremde Hilfe weder stehen noch gehen und sterben in der Regel vor Eintritt ins Erwachsenenalter. Im Gegensatz zur juvenilen Form der SMA entwickeln sich Typ III SMA Patienten (Kugelberg-Welander-Krankheit) während der ersten 18 Monate noch normal. Viele dieser Patienten erreichen das Erwachsenenalter und können selbständig sitzen und gehen. Trotz der unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen wurde durch molekulare Kopplungsanalyse nachgewiesen, daß sich alle drei SMA Typen genetisch homogen verhalten, d. h. durch Mutationen im gleichen Gen-Lokus verursacht werden (Brzustowicz *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1990).

## 1.2 Das „Survival of Motor Neurons“ Gen (*SMN*)

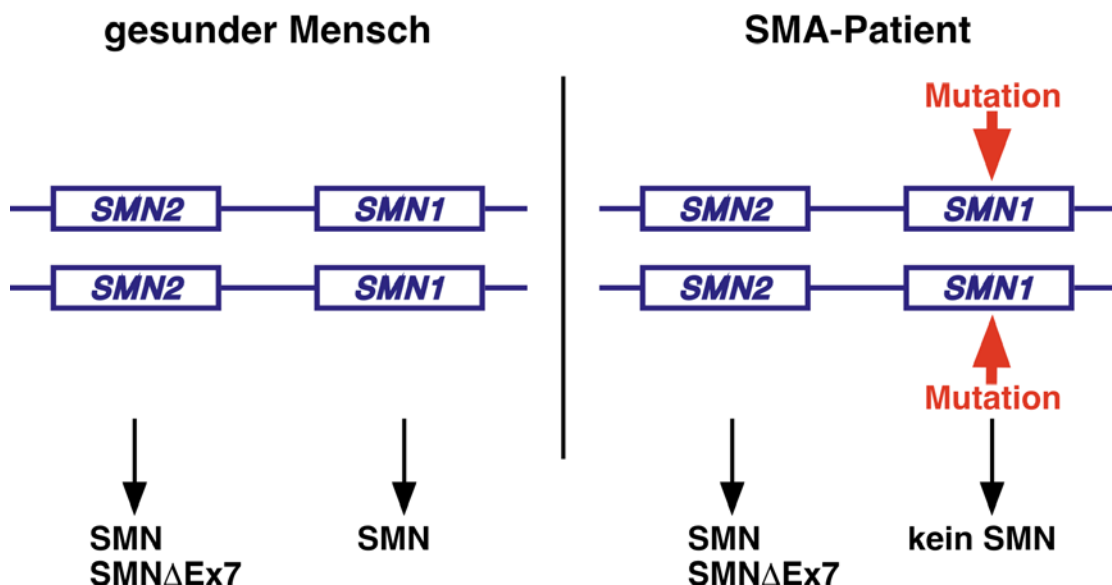
Positionelle Klonierungsstrategien zur Identifizierung des Krankheitsgens der SMA führten 1995 zur Eingrenzung eines 750 kb großen Bereichs auf Chromosom 5 (5q13) (Brzustowicz *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1990). Diese Region enthält einen duplizierten und invertierten Bereich, der aus mindestens vier Genen besteht, die alle in einer telomeren und zentromeren Kopie vorkommen. Zwei dieser Gene zeigen bei vielen SMA-Patienten systematische Änderungen wie Mutationen und Deletionen: das *Survival of Motor Neurons* Gen (*SMN1* und *SMN2*; Lefebvre *et al.*, 1995) und das *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein* Gen (*NAIP* und *ΨNAIP*; Roy *et al.*, 1995).

Homozygote Deletionen im *SMN1* Gen findet man in über 95% aller SMA-Patienten, unabhängig von welcher Form der Krankheit sie betroffen sind. In 4% aller Fälle beobachtet man Punktmutationen in *SMN1*, die zur Krankheit führen, wenn die andere *SMN1* Kopie Deletionen aufweist (Lefebvre *et al.*, 1995). Mutationen im *NAIP* Gen treten dagegen mit geringerer Häufigkeit auf. Da SMA Patienten identifiziert werden konnten, die nur in *SMN1*, aber nicht in *NAIP* Änderungen aufweisen, ist es heute erwiesen, daß *SMN1* und nicht *NAIP* das SMA Krankheitsgen ist (Wirth, 2000).

Bei nahezu allen SMA-Patienten wurden Mutationen im *SMN1* Gen nachgewiesen. Individuen, die homozygote Veränderungen in *SMN2* tragen, sind dagegen klinisch unauffällig (Wirth, 2000). *SMN1* und *SMN2* umfassen neun Exons (Exons 1, 2a, 2b, 3-8), sind auf DNA-Ebene zu 99% identisch und kodieren für Proteine mit identischer Aminosäuresequenz (Lefebvre *et al.*, 1995). Es stellte sich daher die Frage, warum *SMN2* den Verlust der *SMN1* Kopie nicht aufwiegen kann, wenn dies im umgekehrten Fall möglich ist.

