

## 6 Zusammenfassung/Summary

### 6.1 Zusammenfassung

Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine neurodegenerative Erkrankung des Menschen, die durch Mutationen im „*Survival of Motor Neurons*“ Gen (*SMN*) hervorgerufen wird. Die initiale Charakterisierung des *SMN*-Proteins (*SMN*) zeigte, daß *SMN in vivo* mit Protein-Faktoren von U snRNPs assoziiert ist. U snRNPs sind kleine RNA-Protein-Komplexe und stellen funktionelle Untereinheiten des Spleißosoms dar, der zellulären Maschinerie, die die Prozessierung von prä-mRNA-Molekülen zu reifen mRNAs im Zellkern katalysiert.

Die spleißosomalen U snRNPs (U1, U2, U4 und U5) enthalten einen gemeinsamen Satz von sieben Sm-Proteinen (SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G), die an die einzelsträngige, Uridin-reiche Sm-Stelle der snRNA binden. Hierbei bildet sich die Sm-core-Domäne, die als das strukturelle Grundgerüst der verschiedenen U snRNPs gilt. Obwohl *in vitro* durchgeführte Studien andeuteten, daß die Zusammenlagerung der U snRNPs spontan abläuft, häuften sich die Hinweise, daß dieser Prozeß *in vivo* von Faktoren wie *SMN* abhängig ist, die keine integralen Bestandteile der U snRNPs sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die putative Funktion von *SMN* bei der Zusammenlagerung von U snRNPs biochemisch untersucht. *In vitro* durchgeführte Bindungsexperimente zeigten, daß *SMN* über seine zentrale Tudor-Domäne direkt an spleißosomale Sm-Proteine bindet. Damit konnte der Tudor-Domäne, die bisher nur als Sequenzmotiv charakterisiert war, erstmalig eine Funktion als Protein-Protein Interaktionsfläche zugewiesen werden. Injektionsexperimente in Oozyten von *Xenopus laevis* zeigten dann, daß Antikörper, die spezifisch die Interaktion der Tudor-Domäne von *SMN* mit Sm-Proteinen blockieren, die Bildung der Sm-core-Domäne *in vivo* verhindern. Damit wurde der Nachweis erbracht, daß *SMN* ein essentieller Faktor für die Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* ist. Durch die Analyse einer

SMA-verursachenden Punktmutation in der Tudor-Domäne konnte die reduzierte Interaktion zwischen SMN und Sm-Proteinen zudem als ein biochemischer Defekt identifiziert werden, der möglicherweise bei SMA-Patienten auftritt.

Durch Fraktionierung von Zellextrakten wurden mehrere makromolekulare SMN-Komplexe isoliert, die wahrscheinlich die Funktion von SMN während der U snRNP Biogenese *in vivo* vermitteln und über ein gemeinsames, strukturelles Grundgerüst aus acht Proteinen verfügen. Mit GIP1/Gemin4, unrip, Hsc70 und p175 konnten vier neue, SMN-assoziierte Faktoren identifiziert werden, die zusammen mit SMN und den bekannten SMN-assoziierten Proteinen SIP1, U1A und Gemin3/dp103 dieses Grundgerüst bilden. Durch die Etablierung eines zellfreien Systems, das die *in vitro* Rekonstitution der Sm-core Domäne in einer SMN-abhängigen Weise erlaubt, wurde gezeigt, daß die Bildung der Sm-core-Domäne *in vivo*, im Gegensatz zu bisherigen Vermutungen, ein energieabhängiger Prozeß ist.

Dieses U snRNP Rekonstitutionssystem und die Verfügbarkeit der isolierten SMN-Komplexe in präparativen Mengen werden es in Zukunft möglich machen, die genauen mechanistischen Aspekte der Zusammenlagerung von U snRNPs *in vivo* auszuarbeiten und die funktionelle Rolle der verschiedenen SMN-Komplexe und ihrer Komponenten dabei zu analysieren.

## 6.2 Summary

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a neurodegenerative disease that is caused by mutations in the „survival of motor neurons“ gene (*SMN*). Initial experiments showed that *in vivo* the SMN protein (*SMN*) is associated with components of spliceosomal U snRNPs. U snRNPs are small RNA-protein complexes that form functional subunits of the spliceosome which is the cellular machinery responsible for processing nuclear pre-mRNA into mature mRNA.

The snRNPs U1, U2, U4 and U5 contain a set of seven Sm-Proteins (SmB/B', D1, D2, D3, E, F and G) that associate at the single stranded uridyl-rich Sm-site of the snRNA thereby forming the Sm-core domain. This domain builds the structural framework that is common to the different U snRNPs. Experimental evidence suggested that the formation of the Sm-core *in vivo* (in contrast to existing *in vitro* data) is dependent on factors such as SMN that are not found in the mature particles.

The putative function of SMN during U snRNP assembly was investigated using biochemical approaches. It was shown that SMN interacts directly with spliceosomal Sm-Proteins via its central Tudor-domain. Thus, the Tudor-domain, a sequence motif of so far unknown function mediates protein-protein interactions. Injection experiments in *Xenopus laevis* oocytes revealed that antibodies that specifically block the interaction between the Tudor-domain of SMN and Sm-Proteins inhibit the formation of the Sm-core domain *in vivo*. Therefore SMN is an essential factor for the assembly of U snRNPs *in vivo*. Furthermore, the analysis of a SMA causing mutation within the Tudor-domain revealed reduced interaction between SMN and Sm-Proteins as a biochemical defect possibly occurring in SMA patients.

Fractionation of cell extracts showed that SMN *in vivo* is incorporated into macromolecular complexes that are likely to mediate the function of SMN during U snRNP biogenesis. These complexes share a common structure of eight proteins which is formed by SMN, the known factors SIP1, U1A and Gemin3/dp103 and the four newly identified SMN associated proteins GIP1/Gemin4, unrip, Hsc 70 and

p175. By establishing a cell free system that allows for the SMN dependent reconstitution of U snRNPs it was shown that U snRNP assembly *in vivo* (contrary to existing *in vitro* data) is an energy dependent process.

With this system at hand and the availability of SMN-complexes in preparative amounts it will be possible to characterize the mechanistic aspects of U snRNP assembly *in vivo* and to analyze the functional contributions of the different SMN-complexes and their components.