### 1.3 Genetischer Mechanismus der SMA Pathogenese

Mittlerweile sind die molekularen Unterschiede zwischen dem *SMN1* und *SMN2* Gen bekannt, die zum Ausbruch der SMA führen (Abb. 1.1). Die Sequenzen der beiden *SMN*-Kopien unterscheiden sich in fünf Nukleotiden, von denen drei in Introns und zwei in Exons liegen. Einer der fünf Unterschiede zwischen *SMN1* und *SMN2* ist eine C-T Substitution im Exon 7 von *SMN2*. Diese Substitution liegt innerhalb eines sogenannten „Exonic Splicing Enhancer“ (ESE). Dabei handelt es sich um ein Motiv, das in die Regulation des alternativen Spleißens involviert ist. Der C-T Austausch beeinträchtigt die Funktion dieses regulatorischen Motivs dahingehend, daß die *SMN2* mRNA konstitutiv am Exon 7 alternativ gespleißt wird und damit hauptsächlich eine C-terminal verkürzte Version von SMN exprimiert wird (*SMN $\Delta$ Ex7*) (Lefebvre *et al.*, 1997; Lorson und Androphy, 2000; Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999). Experimentelle Daten zeigen, daß diese Form von SMN weniger stabil ist (Lorson und Androphy, 2000). Bei SMA-Patienten reicht die Menge funktionelles SMN, die durch *SMN2* exprimiert wird, anscheinend nicht aus, um das defekte *SMN1*-Genprodukt vollständig zu ersetzen.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der genetischen Situation bei gesunden Menschen und SMA-Patienten.

Demnach beruht SMA auf einem Gen-Dosis-Defekt, d. h. die Krankheit ist Folge einer verminderten Expression von SMN und nicht dem völligen Verlust des *SMN* Gens. Entsprechend sind keine SMA Patienten identifiziert worden sind, die homozygote Deletionen und/oder Mutationen in *SMN1* und *SMN2* tragen (Wirth, 2000). Die unterschiedlich starken Phänotypen der Krankheit korrelieren mit der Menge an exprimiertem, funktionellem SMN. Bei Typ III SMA Patienten werden z. B. sowohl Duplikationen des *SMN2* Gens als auch Konversionen von *SMN1* zu *SMN2* beobachtet. Diese Patienten verfügen damit über einen vergleichsweise hohen Grad an SMN und die Krankheitssymptome treten in relativ milder Form auf (Jablonka *et al.*, 2000; Wirth, 2000).

Die Gen-Dosis-Hypothese konnte durch die Analyse des *SMN* Gens in anderen Eukaryonten bestätigt werden. Genetische Studien an Organismen, die nur eine Genkopie von *SMN* tragen, zeigten, daß SMN ein essentielles Gen ist. Werden *YAB8*, das *SMN1* Homolog der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* bzw. das *SMN1* Homolog des Nematoden *Caenorhabditis elegans* entfernt, sind diese Organismen nicht lebensfähig (Hannus *et al.*, 2000; Miguel-Aliaga *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2000; Paushkin *et al.*, 2000). In analoger Weise bewirkt die Disruption des *Smn* Gens in der Maus einen letalen Phänotyp, der bereits während der Embryonalentwicklung vor Beginn des Blastozysten-Stadiums auftritt (Schrack *et al.*, 1997).

Interessanterweise kann die humane *SMN2* Kopie die frühe embryonale Sterblichkeit von *Smn*<sup>-/-</sup> Mäusen aufheben (Frugier *et al.*, 2000; Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000). Solche transgenen Mäuse ähneln mit ihrem Genotyp *Smn*<sup>-/-</sup>*SMN2* der genetischen Situation beim menschlichen Patienten und entwickeln postnatal Symptome, die für Typ I SMA charakteristisch sind. Wird in diesen Mäusen die Kopienanzahl des *SMN2* Gens und damit die Expression an volle Länge SMN erhöht, sind die SMA-ähnlichen Symptome weniger ausgeprägt (Monani *et al.*, 2000).

## 1.4 Initiale Charakterisierung des SMN-Proteins

Die Identifizierung von *SMN* ermöglichte die Analyse der zellulären Funktion des SMN-Proteins und damit auch der molekularen Ursachen der SMA. In initialen Experimenten zur Charakterisierung von SMN wurde gezeigt, daß das *SMN* Gen ubiquitär exprimiert wird, was ein Hinweis auf eine generelle zelluläre Funktion des Proteins ist („housekeeping gene“) (Liu und Dreyfuss, 1996). In somatischen Zellen ist es sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, wo es in distinkten, subnukleären Strukturen, den „Gems“, konzentriert ist (Liu und Dreyfuss, 1996). Gems (Gemini of Coiled Bodies) finden sich in der unmittelbaren Nachbarschaft von anderen Kernstrukturen, „Coiled Bodies“, und können in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand der Zelle mit diesen verschmelzen (Carvalho *et al.*, 1999; Liu und Dreyfuss, 1996). Darüber hinaus wurde ein SMN interagierendes Protein (SIP1) identifiziert. SMN und SIP1 interagieren *in vitro* und *in vivo* mit hoher Affinität und kolo-kalisieren im Zytoplasma sowie in Gems (Liu *et al.*, 1997). Diese Daten deuteten auf eine funktionell relevante Interaktion der beiden Proteine in der Zelle hin. Da aber eine Sequenzanalyse für SMN und SIP1 keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen ergab und auch für Gems keine Funktion bekannt war, blieb eine mögliche zelluläre Funktion von SMN und SIP1 zunächst unklar.

Dies änderte sich, als untersucht wurde, ob SMN und SIP1 *in vivo* spezifisch mit RNAs assoziiert sind. Fischer *et al.* (1997) konnten durch Injektionsexperimente in *Xenopus laevis* Oozyten zeigen, daß aus einer Mischung von verschiedenen RNA-Klassen (mRNA, tRNA, rRNA, U snRNA) spezifisch nur Vertreter der U snRNAs (engl.: Uridine rich small nuclear RNA) mit anti-SMN und anti-SIP1-Antikörpern ko-präzipitiert werden. Zusätzlich konnten mit diesen Antikörpern aus HeLa-Zellextrakten makromolekulare Komplexe präzipitiert werden, die neben SMN und SIP1 unter anderem spleißosomale Sm-Proteine und das U1A-Protein enthielten (Liu *et al.*, 1997). Sm-Proteine sind *in vivo* mit U snRNAs in Form von U snRNPs (engl.: Uridine

rich small nuclear Ribonucleoprotein particles) assoziiert (Mattaj, 1988). Diese Experimente deuteten erstmals auf eine Rolle von SMN im Metabolismus von U snRNAs hin. Daher soll zunächst auf die Struktur und die Biogenese von U snRNPs eingegangen werden.

## **1.5 Speißosomale U snRNPs: Funktion, Struktur und Biogenese**

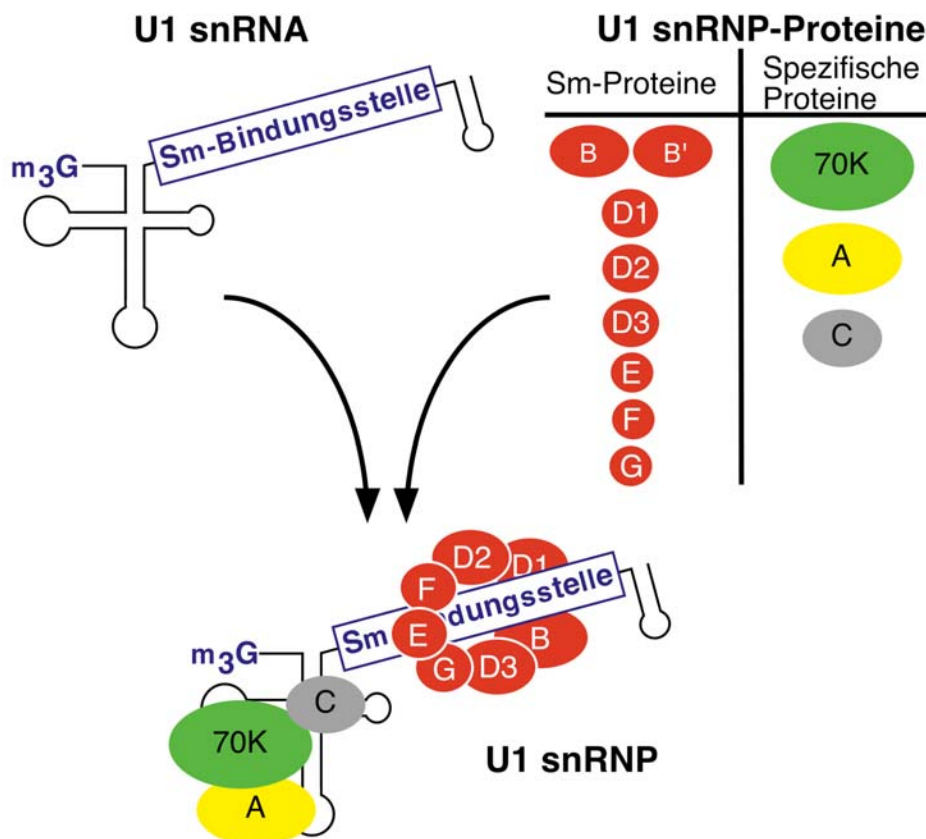
### **1.5.1 Funktion und Struktur spleißosomaler U snRNPs**

Ein grundlegender Schritt bei der Expression genetischer Information in höheren Eukaryonten ist die Prozessierung von mRNA-Vorläufermolekülen (prä-mRNA) zu reifen mRNAs im Zellkern. Nur korrekt prozessierte, reife mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert und an den Ribosomen zu funktionellen Proteinen translatiert. Der Spleißprozess nimmt unter den verschiedenen nukleären Prozessierungsschritten einer prä-mRNA eine zentrale Rolle ein. Durch zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungsreaktionen werden die Introns der prä-mRNA entfernt und die Exons zu einer reifen mRNA verknüpft. Die energieabhängige Spleißreaktion wird durch das Spleißosom katalysiert, einen ca. zwei Megadalton großen Ribonukleoprotein-Komplex, der aus U snRNPs und ca. 100 zusätzlichen Proteinen besteht, die nicht stabile Komponenten der U snRNPs sind (Kramer, 1996; Staley und Guthrie, 1998).

Vier unterschiedliche U snRNPs sind Bestandteile des Spleißosoms und werden entsprechend ihrem RNA-Anteil als U1, U2, U4/U6 und U5 snRNP bezeichnet (Will und Luhrmann, 2001). Die U snRNAs höherer Eukaryonten weisen bei einer Länge von 100-250 Nukleotiden eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf (Abb. 1.2 und 1.3). Mit Ausnahme der U6 snRNA besitzen sie zwei gemeinsame Merkmale, die schematisch am Beispiel der U1 snRNA in Abb. 1.3 gezeigt sind. Charakteristisch ist zunächst eine 5'-terminale Struktur, die Trimethylguanosin ( $m_3^{2,2,7}$ G-Cap) enthält und als  $m_3$ G-Cap bezeichnet wird (Mattaj, 1986). Des Weiteren enthalten diese RNAs die einzelsträngige, Uridin-



Die Proteine, die an diese U snRNAs binden, lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen unterteilen (siehe Abb. 1.3 und Tabelle 1.1). In den U1, U2, U4/U6 und U5 snRNPs wird ein Satz von gemeinsamen Sm-Proteinen gefunden, die mit SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G bezeichnet werden (siehe Abb. 1.2 und 1.3; Will und Luhrmann, 2001). Allen Sm-Proteinen ist ein N-terminales, phylogenetisch konserviertes Sm-Sequenzmotiv gemeinsam, das aus zwei Segmenten, Sm1 und Sm2, besteht, die durch einen Bereich unterschiedlicher Länge voneinander getrennt sind (Hermann *et al.*, 1995; Seraphin, 1995). Aus elektronenmikroskopischen und biochemischen Studien weiß man, daß die Sm-Proteine in Form eines heptameren Rings an die Sm-Bindungsstelle der U snRNA binden (Camasses *et al.*, 1997; Kastner *et al.*, 1990; Raker *et al.*, 1996). Dadurch wird ein strukturelles Grundgerüst, die Sm-core-Domäne, gebildet, das allen spleißosomalen U snRNPs gemeinsam ist (siehe 1.5.3).



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Zusammensetzung des U1 snRNP. Gezeigt ist die U1 snRNA mit dem 5'-terminalen m<sub>3</sub>G-Cap und der Sm-Bindungsstelle. Die Sm-Proteine binden in Form eines heptameren Ringes an die Sm-Bindungsstelle, während die U snRNP spezifischen Proteine mit den Haarnadel-Sekundärstrukturen interagieren.



Neben den Sm-Proteinen enthalten die verschiedenen U snRNPs spezifische Proteine (Tabelle 1.1), von denen einige direkt mit den für die einzelnen U snRNAs charakteristischen Sekundärstrukturen interagieren, andere hingegen über Protein-Protein Wechselwirkungen in die Partikel integriert werden (siehe Abb. 1.3 als ein Beispiel für die Struktur des U1 snRNP). Die spezifischen Proteine verleihen den verschiedenen U snRNPs ihre charakteristische Struktur und sind zum Teil direkt an den spezifischen Funktionen der U snRNPs während des Speißprozesses beteiligt (Stark *et al.*, 2001; Will und Luhrmann, 1997).

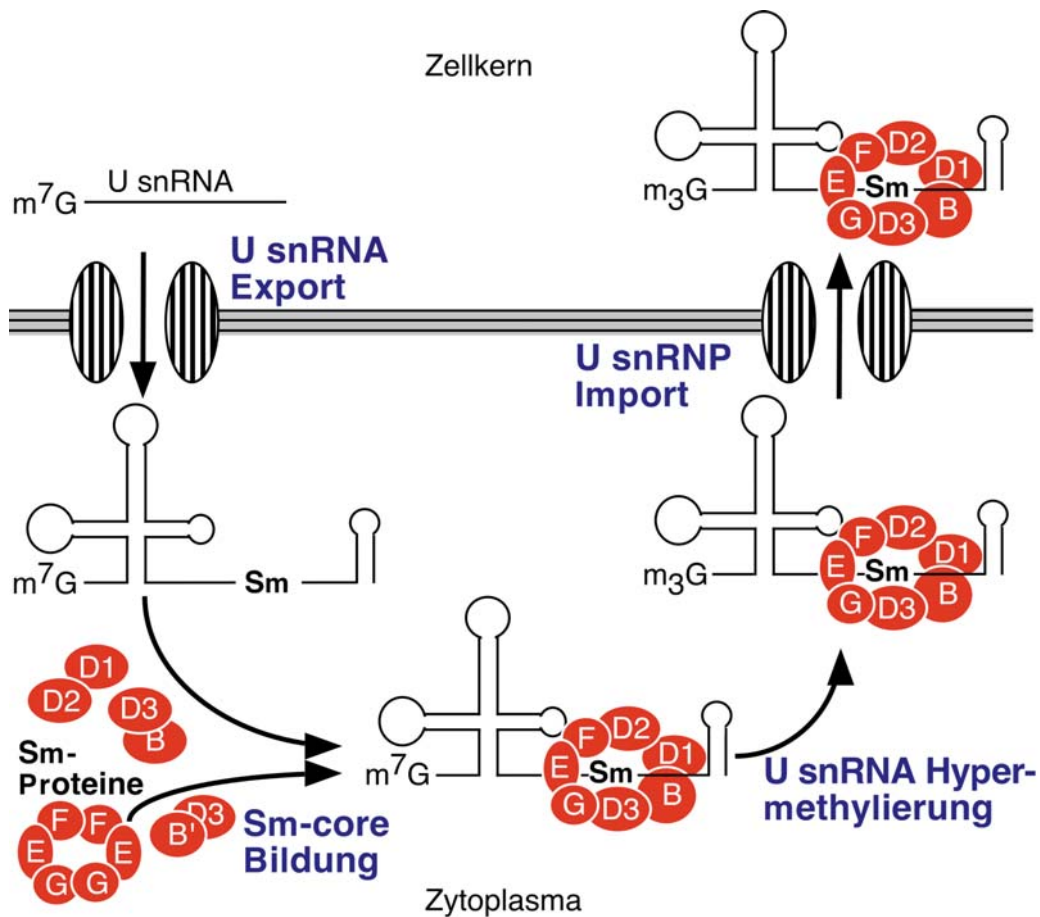
Das U6 snRNP unterscheidet sich sowohl hinsichtlich der eben erwähnten Strukturmerkmale seiner RNA als auch in der Protein-Zusammensetzung von den anderen spleißosomalen U snRNPs. Die U6 snRNA wird an ihrem 5'-Ende an der  $\gamma$ -Phosphat Gruppe methyliert („ $\gamma$ -me-Cap“) (Singh und Reddy, 1989). Sie besitzt zudem keine Sm-Bindungsstelle und bindet nicht an Sm-Proteine. Statt dessen enthält das U6 snRNP die LSm-Proteine Lsm2 bis Lsm8 („Like-Sm“-Proteine), deren N-Terminus das Sm-Sequenzmotiv enthält (Achsel *et al.*, 1999). In paarweisen Sequenzvergleichen kann jedem der Sm-Proteine SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G eines der LSm-Proteine als Gegenstück zugeordnet werden. Interessanterweise bilden die LSm-Proteine Lsm2 bis 8 ebenfalls eine heptamere Ringstruktur, die sich an das Uridin-reiche 3'-Ende der U6 snRNA anlagert. Das U6 snRNP Partikel besitzt damit eine der Sm-core-Domäne ähnliche Grundstruktur (Achsel *et al.*, 1999).

Name	appM <sub>R</sub> kDa	Vorhanden in snRNP Partikel				
		12S U1	17S U2	20S U5	12S U4/U6	25S U4/U6.U5
SmG	9	●	●	●	●	●
SmF	11	●	●	●	●	●
SmE	12	●	●	●	●	●
SmD1	16	●	●	●	●	●
SmD2	16,5	●	●	●	●	●
SmD3	18	●	●	●	●	●
SmB	28	●	●	●	●	●
SmB'	29	●	●	●	●	●
C	22	●				
A	34		●			
70K	70	●				
B''	28,5		●			
A'	31		●			
	33		●			
	35		●			
	53		●			
	60		●			
	66		●			
	92		●			
	110		●			
	120		●			
	150		●			
	160		●			
	15			●		●
	40			●		●
	52			●		●
	100			●		●
	102			●		●
	110			●		●
	116			●		●
	200			●		●
	205			●		●
	60				●	●
	90				●	●
	15,5					●
	20					●
	27					●
	61					●
	63					●

**Tabelle 1.1:** Protein-Zusammensetzung spleißosomaler, humaner U snRNPs. Die Tabelle zeigt die U allen snRNPs gemeinsamen Sm-Proteine SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G sowie die spezifischen Proteine in den verschiedenen U snRNPs. Apparente Molekulargewichte (appM<sub>R</sub>) sind in kiloDalton angegeben (nach Will und Luhrmann, 1997).

### 1.5.2 Biogenese von U snRNPs.

Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten haben gezeigt, daß die Biogenese der U snRNPs ein komplexer Vorgang ist, der im Zellkern und im Zytoplasma abläuft (Abb. 1.4; Mattaj, 1988). Zunächst wird die neu transkribierte und m<sup>7</sup>G-modifizierte U snRNA vom Kern ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma liegen die Sm-Proteine z. T. in Form von hochmolekularen Komplexen im großen Überschuß über der neu synthetisierten U snRNA vor und assoziieren mit dieser unter Ausbildung der Sm-core-Domäne (Zeller *et al.*, 1983). Anschließend folgen Prozessierungen und Modifikationen der U snRNA, einschließlich einer Verkürzung des 3'-Endes sowie der Ausbildung der m<sub>3</sub>G-Cap-Struktur (Mattaj, 1986; Yang *et al.*, 1992).



**Abb. 1.4:** Biogenese spleißosomaler U snRNPs in *Xenopus laevis* Oozyten. Der Ablauf der Ereignisse ist schematisch dargestellt. Im Kern transkribierte U snRNAs assoziieren im Zytoplasma mit Sm-Proteinen und werden anschließend hypermethyliert. Danach erfolgt der Transport der muren Partikel in den Zellkern. Die Integration der spezifischen Proteine in die Partikel ist nicht gezeigt.

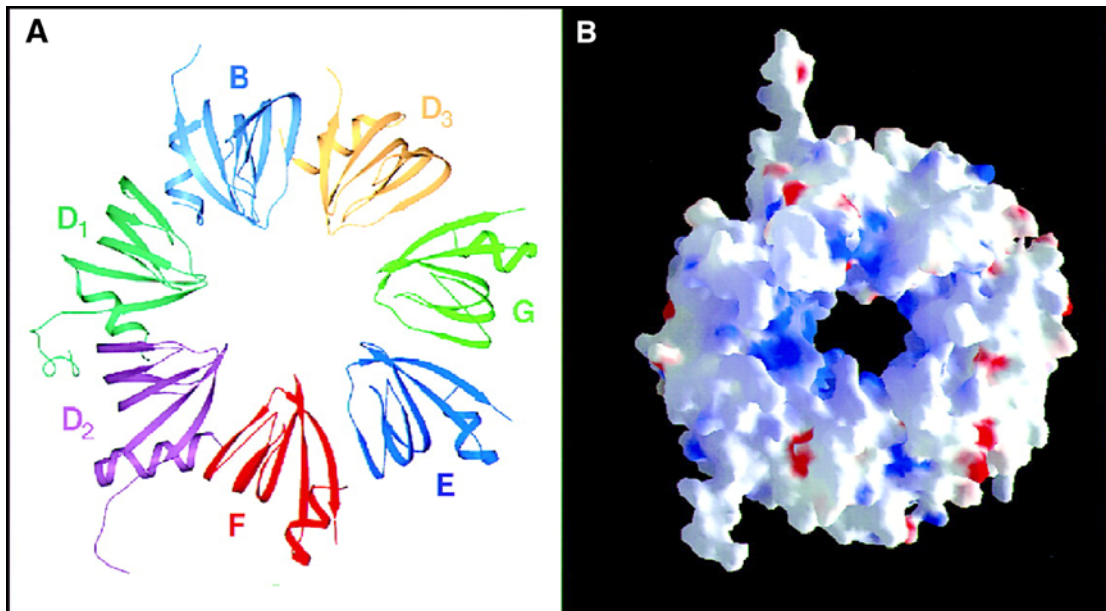
Diese letztere, als Hypermethylierung bezeichnete Modifikation ist strikt von der vorherigen Ausbildung der Sm-core-Domäne abhängig (Mattaj, 1986). Die zusammengelagerten und prozessierten U snRNPs werden schließlich in den Zellkern transportiert (Fischer *et al.*, 1993). Zu welchem Zeitpunkt die U snRNP spezifischen Proteine in die Partikel eingebaut werden, ist momentan noch unklar. Die Biogenese des U6 snRNP läuft wahrscheinlich ausschließlich im Zellkern ab (Boelens *et al.*, 1995; Terns *et al.*, 1993).

### 1.5.3 Funktion und Struktur der Sm-core-Domäne

Die Sm-core-Domäne ist an verschiedenen Aspekten der Funktion von U snRNPs beteiligt. Ihre Bildung ist eine Voraussetzung für die Hypermethylierung des 5'-Endes der U snRNAs, indem sie wahrscheinlich als Bindungsstelle für eine trans-aktive Methyltransferase dient (Mattaj, 1986; Plessel *et al.*, 1994). Zusätzlich bildet sie einen Teil des bipartiten Kernlokalisierungssignals von U snRNPs und beeinflusst die Integration einiger der spezifischen Proteine in die U snRNPs (Fischer und Luhrmann, 1990; Hamm, 1990; Nelissen *et al.*, 1994). Erst vor kurzem wurde für die Sm-Proteine SmB/B', D1 und D3 zusätzlich eine direkte Funktion im Spleißprozess vorgeschlagen (Zhang *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den Sm-Proteinen SmD2, E, F und G, die praktisch nur aus den N-terminalen Sequenzmotiven Sm1 und Sm2 bestehen, besitzen die Sm-Proteine SmB/B', SmD1 und SmD3 ausgeprägte C-Termini. Diese C-Termini enthalten Arginin und Glycin reiche Dipeptidsequenzen, die in maturen U snRNPs symmetrisch am Arginin dimethyliert sind, und beeinflussen die Assoziation des U1 snRNP mit der prä-mRNA (Brahms *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001). Somit könnte die Sm-core-Domäne auch selbst in den Spleißprozeß involviert sein.

Unter strukturellen Gesichtspunkten bildet die Sm-core-Domäne das Grundgerüst, das allen U snRNPs gemeinsam ist (Will und Luhrmann, 2001). Mittlerweile ist die Röntgenstruktur der beiden Sm-Proteinkomplexe SmB/B'.D3 und SmD1.D2 gelöst worden (Kambach *et al.*, 1999). Die N-

terminalen Sm-Motive aller vier Sm-Proteine nehmen eine identische Faltung ein. Außerdem ist die Anordnung der Proteine innerhalb der Dimere nahezu gleich. Aufbauend auf diesen Strukturen und einer Vielfalt biochemischer, genetischer und elektronenmikroskopischer Daten ist ein Strukturmodell vorgeschlagen worden, nach dem die Sm-Proteine mittels ihrer Sm-Motive zu einem heptameren Ring oligomerisieren (Abb. 1.5 A; Kambach *et al.*, 1999). Die Sm-Bindungsstelle der U snRNA verläuft durch die zentrale Öffnung des Rings und interagiert mit der positiv geladenen Oberfläche auf dessen Innenseite (Abb. 1.5 B). Wie durch Quervernetzungsexperimente gezeigt wurde, treten nur die beiden Sm-Proteine SmB/B' und SmG mit Uridylresten der Sm-Stelle in direkten Kontakt (Urlaub *et al.*, 2001). Die C-Termini von SmB/B', SmD1 und SmD3 ragen wahrscheinlich aus der Ringstruktur nach außen.



**Abb. 1.5:** Strukturmodell der Sm-core Domäne.

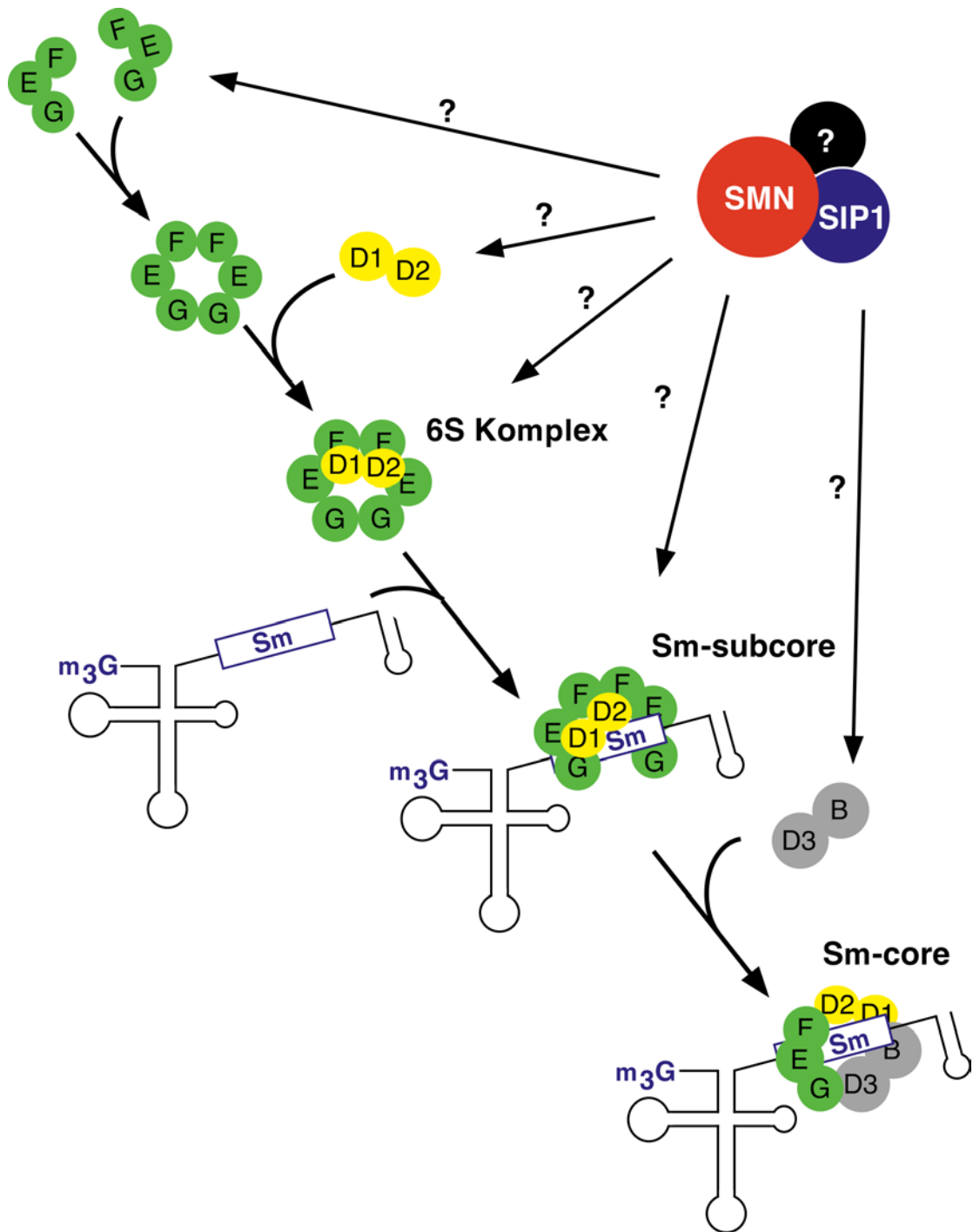
A. Die Anordnung der sieben Sm-Proteine zu einem heptameren Ring beruht auf den Kristallstrukturen der Sm-Protein Dimere SmB/B'.D3 und SmD1.D2 sowie einer Vielzahl biochemischer und genetischer Daten (Kambach *et al.*, 1999). Die sieben Sm-Proteine assoziieren über ihre N-terminalen Sm-Motive, während die C-Termini wahrscheinlich aus der Ringstruktur ragen. Durch die innere Ringöffnung verläuft die U snRNA und kontaktiert die Sm-Proteine SmB/B' und SmG. Die Kontakte der RNA mit diesen Sm-Proteinen sind durch Pfeile angedeutet. B. Oberflächenladungsverteilung der Sm-core Domäne. Positive Ladungsbereiche sind blau, negative Bereiche sind rot dargestellt.

#### 1.5.4 Biogenese der Sm-core-Domäne

Die Ausbildung der Sm-core-Domäne kann konzeptionell in verschiedene Schritte zerlegt werden (Abb. 1.6). Keines der Sm-Proteine ist in der Lage, alleine an die Sm-Stelle der U snRNA zu binden. Vielmehr bilden die Sm-Proteine SmE, F und G zunächst einen hexameren (E.F.G)<sub>2</sub> und die Sm-Proteine D1 und D2 einen dimeren Komplex (D1.D2) (Raker *et al.*, 1996). Diese Heterooligomere assoziieren und bilden erst dadurch eine Bindungsoberfläche, mit der die U snRNA wechselwirken kann. Dieser Komplex wird als Sm-subcore-Struktur bezeichnet. Durch Anlagerung des Heterodimers SmB.D3 wird der Sm-Protein Ring geschlossen und die Sm-core-Domäne vervollständigt (Raker *et al.*, 1996). Übereinstimmend mit dieser Reihenfolge der Zusammenlagerung, die durch *in vitro* Experimente ermittelt wurde, konnte gezeigt werden, daß während der Zusammenlagerung *in vivo* ein Komplex bestehend aus SmE, F, G, D1 und D2 gebildet wird. Dieser Komplex ist nicht mit U snRNAs assoziiert und wird aufgrund seines Sedimentationsverhaltens als „6S“-Komplex bezeichnet (Fisher *et al.*, 1985). Zusätzlich wurden Komplexe nachgewiesen, die spezifisch SmB und SmD3 enthalten (Fisher *et al.*, 1985). Die *in vitro* Assoziation einer U snRNA mit gereinigten Sm-Proteinen zur Sm-core-Domäne ist ein spontaner Prozeß, d. h. sie bedarf keiner weiteren Faktoren (Raker *et al.*, 1999). Ob dies auch für die Ausbildung der Sm-core-Domäne *in vivo* gilt, war bis vor kurzem nicht untersucht.

#### 1.6 SMN und SIP1 sind an der Ausbildung der Sm-core-Domäne beteiligt

Die Beobachtung, daß SMN und SIP1 in *Xenopus laevis* Oozyten mit U snRNAs und spleißosomalen Sm-Proteinen assoziiert vorliegen, deutete erstmals auf eine mögliche Rolle dieser Proteine bei der Reifung von U snRNPs hin (Fischer *et al.*, 1997); Liu *et al.*, 1997). Mehrere experimentelle Beobachtungen erhärteten diese Hypothese.



**Abb. 1.6:** Zusammenlagerung der Sm-core Domäne.

Die Reihenfolge der Zusammenlagerung ist aus *in vitro* und *in vivo* Daten abgeleitet worden. Die Sm-Heterooligomere (E.F.G) assoziieren zu einem hexameren Komplex (E.F.G)<sub>2</sub>, der dann mit dem SmD1.D2 Dimer interagiert (6S-Komplex). Dieser Komplex bindet an die Sm-Stelle der U snRNA (Sm-subcore) und wird durch Integration des SmB/B'.D3 Dimers zur Sm-core Domäne vervollständigt. An diesem Prozeß sind wahrscheinlich SMN, SIP1 und andere Proteine beteiligt.

Die Bildung von U snRNPs findet in Oozyten zu großen Teilen im Zytoplasma statt. Übereinstimmend damit lokalisieren SMN und SIP1 in Oozyten vorwiegend im Zytoplasma (Fischer *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß der SMN-Komplex im Zytoplasma von Oozyten nur transient mit U snRNPs interagiert. Wandert das zusammengelagerte U snRNP Partikel in den Zellkern, dissoziieren SMN und SIP1 von diesem ab (Fischer *et al.*, 1997). Vor allem aber interferierten SIP1 spezifische Antikörper nach Injektion ins Zytoplasma von *Xenopus laevis* Oozyten mit der Ausbildung der Sm-core-Domäne. Damit konnte mit SIP1 erstmals ein Faktor identifiziert werden, der direkt an der zytoplasmatischen Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* beteiligt ist (Fischer *et al.*, 1997). Die Funktion von SMN bei diesem Prozeß ist weniger gut untersucht. Allerdings läßt die starke Interaktion von SMN und SIP1 eine verwandte Funktion von SMN in diesem Kontext erwarten. Diese Annahme wird durch Experimente gestützt, in denen die *in vivo* Interaktion von SMN und SIP1 unterbunden wurde. In solchen Zellen kommt es zu einer gravierenden Umverteilung von Sm-Proteinen im Zytoplasma, was ein Hinweis auf eine beeinträchtigte U snRNP Biogenese ist (Pellizzoni *et al.*, 1998).

Möglicherweise ist der SMN-Komplex auch an anderen zellulären Prozessen beteiligt. In somatischen Zellen lokalisiert SMN nicht nur im Zytoplasma sondern auch in Gems im Zellkern (Liu and Dreyfuss, 1996). Es gibt Hinweise, daß SMN in den nukleären Spleißprozeß selbst involviert ist, indem es für die Aufarbeitung von Faktoren, die bereits am Spleißprozess teilgenommen haben, verantwortlich ist („recycling“-Funktion) (Pellizzoni *et al.*, 1998; Meister *et al.*, 2000). SMN könnte ebenfalls eine Rolle in der Transkription spielen. *In vitro* bindet SMN an den Transkriptionsaktivator E2 des Papillomavirus und beeinflusst die E2-abhängige Transkription (Strasswimmer *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde eine Interaktion von SMN mit Faktoren der zellulären Transkriptionsmaschinerie, unter anderem RNA-Polymerase II und RNA-Helicase A, nachgewiesen (Pellizzoni *et al.*, 2001). Ob diese Interaktionen *in vivo* funktionell relevant sind, ist momentan unklar.



## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Ausbildung der Sm-core-Domäne von U snRNPs *in vitro* verläuft spontan, d. h. sie bedarf keiner assistierenden Faktoren. Diese Erkenntnis beruht auf Untersuchungen zur Wechselwirkung von *in vitro* transkribierten U snRNAs mit gereinigten Sm-Proteinen (Raker *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu deuteten Antikörper-Inhibitionsexperimente darauf hin, daß die Bildung von U snRNPs *in vivo* von SIP1 und sehr wahrscheinlich auch anderen Faktoren wie z. B. SMN abhängig ist (Fischer *et al.*, 1997). Der Nachweis für eine direkte Beteiligung von SMN an diesem Prozeß stand aber aus. Ebenso unklar war, an welchen mechanistischen Aspekten dieses Vorgangs SMN und SIP1 beteiligt sind und welches die funktionellen Beiträge der beiden Proteine sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die putative Funktion von SMN während der U snRNP Biogenese und die mechanistischen Aspekte dieses Prozesses detailliert zu charakterisieren. Diese Analyse war insbesondere vor dem Hintergrund, daß Mutationen in SMN zur SMA führen, von großem Interesse. Es stellte sich die Frage, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen Defekten in der U snRNP Biogenese und der SMA-Pathogenese gibt. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurde folgende experimentelle Strategie gewählt:

Es gab experimentelle Hinweise, daß SMN *in vivo* in makromolekulare Komplexe integriert ist (SMN-Komplexe). Als Voraussetzung für die Durchführung von funktionellen Studien zur U snRNP Biogenese sollten daher zunächst SMN-Komplexe biochemisch gereinigt und ihre Protein-Zusammensetzung bestimmt werden. Diese Experimente sind im ersten Teil der Arbeit dargestellt.

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, wie die SMN-Komplexe auf molekularer Ebene organisiert sind und ob bestimmten Interaktionen spezifische Funktionen während der Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* zukommen. Besonderes Gewicht wurde dabei auf die biochemische Analyse der Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen gelegt. Die strukturelle Grundlage

dieser Wechselwirkung wurde zudem in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Sattler (EMBL, Heidelberg) durch NMR-Studien untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind im zweiten Teil der Arbeit dargestellt.

Um die genauen mechanistischen und energetischen Aspekte der Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* auszuarbeiten, mußte ein experimentelles System aufgebaut werden, das die *in vitro* Rekonstitution von U snRNPs in einer SMN-abhängigen Weise erlaubt. Mit Hilfe dieses System sollten dann die funktionellen Beiträge der SMN-Komplexe und ihrer einzelnen Komplexkomponenten während der U snRNP Bildung charakterisiert werden, sowie der Frage nachgegangen werden, ob SMA verursachende Mutationen in SMN zu Defekten bei spezifischen Schritten dieses Vorgangs führen. Die initialen Experimente zur Etablierung dieses U snRNP Rekonstitutionssystems sind im letzten Teil der Arbeit dargestellt.